

MATERIALES Y MÉTODOS PARA FRAGMENTOS VARIABLES DE CADENA ÚNICA MEJORADOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/946.897, presentada el 11 de diciembre de 2019, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/946.886, presentada el 11 de diciembre de 2019, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/946.882, presentada el 11 de diciembre de 2019, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/946.877, presentada el 11 de diciembre de 2019, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/946.865, presentada el 11 de diciembre de 2019, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/887.529, presentada el 15 de agosto de 2019, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/887.527, presentada el 15 de agosto de 2019, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/887.524, presentada el 15 de agosto de 2019, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/887.519, presentada el 15 de agosto de 2019 y la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/887.514, presentada el 15 de agosto de 2019, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 Esta solicitud incorpora como referencia un listado de secuencias presentado con esta solicitud como un formato de texto, titulado “14620-227-228_SL.txt” creado el 5 de agosto de 2020 y que tiene un tamaño de 258.724 bytes.

1. CAMPO TÉCNICO

Se describen materiales y métodos para fragmentos variables de cadena única mejorados.

2. ANTECEDENTES

5 Los fragmentos variables de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés) de unión al antígeno son módulos que pueden usarse ampliamente como terapéuticos, agentes de imágenes, agentes diagnósticos o como porciones de moléculas heterólogas tales como moléculas multiespecíficas. Uno de los desafíos de los scFv es la poca estabilidad y las tendencias a agregarse (revisado en Worn and Pluckthun
10 (2001) *J Mol Biol* 305: 989-1010; Rothlisberger *et al.*, (2005) *J Mol Biol* 347: 773-789; Gross *et al.*, (1989) *Transplant Proc* 21(1 Pt 1): 127-130, Porter *et al.*, (2011) *J Cancer* 2: 331-332; Porter *et al.*, (2011) *N Engl J Med* 365: 725-733). Por lo tanto, existe una necesidad de diseños de scFv mejorados que opcionalmente puedan incorporarse en moléculas multiespecíficas y moléculas heterólogas.

15 3. SUMARIO

En un aspecto, la descripción proporciona un fragmento variable de cadena única (scFv) aislado que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie
20 conservada estructuralmente y una primera L Cys;
un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona un scFv aislado que comprende una VH,

5 un L y una VL, en donde

la VH comprende una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende una primera L Cys;

la VL comprende una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la L comprende una segunda L Cys; o

10 la VH comprende la VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente, la VL comprende la VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende la primera L Cys y la segunda L Cys, en donde la VH Cys y la primera L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro y la VL Cys y la
15 segunda L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L42;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L45;

5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

10 la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

15 La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,
20 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

5 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L39;

10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

15 la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

20 La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

5 una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L100;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

5 la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

10 una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L100;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L102;

5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

10 la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

15 La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,
20 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

- 5 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L102;

- 10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 15 la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

- 20 La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una composición farmacéutica que
5 comprende el spFv de la descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

La descripción también proporciona un polinucleótido que codifica el spFv de la descripción.

La descripción también proporciona un vector que comprende el polinucleótido de la descripción.

10 La descripción también proporciona una célula huésped que comprende el vector de la descripción.

La descripción también proporciona un método para producir el spFv de la descripción, que comprende cultivar la célula huésped de la descripción en condiciones en las que se produce el spFv, y purificar el spFv.

15 La descripción también proporciona un anticuerpo antiidiotipo que se une al spFv de la descripción.

La descripción también proporciona un kit que comprende el spFv de la descripción.

En otro aspecto, la descripción proporciona una molécula multiespecífica
20 que comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende

un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;

un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

- 5 el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 10 la VH comprende una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende una primera L Cys; la VL comprende una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la L comprende una segunda L Cys; o la VH comprende la VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta
- 15 en la superficie conservada estructuralmente, la VL comprende la VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende la primera L Cys y la segunda L Cys, en donde la VH Cys y la primera L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro y la VL Cys y la segunda L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro.

- 20 La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H105; la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

5 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L39;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H5;

5 la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

10 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L42;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L45;

5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

10 la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

15 La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

20 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

- 5 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L5;

- 10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 15 la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

- 20 La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

5 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L5;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H46;

5 la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

10 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L5;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H46; la VL comprende Cys en L3;

- 5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula multiespecífica proporcionada en la presente descripción y un
10 portador farmacéuticamente aceptable.

En aun otro aspecto, la descripción proporciona una molécula heteróloga que comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende
15 un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys; un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada
20 estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende una primera L Cys; la VL comprende una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la L comprende una segunda L Cys; o

5 la VH comprende la VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente, la VL comprende la VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende la primera L Cys y la segunda L Cys, en donde la VH Cys y la primera L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro y la VL Cys y la

10 segunda L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H105; la VL comprende Cys en L42;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H105; la VL comprende Cys en L45; el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H105;

5 la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

10 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L45;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L39;

- 5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 10 la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
el scFv está en la orientación VL-L-VH.

- 15 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L45;

- el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,
20 4, 5, 6 o 7; y
el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

- 5 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L100;

- 10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 15 la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

- 20 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

5 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L100;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H40;

5 la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

10 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L100;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L102;

5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

10 la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

15 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

20 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula heteróloga de la descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

En aun otro aspecto, la descripción proporciona un proceso para preparar un

5 scFv estabilizado, que comprende:

proporcionar una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) que forman un dominio de unión al antígeno;

proporcionar un enlazador (L) que comprende o se modifica para que comprenda una primera L Cys;

10 modificar la VH para que comprenda una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y

formar un enlace disulfuro entre la VH Cys y la primera L Cys para preparar el scFv estabilizado.

La descripción también proporciona un proceso para preparar un scFv

15 estabilizado, que comprende:

proporcionar una VH y una VL que forman un dominio de unión al antígeno;

proporcionar un L que comprenda o se modifique para que comprenda una segunda L Cys;

modificar la VL para que comprenda una VL Cys en una posición del residuo de

20 marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y

formar un enlace disulfuro entre la VL Cys y la segunda L Cys para preparar el scFv estabilizado.

La descripción también proporciona un proceso para preparar un scFv estabilizado, que comprende:

proporcionar una VH y una VL que forman un dominio de unión al antígeno;

proporcionar un L que comprende o se modifique para que comprenda una primera L

5 Cys y una segunda L Cys;

modificar la VH para que comprenda una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente;

modificar la VL para que comprenda una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y

10 formar un enlace disulfuro entre la VH Cys y la primera L Cys y un enlace disulfuro entre la VL Cys y la segunda L Cys para preparar el scFv estabilizado.

La descripción también proporciona un proceso para preparar un scFv estabilizado, que comprende

proporcionar un polinucleótido que codifica una VH, un L y una VL, en donde

15 la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L42;

la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en un L100;

la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L3;

la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L5;

la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L39;

20 la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L42;

la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L45;

la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L100;

la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L102;

- la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L3;
- la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L5;
- la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L39;
- la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L42;
- 5 la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L45;
- la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L100;
- la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L102;
- la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L3;
- la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L5;
- 10 la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L39;
- la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L42;
- la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L45;
- la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L100;
- la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L102;
- 15 la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L3;
- la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L5;
- la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L39;
- la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L42;
- la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L45;
- 20 la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L102;
- la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L3;
- la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L5;
- la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L39;

la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L42;

la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L45;

la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L100;

la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L102;

5 la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L3;

la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L5;

la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L39;

la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L45;

la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L100; o

10 la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L102, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

expresar el polinucleótido en una célula huésped para producir el scFv estabilizado.

15 En aun otro aspecto, la descripción proporciona un fragmento variable de cadena única (scFv) aislado que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un medio para conectar (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende:

un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie

20 conservada estructuralmente y una primera L Cys;

un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona un fragmento variable de cadena única (scFv) aislado que comprende un medio para la unión al antígeno, un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende un primer enlace disulfuro entre una cisteína (Cys) del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys; un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o el primer enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona un fragmento variable de cadena única (scFv) aislado que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y un medio para la unión al antígeno, en donde el scFv comprende un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys; un segundo enlace disulfuro entre una Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la Cys del

medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un medio para la unión (L) y una región variable de
5 cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys; un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada
10 estructuralmente y una segunda L Cys; o el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que
15 comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un medio para la unión al antígeno, un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende un primer enlace disulfuro entre una cisteína (Cys) del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
20 un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

el primer enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

- 5 comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y un medio para la unión al antígeno (VL), en donde el scFv comprende
- un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
- 10 un segundo enlace disulfuro entre una Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o
- el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y
- 15 la segunda L Cys.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

- comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un medio para la unión (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende
- 20 un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;
- un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

5 comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende un medio para la unión al antígeno, un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende

un primer enlace disulfuro entre una cisteína (Cys) del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;

10 un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

el primer enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

15 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y un medio para la unión al antígeno, en donde el scFv comprende

un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie

20 conservada estructuralmente y una primera L Cys;

un segundo enlace disulfuro entre una Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la Cys del medio de unión al antígeno expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

5 La descripción también proporciona un medio para codificar el scFv proporcionado en la presente descripción.

La descripción también proporciona un medio para replicar el vector proporcionado en la presente descripción.

10 La descripción también proporciona una composición que comprende un medio para estabilizar un scFv.

La descripción también proporciona una composición que comprende un medio para aumentar la termoestabilidad de un scFv.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un medio para estabilizar un scFv.

15 La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un medio para aumentar la termoestabilidad de un scFv.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un medio para estabilizar un scFv.

20 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un medio para aumentar la termoestabilidad de un scFv.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra un diseño ilustrativo del scFv estabilizado (spFv). La VL y la VH están conectadas por un enlazador flexible que se muestra como una línea de guiones

en la Figura que contiene una secuencia grapa CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**) “SS” indica enlaces disulfuro entre la secuencia grapa en el enlazador y los puntos de anclaje.

La **Figura 2** muestra una ilustración gráfica de la selección del punto de anclaje para spFv en la orientación VL-enlazador-VH. El Fv del anticuerpo humano de la línea germinal (pdb id 5I19, GLk1) se usó para los gráficos y mediciones de distancia
 5 ilustrativas. Las distancias que se muestran en líneas de guiones son entre átomos C β de los residuos en Å. Las posiciones de marco conservadas estructuralmente con distancias deseadas se eligieron como puntos de anclaje para la mutación a Cys. Los puntos de anclaje para la orientación VL-enlazador-VH fueron la posición de Chothia 42
 10 para la VL (K42 en la Figura) y la posición 105 para la VH (Q105 en la Figura). El residuo de la VL C-terminal (K107) y el residuo de la VH N-terminal (Q1) también se muestran.

La **Figura 3** muestra una ilustración gráfica de la selección del punto de anclaje para spFv en la orientación VH-enlazador-VL. El Fv del anticuerpo humano de la línea germinal (pdb id 5I19, GLk1) se usó para los gráficos y mediciones de distancia
 15 ilustrativas. Las distancias que se muestran en líneas de guiones son entre átomos C β de los residuos en Å. Las posiciones de marco conservadas estructuralmente con distancias deseadas se eligieron como puntos de anclaje para la mutación a Cys. Los puntos de anclaje para la orientación VH-enlazador-VL fueron la posición de Chothia 43
 para la VH (K43 en la Figura) y la posición 100 para la VL (Q100 en la Figura). El residuo
 20 de la VH C-terminal (S114) y el residuo de la VL N-terminal (D1) también se muestran.

La **Figura 4** muestra una ilustración gráfica de la distancia C β (Cys1)-C β (Cys2) entre los dos residuos Cys en las dos cadenas pesadas de la bisagra de

IgG2a de ratón (pdb id 1igt) CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**). Las distancias se muestran en Ångstrom en la Figura.

La **Figura 5** muestra una ilustración gráfica de la distancia C β (Cys1)-C β (Cys2) entre los dos residuos Cys en las dos cadenas pesadas de la bisagra de IgG humana (pdb id 5dk3) CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**). Las distancias se muestran en Ångstrom en la Figura.

La **Figura 6** muestra los puntos de anclaje de la VL elegidos resaltados en gris y numerados como 1 y 2 por debajo de los alineamientos de aminoácidos. Las secuencias de la VL se numeran de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia. El punto de anclaje 1 de la VL (posición de Chothia 42) se usó en spFv en la orientación VL-enlazador-VH y el punto de anclaje 2 de la VL (posición de Chothia 100) se usó en spFv en la orientación VH-enlazador-VL. GLk1VL: **Sec. con núm. de ident.: 56**, GLk2VL: **Sec. con núm. de ident.: 57**, CAT2200VL: **Sec. con núm. de ident.: 58**; CAT2200bVL: **Sec. con núm. de ident.: 59**.

La **Figura 7** muestra los puntos de anclaje de la VH elegidos resaltados en gris y numerados como 1 y 2 por debajo de los alineamientos de aminoácidos. Las secuencias de la VH se numeran de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia. El punto de anclaje 1 de la VH (posición de Chothia 105) se usó en spFv en la orientación VL-enlazador-VH y el punto de anclaje 2 de la VH (posición de Chothia 43) se usó en spFv en la orientación VH-enlazador-VL. GLk1VH: **Sec. con núm. de ident.: 60**; GLk2VH: **Sec. con núm. de ident.: 61**, CAT2200aVH: **Sec. con núm. de ident.: 62**.

La **Figura 8** muestra la estructura de GLk1 spFv VL-VH. La formación de la grapa entre los puntos de anclaje de la VH y la VL y el enlazador es evidente a partir de la estructura.

La **Figura 9** muestra la estructura de GLk1 spFv VH-VL. La formación de la grapa entre los puntos de anclaje de la VH y la VL y el enlazador es evidente a partir de la estructura.

La **Figura 10** muestra la estructura de GLk2 spFv VH-VL. La formación de la grapa entre los puntos de anclaje de la VH y la VL y el enlazador es evidente a partir de la estructura.

La **Figura 11** muestra la estructura de CAT2200b spFv VH-VL. La formación de la grapa entre los puntos de anclaje de la VH y la VL y el enlazador es evidente a partir de la estructura.

La **Figura 12** muestra la comparación entre el CAT2200b spFv VH-VL no unido (arriba) y el CAT2200a scFv VL-VH unido a IL-17A (abajo).

La **Figura 13** muestra la comparación entre las vistas delanteras de las estructuras del CAT2200b spFv VH-VL no unido (arriba) y el CAT2200a spFv VL-VH unido a IL-17A (abajo).

La **Figura 14** muestra la comparación entre las vistas posteriores de las estructuras del CAT2200b spFv VH-VL no unido (arriba) y el CAT2200a spFv VL-VH unido a IL-17A (abajo).

Las **Figuras 15A-15M** muestran representaciones esquemáticas de anticuerpos fusionados al scFv engrapado. Las **Figuras 15A-15D** muestran heterodímeros 2:1, anticuerpo de control del isotipo fusionado a scFv engrapado

derivado de LTBRmAb1. Las **Figuras 15E-15H** muestran heterodímeros 2:1, EDBmAb1 fusionado a scFv engrapado derivado de LTBRmAb1. Las **Figuras 15I-15J** muestran heterodímeros 2:1, EDBmAb1 fusionado a scFv engrapado derivado de variantes de menor afinidad de LTBRmAb1. Las **Figuras 15K-15L** muestran heterodímeros 2:1, EDBmAb1 o B21M fusionados a scFv engrapado derivado de LTBRmAb1, sin mutaciones de la proteína A en la región Fc. La **Figura 15M** muestra un heterodímero 2:1, MSLNmAb1 fusionado a scFv engrapado derivado de LTBRmAb1.

Las **Figuras 16A-16C** muestran gráficos que demuestran los resultados de los ensayos del reportero NF- κ B de A549 con anticuerpos biespecíficos 2:1. **Figura 16A:** Comparación de la activación de LTBR dependiente de TAA por COVA1456 con COVA1482, sus moléculas de control respectivas COVA1462 y COVA1486, y LIGHT humana recombinante; **Figura 16B:** Comparación de la activación de LTBR dependiente de TAA por COVA1482 y biespecíficos que contienen variantes de menor afinidad de LTBRmAb1 COVA14107 y COVA14108, y COVA1486; **Figura 16C:** Comparación de la activación de LTBR dependiente de TAA por COVA1482 y COVA14133 (constructo sin mutaciones de la proteína A), y sus moléculas de control respectivas COVA1486 y COVA14136.

La **Figura 17** muestra los resultados de la tinción de citometría de flujo de ICAM-1 en células A375 después del experimento de cocultivo. COVA1482 y su molécula de control COVA1486 se comparan con LIGHT humana recombinante.

Las **Figuras 18A-18D** muestran gráficos que demuestran mediciones de citocinas en sobrenadantes de cocultivos tratados con anticuerpos biespecíficos anti-EDB/anti-LTBR COVA14133 comparados con COVA14136 y COVA1440. Los ensayos

se realizan mediante el uso de la plataforma MSD. **Figura 18A:** Concentraciones de RANTES humano; **Figura 18B:** Concentraciones de IL-6 humana; **Figura 18C:** Concentraciones de IL-8 humana; **Figura 18D:** Concentraciones de MIP-3b humano.

Las **Figuras 19A-19B** muestran la activación de LTBR por un biespecífico

- 5 MSLN/LTBR en ensayos de células de cocultivo del reportero NF- κ B/CHOK1MSLN de A549 o el reportero NF- κ B/H226 de A549. **Figura 19A:** Activación de LTBR en ensayo de cocultivo del reportero NF- κ B/H226 de A549. COVA14146 (2:1 MSLNmAb1 x LTBRmAb1) comparado con LIGHT y con constructos 2:1 de control del isotipo COVA1486; **Figura**
- 10 **19B:** Concentración de RANTES secretado al activar LTBR en ensayo de cocultivo del reportero NF- κ B/H226 de A549. COVA14146 (2:1 MSLNmAb1 x LTBRmAb1) comparado con LIGHT y con constructos 2:1 de control del isotipo COVA1486.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los métodos descritos pueden entenderse más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada tomada junto con las figuras adjuntas, que forman parte de esta descripción. Se entenderá que los métodos descritos no se limitan a los métodos específicos que se describen y/o que se muestran en la presente descripción, y que la terminología que se usa en la presente descripción tiene como propósito describir modalidades particulares a manera de ejemplo solamente y que no se prevé que sea limitante.

Todas las patentes, las solicitudes de patente publicadas y publicaciones mencionadas en la presente descripción se incorporan como referencia ya que se describen detalladamente en la presente descripción.

Cuando se presenta una lista, a menos que se establezca de cualquier otra manera, debe comprenderse que cada elemento individual de esa lista, y cada combinación de esa lista, es una modalidad separada. Por ejemplo, una lista de modalidades que se presenta como “**A, B o C**” debe interpretarse que incluye las modalidades “A”, “B”, “C”, “A o B”, “A o C”, “B o C” o “A, B o C”.

Como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “**un**”, “**una**” y “**el/la**” incluyen referentes en plural a menos que el contexto claramente lo determine de cualquier otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una combinación de dos o más células y lo similar.

Se prevé que los términos transicionales “**que comprende**”, “**que consiste esencialmente en**” y “**que consiste en**” deben connotar sus significados generalmente aceptados en el lenguaje de patentes; es decir, (i) “que comprende”, que es sinónimo de

“que incluye”, “que contiene” o “caracterizado por”, es inclusivo o abierto y no excluye etapas o elementos no enumerados adicionales del método; (ii) “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación; y (iii) “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a las etapas o materiales especificados “y los que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)” de la invención reivindicada. Las modalidades descritas en términos de la frase “que comprende” (o sus equivalentes) también proporcionan como modalidades las que se describen independientemente en términos de “que consiste en” y “que consiste esencialmente en”.

“**Aproximadamente**” significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. A menos que se indique explícitamente de cualquier otra manera dentro de los Ejemplos o en otra parte de la Especificación en el contexto de un ensayo, resultado o modalidad particular, “aproximadamente” significa dentro de una desviación estándar según la práctica en la técnica, o un rango de hasta 5 %, cualquiera sea mayor.

“**Supercóntigo alternativo**” se refiere a un marco de proteína monocatenaria que contiene un núcleo estructurado asociado con dominios variables de alta tolerancia conformacional. Los dominios variables toleran la variación que se introduce sin comprometer la integridad del supercóntigo y, por lo tanto, los dominios variables pueden diseñarse por ingeniería y seleccionarse para unirse a un antígeno específico.

“**Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo**”, “**citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo**” o “**ADCC**” se refieren al mecanismo para

inducir la muerte celular que depende de la interacción de células diana revestidas de anticuerpos con células efectoras que tienen actividad lítica, tales como células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), monocitos, macrófagos y neutrófilos a través de receptores de Fc gamma (FcγR) expresados en células efectoras.

5 **“Fagocitosis celular dependiente de anticuerpo”** o **“ADCP”** se refieren al mecanismo de eliminación de células diana revestidas de anticuerpos mediante internalización por células fagocíticas, tales como macrófagos o células dendríticas.

“Antígeno” se refiere a cualquier molécula (p. ej., proteína, péptido, polisacárido, glicoproteína, glicolípido, ácido nucleico, porciones de estos, o
10 combinaciones de estos) que es capaz de mediar una respuesta inmune. Las respuestas inmunes ilustrativas incluyen la producción de anticuerpos y la activación de células inmunes, tales como células T, células B o células NK.

“Fragmento de unión al antígeno” o **“dominio de unión al antígeno”** se refieren a una porción de una proteína que se une al antígeno. Los fragmentos de unión al
15 antígeno pueden ser polipéptidos sintéticos, que pueden obtenerse enzimáticamente o modificarse genéticamente e incluyen porciones de una inmunoglobulina que se unen a un antígeno, tal como una VH, una VL, la VH y la VL, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv, anticuerpos de dominio (dAb, por sus siglas en inglés) que consisten en un dominio de VH o un dominio de VL, dominios de VH de camélidos, dominios de VHH, unidades de
20 reconocimiento mínimo que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan las CDR de un anticuerpo, tales como las porciones FR3-CDR3-FR4, la HCDR1, la HCDR2 y/o la HCDR3 y la LCDR1, la LCDR2 y/o la LCDR3, supercóntigos alternativos que se unen a un antígeno y proteínas multiespecíficas que comprenden los fragmentos de unión al

antígeno. Los fragmentos de unión al antígeno (tal como la VH y la VL) pueden enlazarse entre sí a través de un enlazador sintético para formar varios tipos de diseños de anticuerpos únicos en los cuales los dominios VH/VL pueden aparearse intramolecularmente, o intermolecularmente en los casos en que los dominios de VH y VL se expresan por cadenas únicas separadas, para formar un dominio de unión al antígeno monovalente, tal como Fv de cadena simple (scFv) o diacuerpo. Los fragmentos de unión al antígeno también pueden conjugarse a otros anticuerpos, proteínas, fragmentos de unión al antígeno o supercóntigos alternativos que pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos para diseñar por ingeniería proteínas biespecíficas y multiespecíficas.

“**Anticuerpos**” se entiende en un sentido amplio e incluye moléculas de inmunoglobulina que incluyen anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanizados y quiméricos, fragmentos de unión al antígeno, anticuerpos multiespecíficos, tales como biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos, etc. anticuerpos diméricos, tetraméricos o multiméricos, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos de dominios y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un parátipo de la especificidad requerida. Los “anticuerpos completos” comprenden dos cadenas pesadas (HC, por sus siglas en inglés) y dos cadenas ligeras (LC, por sus siglas en inglés) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de estos (p. ej., IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena pesada (que comprende los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3). Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena ligera (CL, por sus siglas en inglés). Las regiones VH y VL

pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro segmentos de FR, dispuestos desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. La IgA y la IgG se subclasifican además como los isotipos IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos, específicamente, kappa (κ) y lambda (λ), basadas en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes.

“**Biespecífico**” se refiere a una molécula (tal como un anticuerpo) que se une específicamente a dos antígenos distintos o dos epítopos distintos dentro del mismo antígeno. La molécula biespecífica puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies (homólogas), tales como de ser humano o de mono, por ejemplo *Macaca fascicularis* (cynomolgus) o *Pan troglodytes*, o puede unirse a un epítipo que se comparte entre dos o más antígenos distintos.

“**Receptor de antígeno quimérico**” o “**CAR**” se refieren a receptores de células T diseñados por ingeniería que injertan una especificidad de ligando o antígeno en células T (por ejemplo, células T naïve, células T de memoria central, células T de memoria efectora o combinaciones de estas). Los CAR también se conocen como receptores de células T artificiales, receptores de células T quiméricos o

immunorreceptores quiméricos. Los CAR comprenden un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno, un dominio transmembrana y al menos un dominio intracelular. El CAR de dominio intracelular comprende un polipéptido conocido por funcionar como un dominio que transmite una señal para provocar la activación o la inhibición de un proceso biológico en una célula. El dominio transmembrana comprende cualquier péptido o polipéptido conocido por abarcar la membrana celular y que puede funcionar para unir los dominios extracelular y de señalización. Un receptor de antígeno quimérico puede comprender, opcionalmente, un dominio bisagra que sirve como un enlazador entre los dominios extracelular y transmembrana.

“**Citotoxicidad dependiente de complemento**” o “**CDC**” se refieren a un mecanismo para inducir muerte celular en el que el dominio efector Fc de una proteína unida a la diana se une y activa el componente del complemento C1q el que a su vez activa la cascada del complemento, lo que conduce a la muerte de la célula diana. La activación del complemento también puede resultar en el depósito de los componentes del complemento en la superficie de la célula diana que facilita la CDC mediante la unión a los receptores del complemento (p. ej., CR3) en leucocitos.

“**Regiones determinantes de complementariedad**” (CDR, por sus siglas en inglés) son regiones de anticuerpos que se unen a un antígeno. Existen tres CDR en la VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres CDR en la VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3). Las CDR pueden definirse usando varias delineaciones tales como Kabat (Wu *et al.* (1970) *J Exp Med* 132: 211-250; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia *et al.*, (1987) *J Mol Biol* 196: 901-17), IMGT (Lefranc *et al.*, (2003) *Dev*

Comp Immunol 27: 55-77) y AbM (Martin y Thornton (1996) *J Biol Biol* 263: 800-815).

Se describe la correspondencia entre las diversas delineaciones y la numeración de región variable (ver, p. ej., Lefranc *et al.* (2003) *Dev Comp Immunol* 27: 55-77;

Honegger and Pluckthun, *J Mol Biol* (2001) 309:657-670; base de datos International

5 ImMunoGeneTics (IMGT); recursos web, http://www_imgt_org). Los programas disponibles tales como abYsis por UCL Business PLC pueden usarse para delinear las CDR. El término “CDR”, “HCDR1”, “HCDR2”, “HCDR3”, “LCDR1”, “LCDR2” y “LCDR3”, como se usa en la presente descripción, incluye las CDR definidas por cualquiera de los métodos descritos *anteriormente*, Kabat, Chothia, IMGT o AbM, a
10 menos que se mencione explícitamente de cualquier otra manera en la especificación.

“**Disminuir**”, “**decrecer**” o “**reducir**” se refieren generalmente a la capacidad de una molécula de prueba para mediar una respuesta reducida (es decir, efecto corriente abajo) cuando se compara con la respuesta mediada por un control o un vehículo. Las respuestas ilustrativas incluyen la unión de una proteína a su antígeno o
15 receptor, la unión potenciada a FcγR o funciones efectoras de Fc potenciadas tales como ADCC, CDC y/o ADCP potenciadas. La disminución puede ser una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta medida entre la molécula de prueba y el control (o el vehículo), o una disminución en la respuesta medida, tal como una disminución de aproximadamente 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 30
20 veces o más, tal como 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces o más.

“**Potenciar**”, “**promover**” o “**aumentar**” se refieren generalmente a la capacidad de la molécula de prueba para mediar una mayor respuesta (es decir, efecto corriente abajo) cuando se compara con la respuesta mediada por un control o

un vehículo. Las respuestas ilustrativas son la unión de una proteína a su antígeno o receptor, la unión potenciada a FcγR o funciones efectoras de Fc potenciadas tales como ADCC, CDC y/o ADCP potenciadas. La potenciación puede ser una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta medida entre la molécula de prueba y el control (o vehículo), o un aumento en la respuesta medida, tal como un aumento de aproximadamente 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 30 veces o más, tal como 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces o más.

“**Vector de expresión**” se refiere a un vector que puede usarse en un sistema biológico o en un sistema biológico reconstituido para dirigir la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia polinucleotídica presente en el vector de expresión.

“**Heterólogo**” se refiere a un polipéptido o un polinucleótido que comprende dos o más polipéptidos o dos o más polinucleótidos que en la naturaleza no se encuentran en la misma relación entre sí.

“**Polinucleótido heterólogo**” se refiere a un polinucleótido que comprende dos o más polinucleótidos que en la naturaleza no se encuentran en la misma relación entre sí.

“**Polipéptido heterólogo**” se refiere a un polipéptido que comprende dos o más polipéptidos que en la naturaleza no se encuentran en la misma relación entre sí.

“**Anticuerpo humano**” se refiere a un anticuerpo que está optimizado para tener una respuesta inmunitaria mínima cuando se administra a un sujeto humano.

Las regiones variables del anticuerpo humano se derivan de secuencias de inmunoglobulina humana. Si el anticuerpo humano contiene una región constante o una porción de la región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humano comprende regiones

variables de cadena pesada y ligera que se “derivan de” secuencias de origen humano si las regiones variables del anticuerpo humano se obtienen de un sistema que usa inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulina reorganizados. Tales sistemas ilustrativos son bibliotecas de genes de

5 inmunoglobulina humana presentadas en fagos y animales transgénicos no humanos, tales como ratones o ratas que portan loci de inmunoglobulina humana. El “anticuerpo humano” contiene, típicamente, diferencias de aminoácidos en comparación con las inmunoglobulinas expresadas en humanos debido a las diferencias entre los sistemas usados para obtener el anticuerpo humano y los loci de inmunoglobulina humana, la

10 introducción de mutaciones somáticas o la introducción intencional de sustituciones en los marcos o las CDR, o ambos. Típicamente, el “anticuerpo humano” es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por

15 inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulina reorganizados. En algunos casos, el “anticuerpo humano” puede contener secuencias de marco de consenso derivadas a partir de análisis de secuencias de marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik *et al.*, (2000) *J Mol Biol* 296:57-86, o una HCDR3 sintética incorporada en genotecas de inmunoglobulinas

20 humanas presentadas en fago, por ejemplo, como se describe en Shi *et al.*, (2010) *J Mol Biol* 397:385-396, y en la publicación de patente internacional núm. WO2009/085462. Los anticuerpos en los cuales al menos una CDR se deriva de una especie no humana no se incluyen en la definición de “anticuerpo humano”.

“**Anticuerpo humanizado**” se refiere a un anticuerpo en el cual al menos una CDR se deriva de especies no humanas y al menos un marco se deriva de secuencias de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones en los marcos de manera que los marcos no puedan ser copias exactas de las secuencias génicas de línea germinal de inmunoglobulina humana o inmunoglobulina humana expresada.

“**Aislado**” se refiere a una población homogénea de moléculas (tales como los scFv de la descripción o proteínas heterólogas que comprenden los scFv de la descripción) que se han separado y/o purificado sustancialmente de otros componentes del sistema en el cual se producen las moléculas, tal como una célula recombinante, así como una proteína que se ha sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. “Aislado” se refiere a una molécula que está sustancialmente exenta de otro material celular y/o sustancias químicas y abarca moléculas que están aisladas a una pureza más alta, tal como a 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de pureza.

“**Modular**” se refiere a la capacidad potenciada o reducida de una molécula de prueba para mediar una respuesta potenciada o reducida (*es decir*, efecto corriente abajo) cuando se compara con la respuesta mediada por un control o un vehículo.

“**Anticuerpo monoclonal**” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de moléculas de anticuerpo, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles alteraciones muy conocidas tales como la eliminación de lisina del C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o modificaciones posteriores a la traducción, tales como la isomerización o

desamidación de aminoácidos, oxidación de metionina o desamidación de asparagina o glutamina. Los anticuerpos monoclonales se unen, típicamente, a un epítipo antigénico. Los anticuerpos monoclonales biespecíficos se unen a dos epítipos antigénicos distintos. Los anticuerpos monoclonales pueden tener glicosilación heterogénea dentro de la población de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos, tales como biespecíficos, monovalentes, bivalentes o multivalentes.

“**Multiespecífico**” se refiere a una molécula que se une a dos o más antígenos distintos o a dos o más epítipos distintos dentro del mismo antígeno. La molécula multiespecífica puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies (homólogos), tales como un ser humano o un mono, por ejemplo, *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno) o *Pan troglodytes*, o puede unirse a un epítipo que se comparte entre dos o más antígenos distintos.

“**Polinucleótido**” se refiere a una molécula que comprende una cadena de nucleótidos unidos covalentemente por una cadena principal de azúcar y fosfato u otra forma química covalente equivalente. El ADNc es un ejemplo típico de un polinucleótido.

“**Proteína**” o “**polipéptido**” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a una molécula que comprende uno o más polipéptidos cada uno de los cuales está compuesto por al menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico. La proteína puede ser un monómero o puede ser un complejo proteico de dos o más subunidades, las subunidades son idénticas o distintas. Los polipéptidos pequeños de una cantidad menor que 50 aminoácidos podrían denominarse “péptidos”. La proteína puede ser una proteína de fusión heteróloga, una glicoproteína o una proteína modificada por modificaciones postraduccionales tales como fosforilación,

acetilación, miristoilación, palmitoilación, glicosilación, oxidación, formilación, amidación, citrulinación, poliglutamilación, ADP-ribosilación, pegilación o biotinilación.

“**Recombinante**” se refiere a polinucleótidos, polipéptidos, vectores, virus y otras macromoléculas que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios

5 recombinantes.

“**Fv de cadena única**” o “**scFv**” se refieren a una proteína de cadena única que comprende una VH, una VL y un enlazador entre la VH y la VL. El scFv puede tener las regiones variables de VL y VH en cualquier orientación, por ejemplo, con respecto al orden N a C-terminal de la VH y la VL. Por lo tanto, el scFv puede estar en
10 la orientación VL-enlazador-VH o VH-enlazador-VL. El scFv puede modificarse para comprender enlaces disulfuro entre la VH, la VL y el enlazador.

“**Se une específicamente**”, “**unión específica**”, “**que se une específicamente**” o “**se une**” se refieren a una proteína tal como un scFv que se une a un antígeno o a un epítipo dentro del antígeno con mayor afinidad que para otros antígenos.

15 Típicamente, la proteína, tal como el scFv se une al antígeno o al epítipo dentro del antígeno con una constante de disociación de equilibrio (K_D) de aproximadamente 1×10^{-6} M o menos, aproximadamente 1×10^{-7} M o menos, aproximadamente 5×10^{-8} M o menos, aproximadamente 1×10^{-8} M o menos, aproximadamente 1×10^{-9} M o menos, aproximadamente 1×10^{-10} M o menos, aproximadamente 1×10^{-11} M o menos, o
20 aproximadamente 1×10^{-12} M o menos, típicamente con la K_D que es al menos cien veces menor que su K_D para unirse a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína).

“**Fv de cadena única engrapado**” o “**spFv**” se refieren a un scFv que comprende uno o más enlaces disulfuro entre la VH y el enlazador o la VL y el

enlazador. Típicamente, el spFv puede comprender un enlace disulfuro entre la VH y el enlazador, un enlace disulfuro entre la VL y el enlazador o dos enlaces disulfuro entre la VH y el enlazador y la VL y el enlazador. Las moléculas de scFv que comprenden enlaces disulfuro entre la VH y la VL están excluidas del término “spFv”.

5 **“Sujeto”** incluye cualquier animal humano o no humano. “Animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Los términos “sujeto” y “paciente” pueden usarse indistintamente en la presente descripción.

10 **“Cantidad terapéuticamente eficaz”** se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, el peso del individuo, y la capacidad de un agente terapéutico o una combinación de agentes
15 terapéuticos para inducir una respuesta deseada en el individuo.

“Tratar”, “tratando” o “tratamiento” de una enfermedad o trastorno se refieren a lograr uno o más de lo siguiente: reducir la gravedad y/o duración del trastorno, inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno tratado, limitar o prevenir la recurrencia del trastorno en sujetos que han tenido antes el trastorno, o limitar o prevenir la
20 recurrencia de los síntomas en sujetos que eran antes sintomáticos para el trastorno.

“Triespecífico” se refiere a una molécula (tal como un anticuerpo) que se une específicamente a tres antígenos distintos o tres epítomos distintos dentro del mismo antígeno. El anticuerpo trispecífico puede tener reactividad cruzada con otros

antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies (homólogos), tales como un ser humano o un mono, por ejemplo, *Macaca cynomolgus* (cynomolgus, cyno) o *Pan troglodytes*, o puede unirse a un epítipo que se comparte entre tres o más antígenos distintos.

- 5 **“Variante”, “mutante” o “alterado”** se refieren a un polipéptido o a un polinucleótido que difieren de un polipéptido de referencia o de un polinucleótido de referencia en una o más modificaciones, por ejemplo, una o más sustituciones, inserciones o deleciones.

10 La numeración de los residuos de aminoácidos en la región constante del anticuerpo en toda la especificación está de acuerdo con el índice UE descrito en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), a menos que se indique explícitamente lo contrario.

15 Las mutaciones en las regiones constantes de la Ig se mencionan de la siguiente manera: L351Y_F405A_Y407V se refiere a mutaciones L351Y, F405A e Y407V en una región constante de la inmunoglobulina. L351Y_F405A_Y407V/T394W se refiere a las mutaciones L351Y, F405A e Y407V en la primera región constante de la Ig y a la mutación T394W en la segunda región constante de la Ig presente en la molécula.

20 La numeración de las regiones variables está de acuerdo con Chothia, a menos que se indique de cualquier otra manera.

“VH cisteína” o “VH Cys” se refieren a un residuo Cys que reside en el marco de la VH.

“**VL cisteína**” o “**VL Cys**” se refieren a un residuo Cys que reside en el marco de la VL.

“**Estabilizado**” se refiere a que los scFv retienen la unión comparable a hK2. Cuando se comparan con una muestra de scFv no calentada se denominan

5 termoestables.

“**Estabilidad mejorada**” se refiere al spFv de la descripción que tiene un elevado punto de fusión (T_m) cuando se compara con un scFv parental que carece de enlaces disulfuro y residuos Cys introducidos en el spFv. La T_m elevada puede ser una elevación de 2 °C o más, tal como 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C,

10 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C o 15 °C.

“**Punto de anclaje**” se refiere a un residuo Cys del marco de la VH o de la VL de un scFv que puede mutagenizarse a Cys sin un efecto desfavorable para la estructura total del scFv y que es capaz de formar un enlace disulfuro con un Cys que reside en el enlazador de scFv.

15 “**Grapa**” se refiere al enlazador de scFv que contiene uno o dos residuos Cys que son capaces de formar un enlace disulfuro con el punto de anclaje Cys.

“**Superficie expuesta**” se refiere a un residuo de aminoácido que está al menos parcialmente expuesto a una superficie de una proteína y que es accesible para un solvente, tal como accesible para deuteración. Los algoritmos son bien conocidos en

20 la técnica para predecir la accesibilidad a la superficie de residuos basada en la secuencia primaria o en una proteína. Alternativamente, los residuos expuestos a la superficie pueden identificarse a partir de una estructura cristalina de la proteína.

“**LTBR**” se refiere a un polipéptido que es un receptor de la superficie celular para la linfotoxina involucrado en la apoptosis y la liberación de citocinas, que es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral. El LTBR también puede mencionarse como “miembro 3 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF3)”. El LTBR se expresa en la superficie de muchos tipos celulares, que incluyen células de linajes epiteliales y mieloides. El LTBR puede unirse específicamente a la forma de membrana de linfotoxina (un complejo de linfotoxina alfa y linfotoxina beta). La activación del LTBR puede desencadenar la apoptosis mediante TRAF3 y TRAF5 y puede conducir a la liberación de interleucina 8. A menos que se indique, preferentemente el LTBR es un LTBR humano. Una secuencia de aminoácidos de LTBR humano es proporcionada por el número de UniProt P36941.

“**EDB**” o “**extradominio B**” se refieren a un dominio de fibronectina que puede incluirse en moléculas de fibronectina basado en el patrón de empalme del preARNm de la fibronectina. El extradominio B es una repetición de tipo III de fibronectina (FN, por sus siglas en inglés) completa que comprende 91 residuos de aminoácidos. Generalmente, el EDB es indetectable en tejidos de adultos normales, pero exhibe una mayor expresión en tejidos fetales y tumorales en la matriz extracelular, y se acumula alrededor de la neovasculatura durante procesos angiogénicos, lo que hace, por lo tanto, que el EDB sea un marcador potencial y objetivo de angiogénesis. A menos que se indique, preferentemente el EDB es un EDB humano. La secuencia de aminoácidos de la isoforma de fibronectina que contiene EDB humano es proporcionada por el número de UniProt P02751.

“**Fibronectina**” se refiere a un polipéptido que es una glicoproteína de alto peso molecular de la matriz extracelular. La fibronectina puede unirse a proteínas del receptor que abarca la membrana, denominadas integrinas. La fibronectina también puede unirse a otras proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno, fibrina y proteoglicanos de sulfato de heparán. La fibronectina puede existir como un dímero de proteína, que consiste en dos monómeros casi idénticos unidos por un par de enlaces disulfuro. La fibronectina se produce a partir de un único gen, pero el corte y empalme alternativo de la molécula de preARNm de fibronectina conduce a la creación de varias isoformas de fibronectina, una de las cuales es fibronectina de EDB. La fibronectina puede desempeñar un papel en la adhesión, crecimiento, migración y diferenciación celular, y puede ser importante para procesos tales como cicatrización de heridas y desarrollo embrionario. Una secuencia de aminoácidos de fibronectina humana es proporcionada por UniProt número P02751, que contiene el extradominio B, y los números de acceso al NCBI NP_001263337 (isoforma B), NP_001263338 (isoforma c), NP_001263339 (isoforma d), NP_001263340 (isoforma e), y NP_001263341 (isoforma f), NP_001293058 (isoforma 8), NP_001293059 (isoforma 9), NP_001293060 (isoforma 10), NP_001293061 (isoforma 11), y NP_002017 (isoforma 3).

5.1 Composiciones de materia

La descripción proporciona moléculas de scFv estabilizadas (mencionadas en la presente descripción como spFv (Fv engrapado), moléculas heterólogas y multiespecíficas que comprenden el spFv, polinucleótidos que las codifican, vectores, células huésped y métodos para elaborarlas y usarlas. La descripción se basa, al menos en parte, en la identificación de posiciones de residuos adecuadas en la VH y/o VL (mencionadas en la presente descripción como punto de anclaje de VH o punto de

anclaje de VL) y en el enlazador flexible (mencionado en la presente descripción como grapa) que pueden modificarse a residuos de cisteína que resultan en la formación de enlaces disulfuro entre el enlazador y los dominios variables en el scFv. La estrategia de “grapado” descrita en la presente descripción es ampliamente aplicable a todos los dominios VH/VL y moléculas de scFv preexistentes que proporcionan identidad estructural al scFv con estabilidad mejorada. El spFv descrito en la presente descripción puede conjugarse en cualquier proteína heteróloga, formato biespecífico o multiespecífico, que incluye receptores de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés), moléculas de redirección de células T, moléculas bi y multiespecíficas y puede usarse como moléculas terapéuticas, diagnósticas y de detección.

spFv de la descripción

La descripción proporciona un fragmento variable de cadena única (scFv) aislado que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys; un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona un scFv aislado que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende una primera L Cys; la VL comprende una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la L comprende una segunda L Cys; o

5 la VH comprende la VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente, la VL comprende la VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende la primera L Cys y la segunda L Cys, en donde la VH Cys y la primera L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro y la VL Cys y la

10 segunda L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro. El enlace disulfuro se forma típicamente durante la expresión del scFv de la descripción.

Si bien los ejemplos específicos describen el spFv con dos enlaces disulfuro, se deduce fácilmente que puede fabricarse y usarse un spFv con un enlace disulfuro, formado entre el Cys enlazador y la VH Cys o la VL Cys, generando moléculas

15 “medio ancladas”. Las posiciones de anclaje son iguales en los spFv que tienen uno o dos enlaces disulfuro. La posición del enlazador Cys puede variar en la molécula medio anclada siempre y cuando cumpla los requisitos de distancia y geometría para la formación de enlaces disulfuro con el punto de anclaje. Se espera que el spFv medio anclado restringirá el movimiento relativo al VL/VH similar al par VL/VH

20 estabilizado con dos enlaces disulfuro y, por lo tanto, también será estabilizador.

El spFv de la descripción exhibió una mayor estabilidad térmica cuando se comparó con el scFv parental desprovisto de enlaces disulfuro. Generalmente, la T_m del spFv fue aproximadamente 10 °C más alta cuando se comparó con el scFv

parental desprovisto de los enlaces disulfuro independientemente de la T_m del scFv parental. Generalmente, la estabilidad puede ser estabilidad térmica o estabilidad mecánica. La termoestabilidad puede evaluarse con el uso de calorimetría térmica diferencial (DSC, por sus siglas en inglés), y en dicha DSC se realizan exploraciones con el uso de muestras de proteínas calentadas (tales como muestras calentadas hasta 60 °C) seguido por análisis de los perfiles de fusión térmica resultantes con el uso de transiciones de 2 estados o distintas a 2 estados. Para las transiciones distintas a 2 estados se registran dos transiciones (T_{m1} y T_{m2}) que corresponden a la T_m de fusión de los dominios de VL y VH, respectivamente.

En algunas modalidades, la distancia entre la VH Cys y la VL Cys es de aproximadamente 7 Å a aproximadamente 9 Å. En algunas modalidades, la distancia entre la VH Cys y la VL Cys es aproximadamente 7 Å. En algunas modalidades, la distancia entre la VH Cys y la VL Cys es aproximadamente 8 Å. En algunas modalidades, la distancia entre la VH Cys y la VL Cys es aproximadamente 9 Å.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3, H5, H40, H43, H46 o H105, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105

En algunas modalidades, la VL Cys está en L3, L5, L39, L42, L45, L100 o L102, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

En algunas modalidades, la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VL Cys está en L5.

5 En algunas modalidades, la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VL Cys está en L102.

10 En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L39.

15 En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L102.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L3.

20 En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L102.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L5.

5 En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L102.

10 En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L45.

15 En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L102.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L42.

20 En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L102.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L100.

5 En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L102.

La numeración de residuos de las regiones de VH y VL está de acuerdo con Chothia.

La numeración de Chothia es bien conocida. Otros sistemas de numeración, tales como la numeración de Kabat o IMGT o la numeración secuencial pueden usarse para numerar las posiciones de residuos de la VH y la VL. La **Tabla 1** muestra la correspondencia entre la numeración de Chothia, Kabat y secuencial para una VH ilustrativa, GLk1 VH (**sec. con núm. de ident.: 60**). La **Tabla 2** muestra la correspondencia entre la numeración de Chothia, Kabat y secuencial para una VL ilustrativa, GLk1 VL (**sec. con núm. de ident.: 56**).

15 **Tabla 1.**

Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición		Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición
H1	H1	1	E		H60	H60	61	A
H2	H2	2	V		H61	H61	62	D
H3	H3	3	Q		H62	H62	63	S
H4	H4	4	L		H63	H63	64	V
H5	H5	5	L		H64	H64	65	K
H6	H6	6	E		H65	H65	66	G
H7	H7	7	S		H66	H66	67	R
H8	H8	8	G		H67	H67	68	F
H9	H9	9	G		H68	H68	69	T
H10	H10	10	G		H69	H69	70	I
H11	H11	11	L		H70	H70	71	S

Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición		Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición
H12	H12	12	V		H71	H71	72	R
H13	H13	13	Q		H72	H72	73	D
H14	H14	14	P		H73	H73	74	N
H15	H15	15	G		H74	H74	75	S
H16	H16	16	G		H75	H75	76	K
H17	H17	17	S		H76	H76	77	N
H18	H18	18	L		H77	H77	78	T
H19	H19	19	R		H78	H78	79	L
H20	H20	20	L		H79	H79	80	Y
H21	H21	21	S		H80	H80	81	L
H22	H22	22	C		H81	H81	82	Q
H23	H23	23	A		H82	H82	83	M
H24	H24	24	A		H82A	H82A	84	N
H25	H25	25	S		H82B	H82B	85	S
H26	H26	26	G		H82C	H82C	86	L
H27	H27	27	F		H83	H83	87	R
H28	H28	28	T		H84	H84	88	A
H29	H29	29	F		H85	H85	89	E
H30	H30	30	S		H86	H86	90	D
H31	H31	31	S		H87	H87	91	T
H32	H32	32	Y		H88	H88	92	A
H33	H33	33	A		H89	H89	93	V
H34	H34	34	M		H90	H90	94	Y
H35	H35	35	S		H91	H91	95	Y
H36	H36	36	W		H92	H92	96	C
H37	H37	37	V		H93	H93	97	A
H38	H38	38	R		H94	H94	98	K
H39	H39	39	Q		H95	H95	99	Y
H40	H40	40	A		H96	H96	100	D
H41	H41	41	P		H97	H97	101	G
H42	H42	42	G		H98	H98	102	I
H43	H43	43	K		H99	H99	103	Y
H44	H44	44	G		H100	H100	104	G
H45	H45	45	L		H100A	H100A	105	E
H46	H46	46	E		H100B	H100B	106	L
H47	H47	47	W		H101	H101	107	D

Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición		Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición
H48	H48	48	V		H102	H102	108	F
H49	H49	49	S		H103	H103	109	W
H50	H50	50	A		H104	H104	110	G
H51	H51	51	I		H105	H105	111	Q
H52	H52	52	S		H106	H106	112	G
H52A	H52A	53	G		H107	H107	113	T
H53	H53	54	S		H108	H108	114	L
H54	H54	55	G		H109	H109	115	V
H55	H55	56	G		H110	H110	116	T
H56	H56	57	S		H111	H111	117	V
H57	H57	58	T		H112	H112	118	S
H58	H58	59	Y		H113	H113	119	S
H59	H59	60	Y					

Tabla 2.

Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición		Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición
L1	L1	1	D		L55	L55	55	Q
L2	L2	2	I		L56	L56	56	S
L3	L3	3	Q		L57	L57	57	G
L4	L4	4	M		L58	L58	58	V
L5	L5	5	T		L59	L59	59	P
L6	L6	6	Q		L60	L60	60	S
L7	L7	7	S		L61	L61	61	R
L8	L8	8	P		L62	L62	62	F
L9	L9	9	S		L63	L63	63	S
L10	L10	10	S		L64	L64	64	G
L11	L11	11	L		L65	L65	65	S
L12	L12	12	S		L66	L66	66	G
L13	L13	13	A		L67	L67	67	S
L14	L14	14	S		L68	L68	68	G
L15	L15	15	V		L69	L69	69	T
L16	L16	16	G		L70	L70	70	D
L17	L17	17	D		L71	L71	71	F

Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición		Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición
L18	L18	18	R		L72	L72	72	T
L19	L19	19	V		L73	L73	73	L
L20	L20	20	T		L74	L74	74	T
L21	L21	21	I		L75	L75	75	I
L22	L22	22	T		L76	L76	76	S
L23	L23	23	C		L77	L77	77	S
L24	L24	24	R		L78	L78	78	L
L25	L25	25	A		L79	L79	79	Q
L26	L26	26	S		L80	L80	80	P
L27	L27	27	Q		L81	L81	81	E
L28	L28	28	S		L82	L82	82	D
L29	L29	29	I		L83	L83	83	F
L30	L30	30	S		L84	L84	84	A
L31	L31	31	S		L85	L85	85	T
L32	L32	32	Y		L86	L86	86	Y
L33	L33	33	L		L87	L87	87	Y
L34	L34	34	N		L88	L88	88	C
L35	L35	35	W		L89	L89	89	Q
L36	L36	36	Y		L90	L90	90	Q
L37	L37	37	Q		L91	L91	91	S
L38	L38	38	Q		L92	L92	92	Y
L39	L39	39	K		L93	L93	93	S
L40	L40	40	P		L94	L94	94	T
L41	L41	41	G		L95	L95	95	P
L42	L42	42	K		L96	L96	96	L
L43	L43	43	A		L97	L97	97	T
L44	L44	44	P		L98	L98	98	F
L45	L45	45	K		L99	L99	99	G
L46	L46	46	L		L100	L100	100	Q
L47	L47	47	L		L101	L101	101	G
L48	L48	48	I		L102	L102	102	T
L49	L49	49	Y		L103	L103	103	K
L50	L50	50	A		L104	L104	104	V
L51	L51	51	A		L105	L105	105	E
L52	L52	52	S		L106	L106	106	I
L53	L53	53	S		L107	L107	107	K

Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición		Numeración de Chothia	Numeración de Kabat	Numeración secuencial	Residuo de aminoácido en la posición
L54	L54	54	L		L108	L108	108	R

En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos contiguos derivada de una región bisagra de la inmunoglobulina (Ig).

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig se deriva de una región bisagra de la Ig humana o no humana. Las regiones bisagra de la Ig no humana ilustrativas son las de ratón, rata, pollo y primates no humanos, tal como monos.

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig se deriva de la región bisagra de la Ig humana.

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig humana es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA o IgE.

La región bisagra de la Ig se define generalmente como que incluye el residuo 216 y que termina en el residuo 230 de la IgG humana, en donde la numeración de residuos está de acuerdo con el Índice EU. En algunos casos, en la bisagra también puede incluirse una región bisagra inferior de aproximadamente el residuo 231 a aproximadamente el residuo 237. Por lo tanto, una región bisagra de IgG1 puede comprender la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (**sec. con núm. de ident.: 63**), o cuando la bisagra inferior está incluida, la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (**sec. con núm. de ident.: 64**). Las regiones bisagra de otros isotipos de Ig son bien conocidas y sus secuencias de aminoácidos pueden obtenerse, por ejemplo, en el sitio web de ImMunoGeneTics. Por

ejemplo, la bisagra de IgG2 comprende la secuencia de aminoácidos
ERKCCVECP (sec. con núm. de ident.: 65).

El L comprende la secuencia de aminoácidos contiguos que se “**deriva de**” la
región bisagra de la Ig en aquellos casos en los cuales el L comprende al menos una
5 porción de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de la Ig o al menos una
porción de una región bisagra de la Ig modificada. La región bisagra de la Ig modificada
comprende una o más mutaciones cuando se compara con la bisagra de la Ig silvestre.
Las mutaciones ilustrativas que pueden introducirse son sustituciones de residuos Cys
para reducir el número de Cys en el L a uno o dos, sustitución de residuos Pro, o
10 cualquier modificación conservadora, tal como sustituciones conservadoras.

“**Modificaciones conservadoras**” se refiere a las modificaciones de
aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del
anticuerpo que contiene las modificaciones de aminoácidos. Las modificaciones
conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Las
15 sustituciones de aminoácido conservadoras son aquellas en las que el aminoácido se
reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las
familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares están bien
definidas e incluyen aminoácidos con cadenas laterales acídicas (p. ej., ácido aspártico,
ácido glutámico), cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas
20 laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina,
metionina), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina,
cisteína, serina, treonina, tirosina, triptófano), cadenas laterales aromáticas (p. ej.,
fenilalanina, triptófano, histidina, tirosina), cadenas laterales alifáticas (p. ej., glicina,

alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), amida (p. ej., asparagina, glutamina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales que contienen azufre (cisteína, metionina). Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede sustituirse con alanina, como se ha descrito previamente para la mutagénesis por barrido de alanina (MacLennan *et al.*, (1988) *Acta Physiol Scand Suppl* 5 643:55-67; Sasaki *et al.*, (1988) *Adv Biophys* 35:1-24). Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse por medio de métodos conocidos, por ejemplo, mediante mutagénesis por PCR (patente de los EE. UU. núm. 4.683.195). Las bisagras variantes resultantes pueden incorporarse en los constructos de spFv de la descripción y someterse a prueba para 10 determinar sus características, tales como la estabilidad y unión a un antígeno mediante el uso de ensayos conocidos y ensayos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos C(X)_yC (**sec. con núm. de ident.: 23**), en donde X es glicina (Gly), serina (Ser), prolina (Pro), alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), 15 ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptófano (Trp) o tirosina (Tyr), e y es un entero de 1 a 3. Pro puede incluirse en el enlazador para proporcionar rigidez. Gly puede incluirse en el enlazador para permitir la máxima flexibilidad. También puede usarse cualquier otro aminoácido en el L excepto Cys y Met.

20 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos C(X)_yC (**sec. con núm. de ident.: 24**), en donde X es Gly, Ser o Pro, e y es un entero de 1 a 3.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CPC, CGC, CSC, CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**), CGPC (**sec. con núm. de ident.: 28**),

CPGC (**sec. con núm. de ident.: 29**), CGGC (**sec. con núm. de ident.: 30**), CSPG (**sec. con núm. de ident.: 31**), CPSC (**sec. con núm. de ident.: 32**), CSSC (**sec. con núm. de ident.: 33**), CGSC (**sec. con núm. de ident.: 34**), CSGC (**sec. con núm. de ident.: 35**), CPPPC (**sec. con núm. de ident.: 36**), CGPPC (**sec. con núm. de ident.: 37**), CPGPC (**sec. con núm. de ident.: 38**), CPPGC (**sec. con núm. de ident.: 39**), CGGPC (**sec. con núm. de ident.: 40**), CPGGC (**sec. con núm. de ident.: 41**), CGGGC (**sec. con núm. de ident.: 42**), CSPPC (**sec. con núm. de ident.: 43**), CPSPC (**sec. con núm. de ident.: 44**), CPPSC (**sec. con núm. de ident.: 45**), CSSPC (**sec. con núm. de ident.: 46**), CPSSC (**sec. con núm. de ident.: 47**), CSSSC (**sec. con núm. de ident.: 48**), CGSPC (**sec. con núm. de ident.: 49**), CPGSC (**sec. con núm. de ident.: 50**), CSGPC (**sec. con núm. de ident.: 51**) o CPSGC (**sec. con núm. de ident.: 52**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CPC.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CGC.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CSC.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CGPC (**sec. con núm. de ident.: 28**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CPGC (**sec. con núm. de ident.: 29**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CGGC (**sec. con núm. de ident.: 30**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CSPG (**sec. con núm. de ident.: 31**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPSC (**sec. con núm. de ident.: 32**).

5 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CSSC (**sec. con núm. de ident.: 33**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CGSC (**sec. con núm. de ident.: 34**).

10 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CSGC (**sec. con núm. de ident.: 35**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPPPC (**sec. con núm. de ident.: 36**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CGPPC (**sec. con núm. de ident.: 37**).

15 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPGPC (**sec. con núm. de ident.: 38**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPPGC (**sec. con núm. de ident.: 39**).

20 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CGGPC (**sec. con núm. de ident.: 40**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPGGC (**sec. con núm. de ident.: 41**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CGGGC (**sec. con núm. de ident.: 42**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CSPPC (**sec. con núm. de ident.: 43**).

5 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPSPC (**sec. con núm. de ident.: 44**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPPSC (**sec. con núm. de ident.: 45**).

10 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CSSPC (**sec. con núm. de ident.: 46**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPSSC (**sec. con núm. de ident.: 47**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CSSSC (**sec. con núm. de ident.: 48**).

15 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CGSPC (**sec. con núm. de ident.: 49**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPGSC (**sec. con núm. de ident.: 50**).

20 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CSGPC (**sec. con núm. de ident.: 51**).

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos
CPSGC (**sec. con núm. de ident.: 52**).

En algunas modalidades, el L comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 19 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 14 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 15 aminoácidos.

5 En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 16 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 17 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 18 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 19 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos

10 $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 25**), en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, leu, Lys, Phe Thr, Trp o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos

15 $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 26**), en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos

$(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 27**); en donde X es Gly o Pro, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

20 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la **sec. con núm. de ident.: 2**.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 3.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 4.

5 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 5.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 6.

10 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 7.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción está en la orientación VL-
 L-VH.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción está en la orientación
 VH-L-VL.

15 La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y
 una VL, en donde
 la VH comprende Cys en H105;
 la VL comprende Cys en L42;
 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,
 20 4, 5, 6 o 7; y
 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y
 una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

- 5 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L39;

- 10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 15 la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

- 20 La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

5 una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L42;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

5 la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

10 una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L102;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L5;

5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

10 la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

15 La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L100;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

- 5 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L5;

- 10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 15 la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

- 20 La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

5 una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L5;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona un scFv que comprende una VH, un L y

una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 3.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
 5 **sec. con núm. de ident.: 4.**

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 5.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 6.

10 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 7.

Moléculas heterólogas que comprenden el spFv de la descripción

El spFv de la descripción puede conjugarse con una segunda molécula
 similarmente al scFv no estabilizado desprovisto de enlaces disulfuro como se conoce
 15 en la técnica. Las segundas moléculas ilustrativas se describen en la presente
 descripción e incluyen entidades de extensión de vida media, agentes de imágenes,
 agentes terapéuticos, anticuerpos que comprenden diversos formatos de anticuerpos
 y fragmentos de estos, dominios de unión al antígeno, regiones Fc, cadenas
 pesadas/ligeras de inmunoglobulina o fragmentos de estas, moléculas
 20 multiespecíficas y receptores de antígeno quimérico (CAR).

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que
 comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región

variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende

un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una primera L Cys;

5 un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

10 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende una primera L Cys; la VL comprende una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta
15 en la superficie conservada estructuralmente y la L comprende una segunda L Cys; o la VH comprende la VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente, la VL comprende la VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende la primera L Cys y la segunda L Cys, en donde la
20 VH Cys y la primera L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro y la VL Cys y la segunda L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro.

En algunas modalidades, la distancia entre la VH Cys y la VL Cys es de aproximadamente 7 Å a aproximadamente 9 Å.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3, H5, H40, H43, H46 o H105, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

En algunas modalidades, la VL Cys está en L3, L5, L39, L42, L45, L100 o L102, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

5 En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L39.

10 En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L102.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L3.

15 En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L100.

20 En algunas modalidades, la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L102.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L102.

5 En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L45.

10 En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L102.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L3.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L39.

15 En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L102.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L3.

20 En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L5.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L39.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L42.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L45.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L100.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L102.

La numeración de residuos de las regiones de VH y VL está de acuerdo con Chothia.

- 5 En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos contiguos derivada de una región bisagra de la inmunoglobulina (Ig).

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig se deriva de una región bisagra de la Ig humana o no humana. Las regiones bisagra de la Ig no humana ilustrativas son las de ratón, rata, pollo y primates no humanos, tal como monos.

- 10 En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig se deriva de la región bisagra de la Ig humana.

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig humana es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA o IgE.

- 15 En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos $C(X)_yC$ (**sec. con núm. de ident.: 23**), en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp o Tyr e y es un entero de 1 a 3. Pro puede incluirse en el enlazador para proporcionar rigidez. Gly puede incluirse en el enlazador para permitir la máxima flexibilidad. También puede usarse cualquier otro aminoácido en el L excepto Cys y Met.

- 20 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $C(X)_yC$ (**sec. con núm. de ident.: 24**), en donde X es Gly, Ser o Pro, e y es un entero de 1 a 3.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CPC, CGC, CSC, CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**), CGPC (**sec. con núm. de ident.: 28**),

CPGC (**sec. con núm. de ident.: 29**), CGGC (**sec. con núm. de ident.: 30**), CSPG (**sec. con núm. de ident.: 31**), CPSC (**sec. con núm. de ident.: 32**), CSSC (**sec. con núm. de ident.: 33**), CGSC (**sec. con núm. de ident.: 34**), CSGC (**sec. con núm. de ident.: 35**), CPPPC (**sec. con núm. de ident.: 36**), CGPPC (**sec. con núm. de ident.: 37**), CPGPC
 5 (**sec. con núm. de ident.: 38**), CPPGC (**sec. con núm. de ident.: 39**), CGGPC (**sec. con núm. de ident.: 40**), CPGGC (**sec. con núm. de ident.: 41**), CGGGC (**sec. con núm. de ident.: 42**), CSPPC (**sec. con núm. de ident.: 43**), CPSPC (**sec. con núm. de ident.: 44**), CPPSC (**sec. con núm. de ident.: 45**), CSSPC (**sec. con núm. de ident.: 46**), CPSSC (**sec. con núm. de ident.: 47**), CSSSC (**sec. con núm. de ident.: 48**), CGSPC
 10 (**sec. con núm. de ident.: 49**), CPGSC (**sec. con núm. de ident.: 50**), CSGPC (**sec. con núm. de ident.: 51**) o CPSGC (**sec. con núm. de ident.: 52**).

En algunas modalidades, el L comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 19 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 14 aminoácidos.

15 En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 15 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 16 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 17 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 18 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende aproximadamente 19 aminoácidos.

20 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos

$(X)_m C(X)_y C(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 25**); en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, leu, Lys, Phe Thr, Trp o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 26**); en donde X es Gly, Ser o Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

- 5 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 27**); en donde X es Gly o Pro, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

- 10 En algunas modalidades, el spFv de la descripción está en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción está en la orientación VH-L-VL.

- La descripción también proporciona una molécula heteróloga que
- 15 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde
- la VH comprende Cys en H105;
- la VL comprende Cys en L42;
- el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
- 20 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

5 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

10 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

15 la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

20 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

5 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L42;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H3;

5 la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

10 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L102;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H43; la VL comprende Cys en L5;

- 5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 10 la VH comprende Cys en H43; la VL comprende Cys en L3; el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y el scFv está en la orientación VH-L-VL.

15 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H40; la VL comprende Cys en L100;

- 20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

- 5 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L5;

- 10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 15 la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

- 20 La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

5 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L5;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 3.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
 5 **sec. con núm. de ident.: 4.**

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 5.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 6.

10 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 7.

En algunas modalidades, el scFv de la descripción se conjuga con una
 segunda proteína, un polinucleótido, un agente terapéutico, un agente citotóxico o
 una etiqueta detectable.

15 En algunas modalidades, la segunda proteína es una entidad que extiende la
 vida media.

En algunas modalidades, la segunda proteína es un anticuerpo o un
 fragmento de este.

En algunas modalidades, la segunda proteína es un fragmento de unión al
 20 antígeno.

En algunas modalidades, la segunda proteína es una molécula terapéutica.

**Moléculas heterólogas que comprenden el spFv de la descripción y entidad que
 extiende la vida media**

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con una entidad que extiende la vida media.

Las entidades que extienden la vida media ilustrativas son una inmunoglobulina (Ig), un fragmento de la Ig, una región constante de la Ig, un fragmento de la región constante de la Ig, una región Fc, transferrina, albúmina, variantes de albúmina, un dominio de unión a albúmina o polietilenglicol. Las secuencias de aminoácidos de la Ig humana son muy conocidas e incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con la Ig o el fragmento de la Ig.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con la región Fc.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con transferrina.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con albúmina.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con proteína de unión a albúmina.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con polietilenglicol (PEG). Las moléculas de PEG ilustrativas son PEG5000 o PEG20.000.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con un ácido graso o éster de ácido graso. Los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos ilustrativos son laurato, miristato, estearato, araquidato, behenato, oleato, araquidonato, ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico, y lo similar, polilisina, octano, carbohidratos (dextrano, celulosa, oligo o polisacáridos) para las propiedades deseadas.

La entidad que extiende la vida media puede ser una fusión directa con el spFv de la descripción y puede generarse por técnicas de clonación y expresión estándar. Alternativamente, puede usarse métodos conocidos de acoplamiento químico para unir las entidades a spFv producidos recombinantemente de la invención.

5 **Moléculas heterólogas que comprenden el spFv de la descripción y un agente citotóxico o una etiqueta detectable**

La descripción también proporciona una molécula heteróloga que comprende el spFv de la descripción, en donde el spFv de la descripción se conjuga con una segunda proteína, un polinucleótido, un agente terapéutico, un agente
10 citotóxico o una etiqueta detectable.

La molécula heteróloga que comprende el spFv de la descripción puede usarse para dirigir la terapéutica, mediar la destrucción, visualizar, identificar o purificar células que expresan el antígeno al que se une el spFv, *in vitro* o *in vivo*.

En algunas modalidades, la etiqueta detectable es, además, un agente citotóxico.

15 La etiqueta detectable incluye composiciones que, cuando se conjugan con el spFv de la descripción, hacen que este último sea detectable, a través de medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

Los marcadores detectables ilustrativos incluyen isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, tintes fluorescentes, reactivos
20 densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usa comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, haptenos, moléculas luminiscentes, moléculas quimioluminiscentes, fluorocromos, fluoróforos, agentes de extinción fluorescentes, moléculas coloreadas, isótopos radiactivos, centelleos, avidina, estreptavidina, proteína

A, proteína G, anticuerpos o fragmentos de estos, polihistidina, Ni^{2+} , etiquetas Flag, etiquetas myc, metales pesados, enzimas, fosfatasa alcalina, peroxidasa, luciferasa, donantes/aceptores de electrones, ésteres de acridinio y sustratos colorimétricos.

Un marcador detectable puede emitir una señal de forma espontánea, tal como
 5 cuando el marcador detectable es un isótopo radiactivo. En otros casos, el marcador detectable emite una señal como resultado de ser estimulado mediante un campo externo.

Los isótopos radiactivos ilustrativos pueden ser isótopos radiactivos emisores de γ , emisores de Auger, emisores de β , emisores alfa o emisores de positrones. Los isótopos radiactivos ilustrativos incluyen ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{19}F ,
 10 ^{55}Co , ^{57}Co , ^{60}Co , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{75}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Sr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{115}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{226}Ra , ^{225}Ac y ^{227}Ac .

Los átomos de metales ilustrativos son metales con un número atómico mayor que 20, tales como átomos de calcio, escandio, titanio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, galio, germanio, arsénico, selenio, bromo, kriptón,
 15 rubidio, estroncio, itrio, zirconio, niobio, molibdeno, tecnecio, rutenio, rodio, paladio, plata, cadmio, indio, estaño, antimonio, telurio, yodo, xenón, cesio, bario, lantano, hafnio, tántalo, tungsteno, renio, osmio, iridio, platino, oro, mercurio, talio, plomo, bismuto, francio, radio, actinio, cerio, praseodimia, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio, lutecio, torio, protactinio, uranio, neptunio, plutonio,
 20 americio, curio, berkelio, californio, einstenio, fermio, mendelevio, nobelio o laurencio.

En algunas modalidades, los átomos de metal pueden ser metales alcalinotérreos con un número atómico mayor que veinte.

En algunas modalidades, los átomos de metal pueden ser lantánidos.

En algunas modalidades, los átomos de metal pueden ser actínidos.

En algunas modalidades, los átomos de metal pueden ser metales de transición.

En algunas modalidades, los átomos de metal pueden ser metales pobres.

En algunas modalidades, los átomos de metal pueden ser átomos de oro,

5 átomos de bismuto, átomos de tántalo y átomos de gadolinio.

En algunas modalidades, los átomos de metal pueden ser metales con un número atómico de 53 (es decir, yodo) a 83 (es decir, bismuto).

En algunas modalidades, los átomos de metal pueden ser átomos adecuados para la formación de imágenes por resonancia magnética.

10 Los átomos de metal pueden ser iones de metal en la forma de estados de oxidación +1, +2, o +3, tales como Ba^{2+} , Bi^{3+} , Cs^+ , Ca^{2+} , Cr^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Co^{2+} , Co^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Ga^{3+} , Gd^{3+} , Au^+ , Au^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , F^{3+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{4+} , Mn^{7+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Ni^{3+} , Ag^+ , Sr^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , y Zn^{2+} . Los átomos de metal pueden comprender un óxido metálico, tal como óxido de hierro, óxido de manganeso u óxido de gadolinio.

15 Los colorantes adecuados incluyen cualquier colorante disponible comercialmente tal como, por ejemplo, 5(6)-carboxifluoresceína, IRDye 680RD maleimida o IRDye 800CW, colorantes de polipiridilo de rutenio y lo similar.

Los fluoróforos adecuados son isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), tiosemicarbazida de fluoresceína, rodamina, Rojo Texas, CyDyes (p. ej., Cy3, Cy5, Cy5.5), Alexa Fluors (p. ej., Alexa488, Alexa555, alexa594; Alexa647), tintes fluorescentes de infrarrojo cercano (NIR) (700-900 nm) y tintes de carbocianina y aminostirilo.

20

La molécula heteróloga que comprende el scFv de la descripción conjugado con una etiqueta detectable puede usarse como un agente de formación de imágenes.

En algunas modalidades, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico, una droga, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (p. ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

En algunas modalidades, el agente citotóxico es daunomicina, doxorubicina, metotrexato, vindesina, toxinas bacterianas tales como toxina de difteria, ricina, geldanamicina, maitansinoides o caliqueamicina. El agente citotóxico puede provocar sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a la tubulina, la unión al ADN o la inhibición de la topoisomerasa.

En algunas modalidades, el agente citotóxico es una toxina enzimáticamente activa tal como la cadena A de difteria, los fragmentos activos sin capacidad de unión de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de arbina, la cadena A de modicina, alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), el inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, la gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

En algunas modalidades, el agente citotóxico es un radionúclido, tal como ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re .

En algunas modalidades, el agente citotóxico es dolastatinas o análogos peptídicos de dolostatina y derivados, auristatina o monometil auristatina fenilalanina.

Las moléculas ilustrativas se describen en las patentes de los EE. UU. núms.

5.635.483 y 5.780.588. Las dolastatinas y auristatinas han demostrado interferir con la dinámica microtubular, hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular y tener

actividad anticáncer y antifúngica. La entidad de la droga dolastatina o auristatina se

5 puede acoplar al anticuerpo de la invención a través del N (amino) terminal o el C (carboxil) terminal de la entidad de la droga peptídica (ver, p. ej., WO02/088172), o mediante cualquier cisteína modificada en una proteína

La conjugación con una etiqueta detectable puede realizarse mediante el uso de métodos conocidos.

10 En algunas modalidades, el marcador detectable forma un complejo con un agente quelante.

En algunas modalidades, la etiqueta detectable se conjuga con el spFv de la descripción a través de un enlazador.

La etiqueta detectable o la entidad citotóxica pueden enlazarse directa, o
15 indirectamente, al spFv de la descripción mediante el uso de métodos conocidos. Los enlazadores adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos prostéticos, enlazadores no fenólicos (derivados de N-succimidilbenzoatos; dodecaborato), entidades quelantes de quelantes macrocíclicos y acíclicos, tales como derivados de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10,tetraacético (DOTA),
20 derivados de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido S-2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7-triazaciclononon-1,4,7-triacético (NOTA) y derivados de ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA), N-succinimidil-3- (2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres

(tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis- (p-diazoniobenzoil) -etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno) y otras entidades quelantes. Los enlazadores peptídicos adecuados son bastante conocidos.

Moléculas heterólogas que comprenden el spFv de la descripción y región constante de la inmunoglobulina (Ig) o fragmentos de esta

El spFv de la descripción puede conjugarse con una región constante de la Ig o un fragmento de la región constante de la Ig para impartir propiedades de tipo anticuerpo, que incluyen funciones efectoras de Fc, unión a C1q, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis o regulación negativa de receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de células B; BCR). La región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig funcionan también como una entidad que extiende la vida media como se describe en la presente descripción. El spFv de la descripción también puede modificarse en anticuerpos completos por métodos estándar. Los anticuerpos completos que comprenden el spFv de la descripción pueden modificarse adicionalmente como se describe en la presente descripción.

La región constante de cadena pesada de la inmunoglobulina está compuesta por subdominios CH1, bisagra, CH2 y CH3. El dominio CH1 abarca los residuos 118-215, los residuos del dominio CH2 231-340 y los residuos del dominio CH3 341-447 en la cadena pesada, la numeración de residuos está de acuerdo con el Índice EU. En algunos

casos el residuo 341 se menciona como un residuo del dominio CH2. La bisagra generalmente se define como que incluye el residuo 216 y termina en 230 de la IgG1 humana, pero también puede incluir una región bisagra inferior de aproximadamente el residuo 231 a aproximadamente el residuo 237 como se describe en la presente descripción. La región Fc de la Ig comprende al menos los dominios CH2 y CH3 de la región constante de la Ig, y por lo tanto comprende al menos una región de aproximadamente 231 a 447 de la región constante de cadena pesada de la Ig.

La invención también proporciona un spFv de la descripción conjugado con una región constante de la inmunoglobulina (Ig) o un fragmento de la región constante de la Ig.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig es una región constante de cadena pesada

En algunas modalidades, la región constante de la Ig es una región constante de cadena ligera.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende una región Fc.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende un dominio CH2.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende un dominio CH3.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende el dominio CH2 y el dominio CH3.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una porción de una bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. Porción de la bisagra se refiere a uno o más residuos de aminoácidos de la bisagra de la Ig.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig
5 comprende la bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con el N-terminal de la región constante de la Ig o con el fragmento de la región constante de la Ig.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con el C-terminal de la región constante de la Ig o con el fragmento de la región constante de la Ig.

10 El spFv de la descripción conjugado con la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig pueden evaluarse para determinar su funcionalidad mediante varios ensayos conocidos. La unión al antígeno objetivo puede evaluarse por métodos descritos en la presente descripción. Las propiedades alteradas impartidas por el dominio constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la
15 Ig tal como la región Fc pueden evaluarse en ensayos de unión al receptor Fc con el uso de formas solubles de los receptores, tales como FcγRI, FcγRII, FcγRIII o FcRn, o con ensayos basados en células que miden, por ejemplo, la ADCC, CDC o ADCP.

La ADCC puede ensayarse con el uso de un ensayo *in vitro* con células que expresan el antígeno al cual se une el spFv de la descripción como células diana y células
20 NK como células efectoras. La citólisis puede detectarse por la liberación de la etiqueta (p. ej., sustratos radioactivos, tintes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. En un ensayo ilustrativo, se usan células diana con una relación de 1 célula diana a 4 células efectoras. Las células objetivo se etiquetan previamente con

BATDA y se combinan con células efectoras y el anticuerpo de prueba. Las muestras se incuban durante 2 horas y la lisis celular medida mediante la medición de BATDA liberada en el sobrenadante. Los datos se normalizan a la citotoxicidad máxima con 0,67 % de Triton X-100 (Sigma Aldrich) y el control mínimo se determina por la liberación espontánea de BATDA a partir de las células objetivo en ausencia de cualquier anticuerpo.

La ADCP puede evaluarse mediante el uso de macrófagos derivados de monocitos como células efectoras y cualquier célula que expresa el antígeno al cual se une el spFv de la descripción como células diana que se modifican para expresar GFP u otra molécula marcada. En un ensayo ilustrativo, la relación de célula efectora:objetivo puede ser, por ejemplo, 4:1. Las células efectoras pueden incubarse con células objetivo durante 4 horas con o sin el anticuerpo de la invención. Después de la incubación, las células pueden desprenderse mediante el uso de Accutase. Los macrófagos pueden identificarse con anticuerpos anti-CD11b y anti-CD14 acoplados a un marcador fluorescente, y el porcentaje de fagocitosis puede determinarse basado en el % de fluorescencia GFP en los macrófagos CD11⁺CD14⁺ mediante el uso de métodos estándar.

La CDC de células puede medirse, por ejemplo, mediante la siembra en placas de células Daudi a 1×10^5 células/pocillo (50 μ l/pocillo) en RPMI-B (RPMI complementado con BSA al 1 %), la adición de 50 μ l de proteína de prueba a los pocillos a una concentración final entre 0-100 μ g/ml, la incubación de la reacción durante 15 min a temperatura ambiente, la adición de 11 μ l de mezcla de suero humano agrupado a los pocillos y la incubación de la reacción durante 45 min a 37 °C. El porcentaje (%) de células lisadas puede detectarse como % de células teñidas con yoduro de propidio en ensayo de FACS mediante el uso de métodos estándar.

Moléculas heterólogas que comprenden el spFv de la descripción y un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un fragmento de este

El spFv de la descripción puede conjugarse con un receptor de antígeno quimérico (CAR) o con un fragmento del CAR. El CAR que comprende el spFv de la descripción puede ser, por lo tanto, monoespecífico o multiespecífico, que comprende, como su dominio extracelular, una o más moléculas de scFv de la descripción.

Los receptores antígenos quiméricos (CAR) son receptores modificados genéticamente. Estos receptores modificados fácilmente pueden insertarse y expresarse mediante células inmunes, que incluye células T de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Con un CAR, puede programarse un único receptor para reconocer un antígeno específico y, cuando se une a ese antígeno, activar la célula inmunitaria para atacar y destruir la célula que lleva ese antígeno. Cuando estos antígenos existen en células diana, una célula inmunitaria que expresa el CAR puede atacar y destruir la célula diana.

El CAR típicamente comprende un dominio extracelular que se une al antígeno y un enlazador opcional, un dominio transmembrana y un dominio citosólico que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización.

El dominio extracelular del CAR puede contener cualquier polipéptido que se une a específicamente al antígeno deseado, tal como el scFv de la descripción. Los CAR también pueden modificarse para unirse a dos o más antígenos deseados que pueden disponerse en tándem y separados por secuencias de enlazador. Por ejemplo, uno o más scFv de la descripción, anticuerpos de dominio, anticuerpos VHH de llama u otros fragmentos de anticuerpo de VH solamente pueden organizarse en tándem por medio de un enlazador para generar CAR biespecíficos o multiespecíficos.

El dominio transmembrana de CAR puede derivarse del dominio transmembrana de CD8, una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de célula T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), 4-1 BBL, GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD119, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alpha, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD118, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, y/o NKG2C.

El dominio coestimulador intracelular de CAR puede derivarse de los dominios intracelulares de una o más moléculas coestimuladoras. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de superficie celular bastante conocidas distintas de los receptores de antígenos o receptores de Fc que proporcionan una segunda señal requerida para la activación y función eficaces de los linfocitos T tras la unión al antígeno. Los dominios coestimuladores ilustrativos que pueden usarse en los CAR son dominios intracelulares de 4-1BB, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70.

El dominio de señalización intracelular de CAR puede derivarse de los dominios de señalización de, por ejemplo, CD3ζ, CD3ε, CD22, CD79a, CD66d o

CD39. “**Dominio intracelular de señalización**” se refiere a la parte del polipéptido de un CAR que participa en la transducción del mensaje de la unión eficaz del CAR a un antígeno objetivo en el interior de la célula efectora inmunitaria para desencadenar la función de la célula efectora, p. ej., activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, que incluye la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida al CAR, u otras respuestas celulares desencadenadas después de la unión del antígeno al dominio extracelular del CAR.

El enlazador opcional dentro del CAR ubicado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana puede ser un polipéptido de aproximadamente 2 a 100 aminoácidos de longitud. El enlazador puede incluir o estar compuesto por residuos flexibles tales como glicina y serina, de tal manera que los dominios proteicos adyacentes están libres de moverse entre sí. Pueden usarse enlazadores más largos cuando sea deseable para asegurar que dos dominios adyacentes no interfieran estéricamente entre sí. Los enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los enlazadores escindibles ilustrativos incluyen 2A.

Un CAR ilustrativo comprende el scFv de la descripción, el dominio transmembrana de CD8 y el dominio de señalización de CD3ζ. Otros CAR ilustrativos comprenden el scFv de la descripción, dominio transmembrana CD8 o CD28, dominio coestimulador CD28, 41BB o OX40 y dominio de señalización CD3ζ.

Los CAR se generan mediante técnicas estándar de biología molecular.

El spFv de la descripción puede conjugarse directamente con la segunda molécula o a través de un enlazador. Los enlazadores ilustrativos incluyen porciones del área bisagra de inmunoglobulina, CL o CH1 derivados de cualquier isotipo de cadena

pesada o ligera de inmunoglobulina, enlazadores ricos en Gly, enlazadores que contienen Gly y Ser, enlazadores que contienen Gly u Ala, enlazadores que contienen Ala y Ser y enlazadores que contienen Pro. Los aminoácidos ilustrativos que pueden incluirse en el enlazador son Gly, Ser Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu y His.

- 5 Alternativamente, como enlazadores puede usarse una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Se describen enlazadores ilustrativos, por ejemplo, en la publicación de patente internacional núm. WO2019/060695.

En algunas modalidades, la molécula heteróloga es monoespecífica.

- 10 En algunas modalidades, la molécula heteróloga es multiespecífica.

En algunas modalidades, la molécula heteróloga es biespecífica.

En algunas modalidades, la molécula heteróloga es triespecífica.

En algunas modalidades, la molécula heteróloga es tetraespecífica.

Moléculas multiespecíficas que comprenden el spFv de la descripción

- 15 La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH), un enlazador (L) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde el scFv comprende
- un primer enlace disulfuro entre una VH cisteína (Cys) expuesta en la superficie
- 20 conservada estructuralmente y una primera L Cys;
- un segundo enlace disulfuro entre una VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y una segunda L Cys; o

el primer enlace disulfuro entre la VH Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la primera L Cys y el segundo enlace disulfuro entre la VL Cys expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la segunda L Cys.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

- 5 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde
la VH comprende una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende una primera L Cys;
la VL comprende una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y la L comprende una segunda L Cys; o
10 la VH comprende la VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente, la VL comprende la VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente y el L comprende la primera L Cys y la segunda L Cys, en donde la VH Cys y la primera L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro y la VL Cys y la
15 segunda L Cys son capaces de formar un enlace disulfuro.

En algunas modalidades, la distancia entre la VH Cys y la VL Cys es de aproximadamente 7 Å a aproximadamente 9 Å.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3, H5, H40, H43, H46 o H105, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

- 20 En algunas modalidades, la VL Cys está en L3, L5, L39, L42, L45, L100 o L102, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

En algunas modalidades,
la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L42;

- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L100;
- la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L3;
- la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L5;
- la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L39;
- 5 la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L42;
- la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L45;
- la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L100;
- la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L102;
- la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L3;
- 10 la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L5;
- la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L39;
- la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L42;
- la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L45;
- la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L100;
- 15 la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L102;
- la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L3;
- la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L5;
- la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L39;
- la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L42;
- 20 la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L45;
- la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L100;
- la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L102;
- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L3;

- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L5;
- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L39;
- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L42;
- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L45;
- 5 la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L102;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L3;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L5;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L39;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L42;
- 10 la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L45;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L100;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L102;
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L3;
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L5;
- 15 la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L39;
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L45;
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L100; o
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L102;

en la presente descripción la numeración de residuos de acuerdo con Chothia.

- 20 En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos contiguos derivada de una región bisagra de la inmunoglobulina (Ig).

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig se deriva de una región bisagra de la Ig humana o no humana.

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig se deriva de la región bisagra de la Ig humana.

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig humana es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

- 5 En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos $C(X)_yC$ (**sec. con núm. de ident.: 23**), en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp o Tyr e y es un entero de 1 a 3.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $C(X)_yC$ (**sec. con núm. de ident.: 24**), en donde X es Gly, Ser o Pro, e y es un entero de 1 a 3.

- 10 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CPC, CGC, CSC, CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**), CGPC (**sec. con núm. de ident.: 28**), CPGC (**sec. con núm. de ident.: 29**), CGGC (**sec. con núm. de ident.: 30**), CSPG (**sec. con núm. de ident.: 31**), CPSC (**sec. con núm. de ident.: 32**), CSSC (**sec. con núm. de ident.: 33**), CGSC (**sec. con núm. de ident.: 34**), CSGC (**sec. con núm. de ident.: 35**),
- 15 CPPPC (**sec. con núm. de ident.: 36**), CGPPC (**sec. con núm. de ident.: 37**), CPGPC (**sec. con núm. de ident.: 38**), CPPGC (**sec. con núm. de ident.: 39**), CGGPC (**sec. con núm. de ident.: 40**), CPGGC (**sec. con núm. de ident.: 41**), CGGGC (**sec. con núm. de ident.: 42**), CSPPC (**sec. con núm. de ident.: 43**), CPSPC (**sec. con núm. de ident.: 44**), CPPSC (**sec. con núm. de ident.: 45**), CSSPC (**sec. con núm. de ident.: 46**),
- 20 CPSSC (**sec. con núm. de ident.: 47**), CSSSC (**sec. con núm. de ident.: 48**), CGSPC (**sec. con núm. de ident.: 49**), CPGSC (**sec. con núm. de ident.: 50**), CSGPC (**sec. con núm. de ident.: 51**) o CPSGC (**sec. con núm. de ident.: 52**).

En algunas modalidades, el L comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 19 aminoácidos, tal como aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18 o aproximadamente 19 aminoácidos.

- 5 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 25**); en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, leu, Lys, Phe Thr, Trp o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

- 10 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 26**); en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

- 15 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 27**); en donde X es Gly o Pro, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción está en la orientación VL-L-VH.

- 20 En algunas modalidades, el spFv de la descripción está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

- 5 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L45;

- 10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 15 la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

- 20 La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

5 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L39;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H3;

5 la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

10 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L100;

20 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L102;

5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

10 la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

15 La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

20 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

- 5 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L102;

- 10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

- 15 la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

- 20 La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

5 comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L102;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que

comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde

20 la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

La descripción también proporciona una molécula multiespecífica que comprende un scFv que comprende una VH, un L y una VL, en donde la VH comprende Cys en H46;

5 la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la
10 **sec. con núm. de ident.: 3.**

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la **sec. con núm. de ident.: 6.**

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la **sec. con núm. de ident.: 7.**

15 En algunas modalidades, la molécula multiespecífica comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En algunas modalidades, la proteína multiespecífica comprende una región constante de la Ig o un fragmento de la región constante de la Ig.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig comprende una región Fc.

20 En algunas modalidades, la región constante de la Ig comprende un dominio CH2.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende un dominio CH3.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende el dominio CH2 y el dominio CH3.

En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una porción de una bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3.

5 En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende la bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con el N-terminal de la región constante de la Ig o con el N-terminal del fragmento de la región constante de la Ig.

10 En algunas modalidades, el spFv de la descripción se conjuga con el C-terminal de la región constante de la Ig o con el C-terminal del fragmento de la región constante de la Ig.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig es un isotipo IgG1, IgG2, e IgG3 o IgG4.

15 En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una mutación que resulta en la unión reducida de la molécula multiespecífica al FcγR.

En algunas modalidades, la al menos una mutación que resulta en la unión reducida de la molécula multiespecífica a FcγR se selecciona del grupo que consiste en

20 F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/

P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A,

V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-

suprimida/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F,

L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S y S228P/F234A/L235A/G236-suprimida/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos está de acuerdo con el índice EU.

5 En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una mutación que resulta en la unión potenciada de la molécula multiespecífica al FcγR.

En algunas modalidades, la al menos una mutación que resulta en la unión potenciada de la molécula multiespecífica al FcγR se selecciona del grupo que consiste
10 en S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L y G236A/S239D/I332E, en donde la numeración de residuos está de acuerdo con el Índice EU.

En algunas modalidades, FcγR es FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIII.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o fragmento de la
15 región constante de la Ig comprende al menos una mutación que modula una vida media de la molécula multiespecífica.

En algunas modalidades, la al menos una mutación que modula la vida media de la molécula multiespecífica se selecciona del grupo que consiste en H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A y
20 H435R, en donde la numeración de residuos está de acuerdo con el Índice EU.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una mutación en el dominio CH3.

En algunas modalidades, la al menos una mutación en el dominio CH3 se selecciona del grupo que consiste en T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V y T350V/T366L/K392L/T394W, en donde la numeración de residuos está de acuerdo con el Índice EU.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica es biespecífica.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica es trispecífica.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica es tetraespecífica.

5.2 Generación de proteínas multiespecíficas que comprenden el spFv de la descripción

El spFv de la descripción puede modificarse a moléculas multiespecíficas de cualquier formato conocido mediante el uso de tecnologías recombinantes, expresión y protocolos de purificación conocidos.

El spFv de la descripción puede modificarse en anticuerpos multiespecíficos completos que tienen una o más mutaciones en el dominio CH3 que promueven la estabilidad de las dos medias moléculas. Estos anticuerpos multiespecíficos pueden generarse *in vitro* mediante el uso de intercambio de brazos Fab o mediante la coexpresión de las diversas cadenas. Para el intercambio de brazos Fab *in vitro*, se modifican dos anticuerpos bivalentes monoespecíficos de manera que tengan la una o más sustituciones en el dominio CH3, los anticuerpos se incuban juntos en condiciones de reducción suficiente para permitir que las cisteínas en la región bisagra

experimenten isomerización de enlace disulfuro; lo que genera así el anticuerpo biespecífico por intercambio de brazos Fab. Las condiciones de incubación pueden restaurarse óptimamente a no reductoras. Los agentes reductores ilustrativos que pueden usarse son 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditioneitol y tris(2-carboxietil)fosfina. Por ejemplo, puede usarse una incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de al menos 25 mM de 2-MEA o en presencia de al menos 0,5 mM de ditioneitol a un pH de 5-8, por ejemplo, a un pH de 7,0 o a un pH de 7,4.

Las mutaciones CH3 que pueden usarse incluyen las tecnologías tales como mutaciones “botón en ojal” o Knob-in-Hole (Genentech), mutaciones igualadas electrostáticamente (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), Strand Exchange Engineered Domain (SEEDbody) (EMD Serono), mutaciones Duobody® (Genmab) y otras mutaciones asimétricas (p. ej., Zymeworks).

Las mutaciones botón en ojal se describen, por ejemplo, en la patente núm. WO1996/027011 e incluyen mutaciones en la interfaz de la región CH3 en la que se introduce un aminoácido con una pequeña cadena lateral (ojal) en la primera región CH3 y un aminoácido con una gran cadena lateral (botón) se introduce en la segunda región CH3, lo que da como resultado una interacción preferencial entre la primera región CH3 y la segunda región CH3. Ejemplos de mutaciones de la región CH3 que forman un botón y un ojal son T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S y T366W/T366S_L368A_Y407V.

La formación de heterodímeros de cadena pesada puede promoverse mediante el uso de interacciones electrostáticas mediante la sustitución de residuos cargados positivamente en la primera región CH3 y residuos cargados negativamente en la segunda región CH3 como se describe en US2010/0015133, US2009/0182127, 5 US2010/028637 o US2011/0123532.

Otras mutaciones asimétricas que pueden usarse para promover la heterodimerización de cadenas pesadas son L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, o 10 T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W como se describe en US2012/0149876 o US2013/0195849 (Zymeworks).

Las mutaciones SEEDbody implican la sustitución de residuos de IgG seleccionados con residuos de IgA para promover la heterodimerización de cadena pesada como se describe en US20070287170.

15 Otras mutaciones ilustrativas que pueden usarse son R409D_K370E/D399K_E357K, S354C_T366W/Y349C_T366S_L368A_Y407V, Y349C_T366W/S354C_T366S_L368A_Y407V, T366K/L351D, L351K/Y349E, L351K/Y349D, L351K/L368E, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, K392D/D399K, K392D/E356K, 20 K253E_D282K_K322D/D239K_E240K_K292D, K392D_K409D/D356K_D399K como se describe en las patentes WO2007/147901, WO 2011/143545, WO2013/157954, WO2013/096291 y US2018/0118849.

Las mutaciones Duobody® (Genmab) se describen, por ejemplo, en y
 US2014/0303356 e incluyen mutaciones F405L/K409R, wild-type/F405L_R409K,
 T350I_K370T_F405L/K409R, K370W/K409R, D399AFGHILMNRSTVWY/K409R,
 T366ADEFHILMQVY/K409R, L368ADEGHNRSTVQ/K409AGRH,
 5 D399FHKRQ/K409AGRH, F405IKLSTVW/K409AGRH y Y407LWQ/K409AGRH.

Las estructuras biespecíficas o multiespecíficas adicionales en las cuales
 puede incorporarse el spFv de la descripción incluyen las inmunoglobulinas de dominio
 variable doble (DVD, por sus siglas en inglés) (publ. de pat. int. núm. WO2009/134776;
 Los DVD son anticuerpos de longitud completa que comprenden la cadena pesada que
 10 tiene una estructura VH1-enlazador-VH2-CH y la cadena ligera que tiene la estructura
 VL1-enlazador-VL2-CL; enlazador opcional), estructuras que incluyen diversos dominios
 de dimerización para conectar los dos brazos del anticuerpo con diferentes
 especificidades, tales como cremallera de leucina o dominios de dimerización de
 colágeno (publicación de la patente internacional núm. WO2012/022811, la patente de
 15 los EE. UU. núm. 5,932,448; patente de los EE. UU. núm. 6,833,441), dos o más
 anticuerpos de dominio (dAbs) conjugados juntos, diacuerpos, anticuerpos solo de
 cadena pesada tales como anticuerpos de camélido y anticuerpos de camélido
 modificados, doble orientación (DT)-Ig (GSK/Domantis), anticuerpo dos en uno
 (Genentech), Mabs vinculados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) y CovX-cuerpo
 20 (CovX/Pfizer), biespecífico tipo IgG (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb
 (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche), fusiones ScFv/Fc (Academic
 Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), tecnología
 de orientación de doble afinidad (Fc-DART) (MacroGenics) y doble(ScFv)₂-Fab (Centro

Nacional de Investigación para la Medicina de Anticuerpos-China), doble acción o Bis-Fab (Genentech), bloqueo de expansión (DNL) (ImmunoMedics), bivalente biespecífico (Biotechnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech). Los anticuerpos de dominio basados en ScFv, diacuerpos incluyen, pero no se limitan a, acopladores de células T biespecíficas (BiTE) (Micromet), diacuerpo tándem (Tandab) (Affimed), tecnología de reorientación de doble afinidad (DART) (MacroGenics), diacuerpo de única cadena (Academic), anticuerpos tipo TCR (AIT, ReceptorLogics), fusión a ScFv de albumina de suero humano (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de doble orientación (Ablynx), anticuerpos de dominio solo de cadena pesada de orientación doble.

El scFv de la descripción también puede modificarse en proteína multiespecífica que comprende tres cadenas polipeptídicas. En tales diseños, al menos un dominio de unión al antígeno está en la forma de un scFv de la descripción. Los diseños ilustrativos incluyen (en los cuales “1” indica el primer dominio de unión al antígeno, “2” indica el segundo dominio de unión al antígeno y “3” indica el tercer dominio de unión al antígeno:

Diseño 1: Cadena A) scFv1- CH2-CH3; Cadena B) VL2-CL; Cadena C) VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3

Diseño 2: Cadena A) scFv1- bisagra- CH2-CH3; Cadena B) VL2-CL; Cadena C) VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3

Diseño 3: Cadena A) scFv1- CH1-bisagra- CH2-CH3; Cadena B) VL2-CL; Cadena C) VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3

Diseño 4: Cadena A) CH2-CH3-scFv1; Cadena B) VL2-CL; Cadena C) VH2-CH1-bisagra-CH2-CH3

En los Diseños 1-4 puede incorporarse la modificación de CH₃, tal como las mutaciones L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F o

- 5 T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W como se describe en US2012/0149876 o US2013/0195849 (Zymeworks).

5.3 Modificación de isotipos, alotipos y Fc

- La región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig, tal como la región Fc presente en las moléculas multiespecíficas o en las moléculas heterólogas de la descripción puede ser de cualquier alotipo o isotipo.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig es un isotipo de IgG1.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig es un isotipo de IgG2.

- 15 En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig es un isotipo de IgG3.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig es un isotipo de IgG4.

- 20 La región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig puede ser de cualquier alotipo. Se espera que el alotipo no tenga influencia en las propiedades de la región constante de la Ig, tales como las funciones de unión o efectoras mediadas por Fc. La inmunogenicidad de proteínas terapéuticas que comprenden regiones constantes de la Ig o fragmentos de estas se asocia con un

mayor riesgo de reacciones de infusión y una disminución en la duración de la respuesta terapéutica (Baert *et al.*, (2003) *N Engl J Med* 348:602-608). El grado al que las proteínas terapéuticas que comprenden regiones constantes de la Ig o fragmentos de estas inducen una respuesta inmunitaria en el huésped puede determinarse en parte por el alotipo de la región constante de la Ig (Stickler *et al.*, (2011) *Genes and Immunity* 12:213-221). El alotipo de la región constante de la Ig se relaciona con variaciones de la secuencia de aminoácidos en lugares específicos en las secuencias de la región constante del anticuerpo. La **Tabla 3** muestra los alotipos IgG1, IgG2 e IgG4 seleccionados.

Tabla 3.

Alotipo	Residuo de aminoácido en posición de diversidad (numeración de residuos: índice UE)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17.1)					K	D	L	A

La lisina C-terminal (CTL, por sus siglas en inglés) puede eliminarse de la región constante de la Ig mediante carboxipeptidasas circulantes endógenas en el torrente sanguíneo (Cai *et al.*, (2011) *Biotechnol Bioeng* 108:404-412). Durante la fabricación, la eliminación de CTL puede controlarse a menos del nivel máximo mediante el control de la concentración de Zn^{2+} , EDTA o EDTA- Fe^{3+} extracelular, tal

como se describe en la patente de los EE. UU. núm. US2014/0273092. El contenido de CTL de las proteínas puede medirse por métodos conocidos.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción conjugado con la región constante de la Ig tiene un contenido de lisina C-terminal de aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, el contenido de lisina C-terminal es de aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, el contenido de lisina C-terminal es de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el contenido de lisina C-terminal es de aproximadamente 55 % a aproximadamente 70 %. En algunas modalidades, el contenido de lisina C terminal es de aproximadamente 60 %.

Pueden hacerse mutaciones de la región Fc en las moléculas multiespecíficas o moléculas heterólogas de la descripción que comprenden la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig para modular sus funciones efectoras tales como ADCC, ADCP y/o ADCP y/o propiedades farmacocinéticas. Esto se puede lograr mediante la introducción de mutación(es) en el Fc que modula la unión del Fc mutado a FcγRs activadores (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII), FcγRIIb inhibidores y/o a FcRn.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción comprende al menos una mutación en la región constante de la Ig o en el fragmento de la región constante de la Ig.

En algunas modalidades, la al menos una mutación está en la región Fc.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince mutaciones en la región Fc.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción comprende al menos una mutación en la región Fc que modula la unión del anticuerpo a FcRn.

Las posiciones de Fc que pueden mutarse para modular la vida media (p. ej.,
 5 unión a FcRn) incluyen las posiciones 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 y 435. Las mutaciones ilustrativas que pueden realizarse individualmente o en combinación son mutaciones T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A y H435R. Las mutaciones singulares o combinadas ilustrativas que pueden hacerse para aumentar la
 10 vida media son mutaciones M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A y T307A/E380A/N434A. Las mutaciones singulares o combinadas ilustrativas que pueden hacerse para reducir la vida media son mutaciones H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A y H435R.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga
 15 de la descripción comprenden la mutación M252Y/S254T/T256E en la región Fc.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción comprenden al menos una mutación en la región Fc que reduce la unión de la proteína a un receptor de Fcγ activador (FcγR) y/o reduce las funciones efectoras de Fc tales como la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente de
 20 complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o la fagocitosis (ADCP).

Las posiciones de Fc que pueden mutarse para reducir la unión de la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción al FcγR activador y,

posteriormente, reducir la función efectora incluyen las posiciones 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 y 365. Las mutaciones ilustrativas que pueden hacerse en forma individual o combinada son mutaciones K214T, E233P, L234V, L234A, delección de G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, D265S, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S y P331S en IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Las mutaciones combinadas ilustrativas que resultan en la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción con ADCC reducida son mutaciones L234A/L235A en IgG1, L234A/L235A/D265S en IgG1, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S en IgG2, F234A/L235A en IgG4, S228P/F234A/ L235A en IgG4, N297A en todos los isotipos de Ig, V234A/G237A en IgG2, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-suprimida/A327G/P331A/D365E/L358M en IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S en IgG2, S267E/L328F en IgG1, L234F/L235E/D265A en IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S en IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S en IgG4 y S228P/F234A/L235A/G236-suprimida/G237A/P238S en IgG4. Pueden usarse, además, dominios Fc de IgG2/4 híbridos, tales como Fc con residuos 117-260 de IgG2 y residuos 261-447 de IgG4.

La mutación ilustrativa que resulta en la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción con CDC reducida es una mutación K322A.

Puede realizarse una mutación bien conocida S228P en IgG4 para potenciar la estabilidad de IgG4.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción comprende al menos una mutación en la región Fc seleccionada del

grupo que consiste en K214T, E233P, L234V, L234A, deletion of G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S y P331S.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción comprenden la mutación L234A/L235A/D265S en la región Fc.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción comprenden la mutación L234A/L235A en la región Fc.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción comprenden al menos una mutación en la región Fc que potencia la unión de la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción a FcγR y/o potencia las funciones efectoras de Fc tal como la unión tales como la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o la fagocitosis (ADCP).

Las posiciones de Fc que pueden mutarse para aumentar la unión de la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción al FcγR activador y/o potenciar las funciones efectoras de Fc incluyen las posiciones 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 o 430 (numeración de residuos de acuerdo con el Índice EU). Las mutaciones ilustrativas que pueden hacerse en forma individual o combinada son G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305L, K326A, A330K, I332E, E333A, K334A, A339T y P396L. Las mutaciones combinadas ilustrativas que resultan en proteínas con una mayor ADCC o ADCP son S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L y G236A/S239D/I332E.

Las posiciones de Fc que pueden mutarse para potenciar la CDC incluyen las posiciones 267, 268, 324, 326, 333, 345 y 430. Las mutaciones ilustrativas que pueden hacerse en forma individual o combinada son S267E, F1268F, S324T, K326A, K326W, E333A, E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430S, E430F y E430T. Las mutaciones combinadas ilustrativas que resultan en la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción con mayor CDC son K326A/E333A, K326W/E333A, H268F/S324T, S267E/H268F, S267E/S324T y S267E/H268F/S324T.

Las mutaciones específicas descritas en la presente descripción son mutaciones cuando se comparan con las secuencias de aminoácidos silvestres de IgG1, IgG2 y IgG4 de las sec. con núms. de ident.: 66, 67 y 68, respectivamente.

Sec. con núm. de ident.: 66, IgG1 silvestre

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 67; IgG2 silvestre

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR

EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 **Sec. con núm. de ident.: 68; IgG4 silvestre**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEF
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
 10 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

La unión de la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la
 descripción a FcγR o FcRn puede evaluarse en células modificadas para expresar cada
 15 receptor mediante el uso de citometría de flujo. En un ensayo de unión ilustrativo, se
 siembran 2×10^5 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se bloquean en
 amortiguador de tinción de BSA (BD Biosciences, San Jose, USA) durante 30 min a 4 °C.
 Las células se incuban con una molécula multiespecífica de prueba o una molécula
 heteróloga de prueba de la descripción sobre hielo durante 1,5 horas a 4 °C. Después de
 20 lavarlas dos veces con amortiguador de tinción de BSA, las células se incuban con
 anticuerpo secundario IgG anti-humano marcado con R-PE (Jackson ImmunoResearch
 Laboratories) durante 45 min a 4 °C. Las células se lavan dos veces en amortiguador de
 tinción y, después, se resuspenden en 150 µl de amortiguador de tinción que contiene una

dilución 1:200 de tintura para células vivas/muertas DRAQ7 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA). Las señales PE y DRAQ7 de las células teñidas se detectan por medio del citómetro de flujo Miltenyi MACSQuant (Miltenyi Biotec, Auburn, EE. UU.) mediante los canales B2 y B4, respectivamente. Las células vivas dependen de la exclusión DRAQ7 y las señales de fluorescencia de media geométrica se determinan para al menos 10.000 eventos recopilados vivos. El software FlowJo (Tree Star) se usa para el análisis. Los datos se grafican como el logaritmo de la concentración de anticuerpo frente a las señales de fluorescencia promedio. Se realiza un análisis de regresión no lineal.

5.4 Glicomodificación

La capacidad de la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción conjugada con la región constante de la Ig o con el fragmento de la región constante de la Ig para mediar la ADCC puede potenciarse mediante la modificación de la región constante de la Ig o el fragmento del componente oligosacárido de la región constante de la Ig. La IgG1 o IgG3 humanas están N-glicosiladas en la Asn297 con la mayoría de los glicanos en las formas biantenarias bien conocidas G0, G0F, G1, G1F, G2 o G2F. La región constante de la Ig que contiene proteínas puede ser producida por células CHO no modificadas que típicamente tienen un contenido de glicano fucosa de aproximadamente al menos 85 %. La eliminación del núcleo de fucosa de los oligosacáridos de tipo complejo biantenario unidos a la región constante de la Ig o al fragmento de la región constante de la Ig potencia la ADCC de la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción a través de la unión mejorada a FcγRIIIa sin alterar la unión al antígeno o la actividad de CDC. Tales moléculas multiespecíficas o moléculas heterólogas pueden obtenerse con el uso de

diferentes métodos de los que se ha informado conducen a la expresión exitosa de inmunoglobulinas relativamente muy defucosiladas que tienen los oligosacáridos de Fc de tipo complejo biantenarico tales como el control de la osmolalidad del cultivo (Konno *et al.*, (2012) *Cytotechnology* 64:249-265), la aplicación de una variante de la línea CHO Lec13 como la línea celular huésped (Shields *et al.*, (2002) *J Biol Chem* 277:26733-26740), la aplicación de una variante de la línea CHO EB66 como la línea celular huésped (Olivier *et al.*, (2010) *MAbs*;2: 405-415), la aplicación de una línea celular de hibridoma de rata YB2/0 como la línea celular huésped (Shinkawa *et al.*, (2003) *J Biol Chem* 278:3466-3473), la introducción de un ARN de interferencia pequeño específicamente contra el gen de 1,6-fucosiltransferasa (*FUT8*) (Mori *et al.*, (2004) *Biotechnol Bioeng* 88:901-908) o la coexpresión de β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III y Golgi α -mannosidasa II o un potente inhibidor de alfa-mannosidasa I, kifunensina (Ferrara *et al.*, (2006) *J Biol Chem* 281:5032-5036).

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción que comprende la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig tiene una estructura de glicano biantenaria con un contenido de fucosa de aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 %, por ejemplo, aproximadamente 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %. En algunas modalidades, la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción que comprende la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig tiene una estructura de glicano biantenaria con un contenido de fucosa de aproximadamente 50 %, 40 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 % o 20 %.

“**Contenido de fucosa**” se refiere a la cantidad del monosacárido de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa relacionadas con todas las glicoestructuras. Estas pueden caracterizarse y cuantificarse por múltiples métodos, por ejemplo: 1) mediante el uso de MALDI-TOF de la muestra tratada con N-glicosidasa F (p. ej. estructuras complejas, híbridas y oligo- y alta-manosa) como se describe en la publicación de patente internacional núm. WO2008/077546; 2) por la liberación enzimática de los glicanos en Asn297 con la subsecuente derivatización y detección/ cuantificación por HPLC (UPLC) con detección de fluorescencia y/o HPLC-MS (UPLC-MS); 3) análisis de proteína intacta del mAb nativo o reducido, con o sin tratamiento de los glicanos en Asn297 con Endo S u otra enzima que escinde entre el primer y el segundo monosacárido GlcNAc, dejando la fucosa unida al primer GlcNAc; 4) digestión del mAb a los péptidos constituyentes por digestión enzimática (p. ej., tripsina o endopeptidasa Lys-C), y la separación, detección y cuantificación posterior por HPLC-MS (UPLC-MS); 5) Separación de los oligosacáridos del mAb de la proteína del mAb por desglicosilación enzimática específica con PNGasa F en Asn 297. Por lo tanto, los oligosacáridos liberados pueden marcarse con un fluoróforo, separarse e identificarse por diversas técnicas complementarias que permiten: la caracterización fina de las estructuras de glicano por espectrometría de masa de ionización desorción láser asistida por matriz (MALDI) por comparación de las masas experimentales con las masas teóricas, la determinación del grado de sialilación por HPLC de intercambio iónico (GlycoSep C), la separación y cuantificación de las formas oligosacáridas de acuerdo con criterios de hidrofiliidad por HPLC de fase

normal (GlycoSep N) y la separación y cuantificación de los oligosacáridos por electroforesis capilar de alto rendimiento-fluorescencia inducida por láser (HPCE-LIF).

“**Baja fucosa**” o “**contenido bajo de fucosa**” se refieren a la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción que comprende la región constante de la Ig o al fragmento de la región constante de la Ig con un contenido de fucosa de aproximadamente 1 %-15 %.

“**Fucosa normal**” o “**contenido normal de fucosa**” se refieren a la molécula multiespecífica o la molécula heteróloga de la descripción que comprende la región constante de la Ig o al fragmento de la región constante de la Ig con un contenido de fucosa de aproximadamente más de 50 %, típicamente aproximadamente más de 80 % o más de 85 %.

5.5 Anticuerpos antiidiotipos

Los anticuerpos antiidiotipos son anticuerpos que se unen específicamente al spFv de la descripción.

La invención también proporciona un anticuerpo antiidiotipo que se une específicamente al spFv de la descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo antiidiotipo se une al enlace disulfuro en el spFv de la descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo antiidiotipo se une al dominio de unión al antígeno del spFv de la descripción.

5.6 Polinucleótidos, vectores, células huésped

La descripción también proporciona un polinucleótido aislado que codifica el spFv de la descripción.

La descripción también proporciona un vector que comprende el polinucleótido de la descripción.

En algunas modalidades, el vector es un vector de expresión. Los vectores de expresión pueden ser vectores plasmídicos, vectores virales, vectores para la expresión de baculovirus, vectores para la expresión procariota, vectores para la expresión eucariota, vectores basados en transposones o cualquier otro vector adecuado para la introducción del polinucleótido de la descripción en una célula u organismo determinado. El polinucleótido que codifica el spFv de la descripción puede estar unido operativamente a secuencias de control en el vector de expresión que facilitan la expresión del spFv. Tales elementos regulatorios pueden incluir un promotor transcripcional, secuencias que codifican sitios de unión ribosomales adecuados de ARNm, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión también pueden incluir uno o más elementos no transcritos tales como un origen de replicación, otras secuencias no transcritas flanqueadoras en 5' o 3', secuencias no traducidas en 5' o 3' (tales como sitios de unión de ribosomas necesarios), sitios de empalme donantes y aceptores, o marcadores de selección. El polinucleótido puede ser un ADNc. El promotor que dirige la expresión de spFv puede ser un promotor fuerte, débil, específico del tejido, inducible o específico del desarrollo. Los promotores ilustrativos que pueden usarse son hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT, por sus siglas en inglés), adenosina deaminasa, piruvato quinasa, beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana, y otros. En adición, muchos promotores virales funcionan de forma constitutiva en células eucarióticas y son adecuados para el uso con las modalidades descritas. Tales promotores virales incluyen el promotor temprano inmediato

del citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés), los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV, por sus siglas en inglés), las repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés) del virus de la leucemia de Maloney, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés), virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés), y otro retrovirus, y el promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Los promotores inducibles, tales como el promotor de metalotioneína, el promotor inducible por tetraciclina, el promotor inducible por doxiciclina, los promotores que contienen uno o más elementos de respuesta estimulada por interferón (ISRE, por sus siglas en inglés), tales como

10 proteína quinasa R, 2',5'-oligoadenilato sintetasas, genes Mx y ADAR1. Los vectores de la descripción también pueden contener uno o más sitios internos de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés). La inclusión de una secuencia IRES en los vectores de expresión puede ser beneficioso para potenciar la expresión de algunas proteínas. Los vectores de la descripción pueden ser circulares o lineales. Pueden prepararse para

15 contener un sistema de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, de ColE1, SV40, plásmido 2 μ , λ , virus de papiloma bovino, y lo similar. Los vectores de expresión pueden ser diseñados para expresión transitoria o para expresión estable, o para ambas. Los vectores de expresión pueden crearse para la expresión constitutiva o para la expresión inducible.

20 Los vectores ilustrativos que pueden usarse son bacterianos: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, y pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene)

pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia), pEE6.4 (Lonza) y pEE12.4 (Lonza). Otros vectores incluyen la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Md.), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.).

5 Pueden usarse vectores bacteriófagos, tales como λ GT10, λ GT11, λ EMBL4, y λ NM1149, λ ZapII (Stratagene). Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3, y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión animales incluyen pEUK-CI, pMAM, y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión puede ser un vector viral, p. ej., un vector retroviral, p. ej., un vector retroviral gamma.

10 La descripción también proporciona una célula huésped que comprende el vector de la descripción.

“Célula huésped” se refiere a una célula dentro de la cual se introduce un vector. Se entiende que el término célula huésped pretende referirse no solo a la célula en cuestión particular sino a la progenie de una célula de este tipo y, además, a una línea

15 celular estable generada a partir de la célula en cuestión particular. Dado que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones venideras ya sea debido a una mutación o influencias del medio ambiente, la progenie puede no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluye en el alcance del término “célula huésped”, como se usa en la presente descripción. Tales células huéspedes pueden ser células eucariotas,

20 células procariotas, células de plantas, o células de arquea. *Escherichia coli*, bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como Salmonella, Serratia, y varias especies de Pseudomonas son ejemplos de células huésped procariotas. Otros microbios, tales como levadura, son útiles, además, para la expresión. Saccharomyces

(p. ej., *S. cerevisiae*) y *Pichia* son ejemplos de células huésped de levadura adecuadas.

Las células eucariotas ilustrativas pueden ser de mamífero, insecto, aves o de otros orígenes animales. Las células eucariotas de mamífero incluyen líneas celulares

inmortalizadas tales como hibridomas o líneas celulares de mieloma tales como SP2/0

5 (American Type Culture Collection) (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (European

Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC Núm. 85110503),

FO (ATCC CRL-1646) y la línea celular murina Ag653 (ATCC CRL-1580). Una línea

celular ilustrativa de mieloma humano es U266 (ATTC CRL-TIB-196). Otras líneas

celulares útiles incluyen las derivadas de células de ovario de hámster chino (CHO), tales

10 como CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) o DG44.

La descripción también proporciona un método para producir el spFv de la descripción, que comprende cultivar la célula huésped de la descripción en condiciones en las que se produce el spFv, y recuperar el spFv producido por la célula huésped. Los

métodos para fabricar y purificar scFv son conocidos. Una vez sintetizados (ya sea

15 químicamente o por vía recombinante), los spFv de la descripción pueden purificarse de

acuerdo con procedimientos estándar, que incluyen precipitación con sulfato de amonio,

columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por cromatografía de

líquidos de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel, y lo

similar (ver generalmente Scopes, Protein Purification (Springer- Verlag, N.Y., (1982)). El

20 scFv de la descripción puede estar sustancialmente puro, por ejemplo, al menos

aproximadamente 80 % a 85 % puro, al menos aproximadamente 85 % a 90 % puro, al

menos aproximadamente 90 % a 95 % puro, o al menos aproximadamente 98 % a 99 %, o

más, puro, por ejemplo, libre de contaminantes, tales como desechos celulares, macromoléculas, etc. aparte de la proteína sujeto

Los polinucleótidos que codifican el scFv de la descripción pueden incorporarse dentro de vectores por métodos estándar de biología molecular. La transformación, el cultivo, la expresión de anticuerpos y la purificación de células huésped se realizan mediante el uso de métodos conocidos.

5.7 Composiciones farmacéuticas y administración

La descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende el spFv, la molécula heteróloga que comprende el spFv o la molécula multiespecífica que comprende el spFv de la descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. Para uso terapéutico, el spFv, la molécula heteróloga que comprende el spFv o la molécula multiespecífica que comprende el spFv de la descripción pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz del spFv, la molécula heteróloga que comprende el spFv o la molécula multiespecífica que comprende el spFv de la descripción como un ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable. “**Portador**” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el spFv, la molécula heteróloga que comprende el spFv o la molécula multiespecífica que comprende el spFv de la descripción. Tales vehículos podrían ser líquidos, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuate, aceite de frijol de soya, aceite mineral, aceite de sésamo, y lo similar. Por ejemplo, puede usarse 0,4 % de solución salina y 0,3 % de glicina. Estas soluciones son estériles y generalmente, libres de materia particulada. Pueden esterilizarse mediante

técnicas de esterilización convencionales y muy conocidas (p. ej., filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiere para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y reguladores del pH, agentes estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes, *etc.* La concentración del spFv, la molécula heteróloga que comprende el spFv o la molécula multiespecífica que comprende el spFv de la descripción en tal formulación farmacéutica puede variar, de menos de aproximadamente 0,5 %, usualmente hasta al menos aproximadamente 1 % a tanto como 15 o 20 % en peso y puede seleccionarse principalmente basado en la dosis requerida, volúmenes de fluido, viscosidades, *etc.*, de acuerdo con el modo de administración seleccionado. Las formulaciones y vehículos adecuados, incluso otras proteínas humanas, p. ej., albúmina de suero humano, se describen, por ejemplo, en p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.º edición, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams y Wilkins, Filadelfia, PA 2006, Parte 5, Pharmaceutical Manufacturing págs. 691-1092, ver, especialmente, las págs. 958-989.

El modo de administración del spFv, la molécula heteróloga que comprende el spFv o la molécula multiespecífica que comprende el spFv de la descripción puede ser cualquier vía adecuada tal como administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, transmucosal (oral, intranasal, intravaginal, rectal) u otros medios apreciados por el experto, como bien se conoce en la técnica.

5.8 Proceso para preparar el spFv de la descripción

La descripción también proporciona un proceso para preparar un scFv estabilizado, que comprende:

proporcionar una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) que forman un parátopo;

proporcionar un enlazador (L) que comprende o se modifica para que comprenda una primera L Cys;

- 5 modificar la VH para que comprenda una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y
formar un enlace disulfuro entre la VH Cys y la primera L Cys para preparar el scFv estabilizado.

La descripción también proporciona un proceso para preparar scFv

- 10 estabilizado, que comprende:

proporcionar una VH y una VL que forman un parátopo;

proporcionar un L que comprenda o se modifique para que comprenda una segunda L Cys;

modificar la VL para que comprenda una VL Cys en una posición del residuo de

- 15 marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y
formar un enlace disulfuro entre la VL Cys y la segunda L Cys para preparar el scFv estabilizado.

La descripción también proporciona un proceso para preparar un scFv

estabilizado, que comprende:

- 20 proporcionar una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) que forman un parátopo;
proporcionar un enlazador (L) que comprende o se modifique para que comprenda una primera L Cys y una segunda L Cys;

modificar la VH para que comprenda una VH Cys en una posición del residuo de marco de la VH expuesta en la superficie conservada estructuralmente;

modificar la VL para que comprenda una VL Cys en una posición del residuo de marco de la VL expuesta en la superficie conservada estructuralmente; y

- 5 formar un enlace disulfuro entre la VH Cys y la primera L Cys y un enlace disulfuro entre la VL Cys y la segunda L Cys para preparar el scFv estabilizado.

El enlace disulfuro se forma típicamente durante la expresión del scFv.

Cualquier par VH/VL de scFv conocido que forma un dominio de unión al antígeno puede modificarse en scFv estabilizados de la descripción. Alternativamente,

- 10 los pares VH/VL de unión al antígeno de interés pueden identificarse *de novo* mediante el uso de métodos conocidos y los pares VH/VL resultantes pueden modificarse en el formato de spFv.

Por ejemplo, el método de hibridomas de Kohler y Milstein puede usarse para identificar pares VH/VL que se unen a un antígeno de interés y los pares VH/VL

- 15 resultantes pueden modificarse como spFv. Alternativamente, los animales transgénicos, tales como ratones, ratas o pollos que tienen loci de inmunoglobulina (Ig) humana en sus genomas pueden usarse para generar fragmento de unión al antígeno, y se describen en, por ejemplo, la patente de los EE. UU. núm. 6.150.584, la publicación de patente internacional núm. WO1999/45962, las publicaciones de
20 patentes internacionales núms. WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 y WO1990/04036. Los loci endógenos de inmunoglobulina en tales animales pueden desestabilizarse o delecionarse, y al menos un locus completo o parcial de inmunoglobulina humana puede insertarse en el genoma del animal mediante el uso de

recombinación homóloga o no homóloga, mediante el uso de transcromosomas, o mediante el uso de minigenes. Compañías tales como Regeneron

(http://_www_regeneron_com), Harbour anticuerpos

(http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT)

5 (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni

(http://_www_trianni_com) y Ablexis (http://_www_ablexis_com) pueden contratarse

para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado

mediante el uso de tecnologías como las descritas anteriormente. La presentación en

fagos se puede usar también para generar fragmentos de unión al antígeno que

10 pueden modificarse como spFv.

En algunas modalidades, el spFv de la descripción es humanizado. En algunas modalidades, el spFv de la descripción es humano. En algunas modalidades, el spFv de la descripción es no humano.

En algunas modalidades, la distancia entre la VH Cys y la VL Cys es de
15 aproximadamente 7 Å a aproximadamente 9 Å en el scFv estabilizado.

En algunas modalidades, la VH Cys está en H3, H5, H40, H43, H46 o H105, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

En algunas modalidades, la VL Cys está en L3, L5, L39, L42, L45, L100 o L102, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia.

20 En algunas modalidades,

la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L42;

la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L100;

la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L3;

- la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L5;
la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L39;
la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L42;
la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L45;
5 la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L100;
la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L102;
la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L3;
la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L5;
la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L39;
10 la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L42;
la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L45;
la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L100;
la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L102;
la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L3;
15 la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L5;
la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L39;
la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L42;
la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L45;
la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L100;
20 la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L102;
la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L3;
la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L5;
la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L39;

- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L42;
- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L45;
- la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L102;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L3;
- 5 la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L5;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L39;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L42;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L45;
- la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L100;
- 10 la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L102;
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L3;
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L5;
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L39;
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L45;
- 15 la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L100; o
- la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L102, en donde la numeración de los
residuos está de acuerdo con Chothia.

En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos contiguos derivada de una región bisagra de la inmunoglobulina (Ig).

- 20 En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig se deriva de una región bisagra de la Ig humana o no humana.

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig se deriva de la región bisagra de la Ig humana.

En algunas modalidades, la región bisagra de la Ig humana es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos C(X)_yC (**sec. con núm. de ident.: 23**), en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg Asn,

5 Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp o Tyr e y es un entero de 1 a 3

En algunas modalidades, el L comprende una secuencia de aminoácidos C(X)_yC (**sec. con núm. de ident.: 24**), en donde X es Gly, Ser o Pro, e y es un entero de 1 a 3.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos CPC, CGC, CSC, CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**), CGPC (**sec. con núm. de ident.: 28**),

10 CPGC (**sec. con núm. de ident.: 29**), CGGC (**sec. con núm. de ident.: 30**), CSPG (**sec. con núm. de ident.: 31**), CPSC (**sec. con núm. de ident.: 32**), CSSC (**sec. con núm. de**

ident.: 33), CGSC (**sec. con núm. de ident.: 34**), CSGC (**sec. con núm. de ident.: 35**),

CPPPC (**sec. con núm. de ident.: 36**), CGPPC (**sec. con núm. de ident.: 37**), CPGPC

(**sec. con núm. de ident.: 38**), CPPGC (**sec. con núm. de ident.: 39**), CGGPC (**sec. con**

15 **núm. de ident.: 40**), CPGGC (**sec. con núm. de ident.: 41**), CGGGC (**sec. con núm. de ident.: 42**), CSPPC (**sec. con núm. de ident.: 43**), CPSPC (**sec. con núm. de ident.:**

44), CPPSC (**sec. con núm. de ident.: 45**), CSSPC (**sec. con núm. de ident.: 46**),

CPSSC (**sec. con núm. de ident.: 47**), CSSSC (**sec. con núm. de ident.: 48**), CGSPC

(**sec. con núm. de ident.: 49**), CPGSC (**sec. con núm. de ident.: 50**), CSGPC (**sec. con**

20 **núm. de ident.: 51**) o CPSGC (**sec. con núm. de ident.: 52**).

En algunas modalidades, el L comprende de aproximadamente 14 a aproximadamente 19 aminoácidos, tal como aproximadamente 14, aproximadamente

15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18 o aproximadamente 19 aminoácidos.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 25**); en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, leu, Lys, Phe Thr, Trp o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 26**); en donde X es Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr o Tyr, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**sec. con núm. de ident.: 27**); en donde X es Gly o Pro, m es un entero de 6 a 9, y es un entero de 1 a 3 y n es un entero de 4 a 6.

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

En algunas modalidades, el spFv estabilizado de la descripción está en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv estabilizado de la descripción está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,
la VH comprende Cys en H105;
la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades,

5 la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

10 En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H105;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

20

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

5 En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H5;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

10 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

 En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L42;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

15

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

 En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L45;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

20

el scFv está en la orientación VL-L-VH.

 En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H3;

la VL comprende Cys en L39;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

5 el scFv está en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,
10 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L102;

15 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H43;

20 la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H43;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

5 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L100;

10 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H40;

15 la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

20 la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,

4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H40;

la VL comprende Cys en L3;

- 5 el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H46;

- 10 la VL comprende Cys en L100;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

- 15 la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L102;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

- 20 En algunas modalidades,

la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L5;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades,

5 la VH comprende Cys en H46;

la VL comprende Cys en L3;

el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y

el scFv está en la orientación VH-L-VL.

10 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la **sec. con núm. de ident.: 3.**

En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la **sec. con núm. de ident.: 6.**

15 En algunas modalidades, el L comprende la secuencia de aminoácidos de la **sec. con núm. de ident.: 7.**

En algunas modalidades, el spFv estabilizado de la descripción se une a un antígeno con afinidad comparable cuando se compara con un scFv parental que está desprovisto de enlaces disulfuro.

20 La descripción también proporciona un proceso para preparar un scFv estabilizado, que comprende

proporcionar un polinucleótido que codifica una VH, un L y una VL, en donde

la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L42;

la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en un L100;

- la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L3;
la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L5;
la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L39;
la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L42;
5 la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L45;
la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L100;
la VH comprende Cys en H3 y la VL comprende Cys en L102;
la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L3;
la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L5;
10 la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L39;
la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L42;
la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L45;
la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L100;
la VH comprende Cys en H5 y la VL comprende Cys en L102;
15 la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L3;
la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L5;
la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L39;
la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L42;
la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L45;
20 la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L100;
la VH comprende Cys en H40 y la VL comprende Cys en L102;
la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L3;
la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L5;

- la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L39;
- la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L42;
- la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L45;
- la VH comprende Cys en H43 y la VL comprende Cys en L102;
- 5 la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L3;
- la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L5;
- la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L39;
- la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L42;
- la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L45;
- 10 la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L100;
- la VH comprende Cys en H46 y la VL comprende Cys en L102;
- la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L3;
- la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L5;
- la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L39;
- 15 la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L45;
- la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L100; o
- la VH comprende Cys en H105 y la VL comprende Cys en L102, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con Chothia;
- el L comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3,
- 20 4, 5, 6 o 7; y
- expresar el polinucleótido en una célula huésped para producir el scFv estabilizado.

En algunas modalidades, la célula huésped es una célula procariota.

En algunas modalidades, la célula huésped es una célula eucariótica.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para describir mejor algunas de las modalidades descritas en la presente descripción. Se pretende que los ejemplos ilustren, y no limiten, las modalidades descritas.

6. EJEMPLOS

6.1 Ejemplo 1: Diseño de scFv estabilizados

Un anticuerpo monoclonal (mAb) reconoce su antígeno objetivo a través de los dos dominios variables VL y VH. Un Fv de cadena única (scFv) fue diseñado primero por Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426 (1988) como una fusión genética de VL y VH con un enlazador flexible en la orientación VL-enlazador-VH o VH-enlazador-VL. El enlazador flexible es típicamente tres o cuatro repeticiones del enlazador glicina-serina tal como (GGGGS)_n; n=1-4 (**sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con núm. de ident.: 54, sec. con núm. de ident.: 55**). Un scFv recapitula la especificidad de unión al antígeno y en gran medida la afinidad de su mAb parental. Estas moléculas de scFv han encontrado aplicaciones amplias como reactivos de detección/diagnóstico o como bloques aditivos para preparar moléculas más elaboradas tales como terapéuticas con bi, multiespecíficos (Brinkmann and Kontermann (2017) *MAbs* 9: 182-212) o en terapéuticas con CAR-T (Gross *et al.*, (1989), *Transplant Proc* 21(1 Pt 1): 127-130; Porter *et al.*, (2011) *J Cancer* 2: 331-332; Porter *et al.*, (2011) *N Engl J Med* 365: 725-733).

Uno de los desafíos de las moléculas de scFv es la poca estabilidad y las tendencias a agregarse (revisado en Worn and Pluckthun (2001) *J Mol Biol* 305: 989-1010; Rothlisberger *et al.*, (2005) *J Mol Biol* 347: 773-789). Se han intentado varias estrategias para mejorar sus propiedades (Arnd *et al.*, (2001) *J Mol Biol* 312: 221-228; Monsellier *et al.*, (2006) *J Mol Biol* 362: 580-593; Zhao *et al.*, (2010) *Int J Mol Sci* 12: 1-11; Perchiacca and

Tessier (2012) *Annu Rev Chem Biomol Eng* 3: 263-286; Asial *et al.*, (2013) *Nat Commun* 4: 2901; Gil and Schrum (2013) *Adv Biosci Biotechnol* 4: 73-84; Tiller and Tessier (2015) *Annu rev Biomed Eng* 17: 191-216) Estas estrategias incluyen introducir enlaces disulfuro entre dominios VL/VH, mejorar la estabilidad del dominio VL/VH y/o interacciones de interfase usando diferentes métodos experimentales, con motivos de dimerización adicionales y otros. Una dificultad clave es que la mayoría de estas estrategias son frecuentemente específicas para el par VH/VL y no pueden transferirse fácilmente a otros pares VH/VL. Algunas veces, la modificación puede tener un impacto negativo sobre la estructura de VL/VH y la propiedad del scFv. Recientemente, Zhang *et al.* introdujo un disulfuro entre la posición 44 de la VH y la posición 100 de la VL de un scFv anti-aflatoxina B₁ (H4) y exitosamente logró una estabilización significativa del scFv mientras preserva su afinidad de unión (Zhao *et al.*, (2010) *Int J Mol Sci* 12: 1-11). Sin embargo, debido a las restricciones de distancia y ángulo entre las dos posiciones elegidas, el disulfuro inter-VL/VH, si se aplica a otros pares VL/VH, puede restringir/distorsionar la orientación relativa entre los dos dominios, que frecuentemente se requiere para la unión.

La interfaz entre las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab comprende interacciones VH/VL y CH1/CL. Los dos conjuntos independientes de interacciones proporcionan efectos de estabilización sinérgica. Además, la unión V/C también aporta algunos efectos de estabilización. En comparación, en un scFv la interfaz de VH/VL se mantiene solo por las interacciones VH/VL. El enlazador, diseñado para ser flexible y no restrictivo excepto en los casos en que la longitud está diseñada para ser tan corta como para promover interacciones inter scFv para la formación de dímeros y oligómeros, solo

acopla holgadamente a los dos juntos. Se sabe que la longitud y naturaleza del enlazador, cuando es lo suficientemente largo, aporta poco a la estabilidad del scFv.

6.1.1 Diseño de “engrapado”

El propósito del trabajo fue diseñar y generar scFv estabilizados al restringir, pero sin afectar negativamente, los movimientos relativos entre la VH y la VL que forman el scFv. Esto se logró al estabilizar el scFv mediante la modificación de enlaces disulfuro entre la VH y la VL y entre la VL y el enlazador. Las restricciones (es decir, enlaces disulfuro), cuando están ubicadas adecuadamente, después actuarían como los efectos sinérgicos proporcionados por las interacciones CH1/CL y V/C descritas anteriormente. Con este fin se identificaron dos posiciones de marco (puntos de anclaje) expuestas en la superficie conservadas estructuralmente, cada una en VH y VL, que no se superpusieron con el parátipo previsto típico, y se mutaron a residuos de cisteína (Cys). Posteriormente se eligieron dos posiciones en el enlazador flexible para las posiciones de Cys. Cuando se diseñaron las distancias y ubicaciones entre los residuos Cys enlazadores de una manera que facilitaba la formación de enlaces disulfuro entre el Cys enlazador y cada punto de anclaje, la VH y la VL se unirían más ajustadamente entre sí en comparación con la unión en ausencia de los enlaces disulfuro. Este esquema se ilustra en la **Figura 1** con un enlazador ilustrativo que contiene la secuencia CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**). El concepto de formar enlaces disulfuro entre el enlazador flexible y puntos de anclaje se menciona en la presente descripción como “engrapado”. Las moléculas de scFv “engrapadas” resultantes se mencionan en la presente descripción como spFv (“Fv engrapado”).

6.1.2 Elección de los puntos de anclaje, diseño de secuencias de grapa y enlazadores

Para que el esquema de engrapado pueda aplicarse extensamente es importante que los puntos de anclaje estén estructuralmente conservados, expuestos en la superficie de la VL y de la VH y cuya mutación al residuo Cys no afecte el plegado de VL y VH o la unión a antígenos. Las distancias y la geometría de los puntos de anclaje y los terminales N y C de los dominios VL y VH son también consideraciones importantes para la formación apropiada de disulfuro.

Los puntos de anclaje se eligieron por separado para spFv en la orientación VL-enlazador-VH y VH-enlazador-VL. Para la orientación VL-enlazador-VH, la posición de Chothia 42 en la VL y la posición de Chothia 105 en la VH se eligieron como puntos de anclaje. Una ilustración gráfica de los puntos de anclaje elegidos para el spFv en la orientación VL-enlazador-VH se muestra en la **Figura 2** dentro del Fv de un anticuerpo de línea germinal humana (pdb ID 5I19, GLk1 de aquí en adelante). En GLk1, la posición de Chothia en la VL 42 es lisina (K) y la posición de Chothia en VH 105 glutamina (Q). Para la orientación VH-enlazador-VL, la posición de Chothia 100 en la VL y la posición de Chothia 43 en la VH se eligieron como puntos de anclaje. La **Figura 3** muestra una ilustración gráfica de los puntos de anclaje elegidos para el spFv en la orientación VH-enlazador-VL dentro del Fv de un anticuerpo de línea germinal humana (pdb ID 5I19, GLk1). En GLk1, la posición de Chothia en la VL 100 es glutamina (Q) y la posición de Chothia en la VH 43 es lisina (K). Los puntos de anclaje elegidos eran estructuralmente conservados, y la geometría era muy similar en anticuerpos que contenían cadenas ligeras kappa o lambda. Las distancias entre los pares de los

puntos de anclaje variaron de aproximadamente 7 Å (para la orientación VL-enlazador-VH) a aproximadamente 9 Å (para la orientación VH-enlazador-VL).

Las secuencias de grapa incrustadas dentro del enlazador que conecta la VH y la VL se diseñaron para ser de longitud similar a las distancias entre los puntos de anclaje en el spFv. Como un ejemplo inicial de la secuencia de grapa, CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**) se eligió como una secuencia de grapa posible, en parte porque esta secuencia se produce nativamente en la bisagra de IgG1 humana y también en algunas IgG de roedores. Las estructuras de las bisagras de moléculas de IgG humana y de ratón demostraron que las distancias C β (cys1)-C β (cys2) en una bisagra de IgG de ratón (**Figura 4**) y una IgG humana (**Figura 5**) variaron de aproximadamente 7 Å a 9 Å. Dado que este rango fue muy similar a las distancias entre los dos puntos de anclaje en ambas orientaciones, VL-enlazador-VH y VH-enlazador-VL, la secuencia de grapa CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**) tenía el potencial para proporcionar la geometría correcta para el engrapado, es decir, formar enlaces disulfuro apropiados de manera eficaz y correcta a los puntos de anclaje. Generalmente, las secuencias de grapa se diseñaron para tener dos residuos Cys. Para el engrapado adecuado, el Cys N-terminal de la secuencia de grapa formó un enlace disulfuro con el punto de anclaje del dominio N-terminal del spFv y el Cys C-terminal de la secuencia de grapa formó un enlace disulfuro con el punto de anclaje del dominio C-terminal del spFv.

El enlazador que conecta la VH y la VL entonces se diseñó para comprender la secuencia de grapa y conectar secuencias tanto N-terminal como C-terminal a la secuencia de grapa para extender el enlazador para proporcionar suficiente longitud

del enlazador para permitir el plegado entre cadenas de la VH y la VL y para facilitar el posicionamiento apropiado de la secuencia de grapa.

En el diseño VL-enlazador-VH, las distancias entre el punto de anclaje de VL (K42), el punto de anclaje de VH (Q105), el C-terminal de la VL (K107) y el N-terminal de la VH (Q1) se muestran en la **Figura 2**. En el diseño VH-enlazador-VL, las distancias entre el punto de anclaje de VL (Q100), el punto de anclaje de VH (K43), el C-terminal de la VH (S114) y el N-terminal de la VL (D1) se muestran en la **Figura 3**. El modelado sugirió que estas distancias pueden estar abarcadas por longitudes del enlazador de aproximadamente 14-19 residuos, en las cuales la secuencia de grapa de 4 residuos está flanqueada por una extensión del enlazador N-terminal de aproximadamente 6-9 residuos y una extensión del C-terminal de aproximadamente 4-6 residuos. Por lo tanto, la longitud del enlazador diseñado podría expresarse como $n+4+m$, en la cual $n=6-9$ residuos y $m=4-6$ residuos y 4 indica la longitud de la secuencia de grapa CPPC (**sec. con núm. de ident.: 1**). Los residuos n y m podrían ser glicina o serina u otros residuos de aminoácidos. Se espera que estas longitudes de enlazador sean suficientemente largas y flexibles para permitir el engrapado, pero demasiado cortas para permitir el reordenamiento.

6.2 Ejemplo 2: Generación y caracterización de spFv

Para evaluar los diseños de engrapado se eligieron tres anticuerpos humanos para generar scFv y los spFv correspondientes: dos anticuerpos con cadenas ligeras kappa (GLk1 y GLk2) de las genotecas de anticuerpos de fagos sintéticos (Shi *et al.*, (2010) *J Mol Biol* 397:385-396) y un anticuerpo que contiene lambda (CAT2200) obtenido de una publicación (Gerhardt *et al.* (2009) *J Mol Biol* 394:905-921). Para CAT2200 se introdujo una mutación T28G en la VH parental para

generar una variante (CAT2200a) para reducir algunas de sus interacciones con su objetivo, IL-17. Además, una mutación S42Q (Chothia) se modificó en la VL del CAT2200 parental y se apareó con la VH del T28G para generar CAT2200b. Las secuencias de aminoácidos de los dominios de VL y VH de GLk1, GLk2, CAT2200a y CAT2200b se muestran en la **Figura 6** y **Figura 7**, respectivamente. La secuencia de aminoácidos del dominio de VH es idéntica entre BAT2200a y CAT2200b. GLk1VH está más cerca de IGHV2-23*01 humana, GLk2VH de IGHV5-51 humana, CAT2200VH de IGHV2-23*01 humana. GLk1VL está más cerca de IGKV1-39*01 humana, GLk2VL de IGKV3-20*01 humana y CAT2200VL de IGLV6-57*01 humana.

Todas las moléculas de scFv y spFv se generaron y expresaron en la orientación VL-enlazador-VH y VH-enlazador-VL. Para los constructos de scFv se usó un enlazador (GGGGS)₄ (**sec. con núm. de ident.; 2**) estándar. Para el spFv se usaron longitudes de enlazador diferentes entre los rangos de **n** y **m** anteriores. Para el spFv de GLk1 se usó los enlazadores 9-4-5 para ambas orientaciones. Para el spFv de GLk2 se usó las longitudes de enlazador 9-4-5 y 6-4-6 para las orientaciones VL-VH y VH-VL, respectivamente. Para el spFv de CAT2200a se prepararon moléculas de VL-VH con los enlazadores 8-4-4 y 9-4-4, respectivamente, y la VH-VL del spFv de CAT2200b se preparó con el enlazador 9-4-4. La **Tabla 4** muestra las moléculas generadas y sus secuencias enlazadoras. La **Tabla 5** muestra las secuencias de aminoácidos o las moléculas generadas.

Tabla 4.

Nombre de la molécula (sec. con núm. de ident.:)	Tipo de enlazador	Secuencia de aminoácidos del enlazador	Enlazador sec. con núm. de ident.:
GLk1 scFv VL-VH (8)	4x G4S	GGGSGGGSGGGSGGGGS	2

Nombre de la molécula (sec. con núm. de ident.:)	Tipo de enlazador	Secuencia de aminoácidos del enlazador	Enlazador sec. con núm. de ident.:
GLk1 spFv VL-VH (9)	9+4+5	GGGSGGSGGCPPCGGSGG	3
GLk1 scFv VH-VL (10)	4x G4S	AGGGGSGGGGSGGGGSGGGG S	2
GLk1 spFv VH-VL (11)	9+4+5	GGGSGGSGGCPPCGGSGG	3
GLk2 scFv VL-VH (12)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
GLk2 spFv VL-VH (13)	9+4+5	GGGSGGSGGCPPCGGSGG	3
GLk2 scFv VH-VL (14)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
GLk2 spFv VH-VL (15)	6+4+6	GGGSGGCPPCGGGSGG	4
CAT2200a scFv VL-VH (16)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
CAT2200a spFv VL-VH (17)	8+4+4	GGSGGSGGCPPCGSGG	5
CAT2200b scFv VL-VH (18)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
CAT2200a spFv VL-VH (19)	9+4+4	GGGSGGSGGCPPCGSGG	6
CAT2200a scFv VH-VL (20)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
CAT2200b spFv VH-VL (21)	9+4+4v2	GGGSGGGSGCPCGGGG	7

Tabla 5.

Nombre de la molécula	Secuencia de proteína	Sec. con núm. de ident.:
GLk1 scFv VL-VH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGELDFWG QGTLVTVSSGHHHHHH	8
GLk1 spFv VL-VH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GCAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGSGGCPP CGGSGGEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA	9

Nombre de la molécula	Secuencia de proteína	Sec. con núm. de ident.:
	MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGC GTLVTVSSGHHHHHH	
GLk1 scFv VH-VL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGGQTLVTVSS AGGGGSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFG QGTKVEIKRGHHHHHH	10
GLk1 spFv VH-VL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGCGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGGQTLVTVSS GGGSGGSGGCPPCGGSGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGCGTK VEIKRGHHHHHH	11
GLk2 scFv VL-VH	EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWISWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQQQVTIS ADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGDSTDLDYWGG GTLVTVSSGHHHHHH	12
GLk2 spFv VL-VH	EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGCAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGCPP CGGSGGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWI SWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQQQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGDSTDLDYWGGCTL VTVSSGHHHHHH	13
GLk2 scFv VH-VL	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQM PGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQQQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARGDGDSTDLDYWGGQTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLTLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFG QGTKVEIKGHHHHHH	14
GLk2 spFv VH-VL	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQM PGCGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQQQVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARGDGDSTDLDYWGGQTLVTVSSG GGSGGCPPCGGGSGGSEIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS	15

Nombre de la molécula	Secuencia de proteína	Sec. con núm. de ident.:
	GSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGCGTK VEIKGHHHHHH	
CAT2200a scFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQR PGSSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLK TEDEADYYCQTYDPYSVVFSGGKLTVLGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNW GQGT LTVSSGHHHHHH	16
CAT2200a spFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQR PGCSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLK TEDEADYYCQTYDPYSVVFSGGKLTVLGGSGGSGGCPP CGSGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNWGCGL TVSSGHHHHHH	17
CAT2200b scFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQR PGQSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLK TEDEADYYCQTYDPYSVVFSGGKLTVLGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNW GQGT LTVSSGHHHHHH	18
CAT2200a spFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQR PGCSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLK TEDEADYYCQTYDPYSVVFSGGKLTVLGGGSGGSGGCP PCGSGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNWGCGL LTVSSGHHHHHH	19
CAT2200a scFv VH-VL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNWGQGT LTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGNFMLTQPHSVSESPGKTVT ISCTRSSGSLANYVQWYQQRPGSSPTIVIFANNQRPSGV PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQTYDPYSV FSGGKLTVLGHHHHHH	20
CAT2200b spFv VH-VL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWVRQ APGCGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNWGQGT LTVSSG GGSGGGSGCPPCGGGGNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCT RSSGSLANYVQWYQQRPGQSPTIVIFANNQRPSGVPDRF	21

Nombre de la molécula	Secuencia de proteína	Sec. con núm. de ident.:
	SGSIDSSSNSASLTISGLKTEADYYCQTYDPYSVVFSGC TKLTVLGHHHHHH	

Todas las moléculas de scFv y spFv excepto CAT2200a scFv VL-VH se clonaron en un vector de expresión de mamífero impulsado por el promotor de CMV. Estos constructos se transfectaron en células Expi293 con protocolos del fabricante y

5 las células se cultivaron durante 5 días. Cada proteína se purificó a partir del sobrenadante clarificado en columnas HP His-TRAP de 1 ml (GE Healthcare) a través de un sistema AKTAPRESS (GE Healthcare). La columna se preparó con un gradiente de regulador de elución 0-100 % (regulador de lavado: Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM; Regulador de elución: Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl

10 500 mM, imidazol 500 mM) para eliminar el níquel unido libremente y, después, reequilibrar en DPBS. El sobrenadante aclarado primero se ajustó hasta Tris 50 mM, pH 7,5 e imidazol 20 mM y, después, se cargó sobre una columna HP HisTRAP de 1 ml a 4 °C 0,8 ml/min. Después, la columna se lavó con PBS hasta obtener valores iniciales estables. Después, la columna se lavó adicionalmente con 20 CV de

15 regulador de lavado, se eluyó con regulador de elución en un solo circuito de inyección y se desaló en 1X DPBS sobre una columna de desalado HiPrep 26/10 y las fracciones se recolectaron. Después, las fracciones que contenían la proteína purificada se agruparon y concentraron. Las proteínas Glk2 scFv y spFv se dializaron en DPBS para las mediciones de la estabilidad térmica (DSC y NanoDSF) y Tris

20 25 mM, pH 7,5 y NaCl 100 mM para otros estudios. Las otras proteínas de scFv y spFv se dializaron en MES 25 mM, pH 6,0 y NaCl 100 mM.

Se adquirió CAT2200a scFv VL-VH de un proveedor. La concentración fue de 0,77 mg/ml en DPBS, pH 7,2. Se adquirió un mutante de IL-17 (12-132 con mutaciones K70Q A132Q C106S, IL-17 de aquí en adelante para simplificar (**sec. con núm. de ident.: 22**) de Accelagen (CA). La proteína se plegó nuevamente a partir del cuerpo de inclusión de *E. coli* siguiendo su protocolo de replegado patentado y se proporcionó a 1,50 mg/ml en NaCl 20 mM, MES 20 mM, pH 6,0.

Sec. con núm. de ident.: 22 (mutante de IL-17A)

MNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVI
WEAQCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHSPNSFRLEKILVSVGCTCV
TPIVHHVQ

6.2.1 Estabilidad térmica de las moléculas de scFv y spFv generadas

La estabilidad térmica de las moléculas de scFv y spFv se investigó mediante calorimetría térmica diferencial (DSC). Las proteínas de scFv y spFv se dializaron durante la noche contra 1x DPBS (Gibco) para GLk1 y CAT2200a/CAT2200b o MES (MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM) para GLk2. Después, el regulador de diálisis se filtró a través de 0,22 micrones y se usó como la solución de referencia y para blancos regulador-regulador en el experimento de DSC. Las proteínas se diluyeron hasta ~0,5 mg/ml en el regulador filtrado y se cargó 400 µl de cada muestra de proteína o de amortiguador en una placa de 96 pocillos profundos (MicroLiter Analytical Supplies, 07-2100) y se mantuvo a 4 °C en la gaveta del automuestreador durante el transcurso del experimento. Se usó un DSC MicroCal Capillary con automuestreador (Malvern) para realizar los experimentos de DSC. Las exploraciones de DSC se realizaron de 25-95 °C a una velocidad de exploración de 60 °C/h sin reexploraciones de muestras. No se

seleccionó la retroalimentación y el periodo de filtrado se fijó en 15 s. Después de cada muestra, las células se limpiaron con una solución Contrad-70 al 10 % y se probó un blanco regulador-regulador. El análisis de datos se realizó con Origin 7.0 con el complemento para análisis automático MicroCal VP-Capillary DSC Automated Analysis (Malvern). El rango y el tipo iniciales se eligieron manualmente y, después, se restaron. El blanco del regulador anterior se restó de la curva de muestra seguido por la normalización dependiente de la concentración. Los perfiles de fusión térmica se analizaron con transiciones de 2 estados y distintas a 2 estados. Los ajustes de dos estados (una transición) concordaron débilmente con las curvas experimentales. Por lo tanto, con dos transiciones (T_{m1} y T_{m2}) se calcularon al realizar manualmente ajustes distintos a 2 estados. Los datos de la T_m se informan en la **Tabla 6**. Los perfiles de DSC de todas las proteínas de scFv y spFv exhibieron un sesgo que solo podría ajustarse con transiciones distintas a 2 estados. Por lo tanto, para cada scFv o spFv se informaron dos transiciones (T_{m1} y T_{m2}) (**Tabla 6**). Más probablemente, estas dos transiciones corresponden a la T_m de fusión de los dominios de VL y VH, respectivamente. Generalmente, al comparar, las diferencias entre el scFv y el spFv para T_{m1} o T_{m2} , hay un aumento de apenas 10 °C por engrapado, independientemente de la T_m del scFv inicial. Hay una sola excepción, es decir, el caso de diferencia de scFv y spFv de GLk2 (orientación VH-VL), a ~7 °C. Esto es probable debido al enlazador 6+4+6 más corto que puede haber causado una ligera tensión en la geometría de engrapado. El hecho de que ΔT_{m1} (VL) y ΔT_{m2} (VH) fueron casi idénticos sugiere que el engrapado condujo a la estabilización de los dominios propiamente dichos además del fortalecimiento de las interacciones VL/VH.

Alternativamente, las interacciones VH/VL más fuertes transmiten los efectos de estabilización en la estabilización de los dominios VL/VH. En resumen, el engrapado como se describe en este trabajo aumenta significativamente la estabilidad del scFv.

Tabla 6.

Nombre de la molécula (sec. con núm. de ident.:)	Tipo de enlazador	Estabilidad por DSC						
		Tm1 (°C)	SD(Tm1) (°C)	Tm2 (°C)	DE(Tm2) (°C)	ΔTm_1 (°C)	ΔTm_2 (°C)	$\Delta(Tm1-Tm2)$
GLk1 scFv VL-VH (8)	4x G4S	68,9	0,2	72,1	0,0	9,7	9,0	3,3
GLk1 spFv VL-VH (9)	9+4+5	78,5	0,2	81,1	0,0			2,6
GLk1 scFv VH-VL (10)	4x G4S	67,7	0,3	70,9	0,0	10,0	9,2	3,3
GLk1 spFv VH-VL (11)	9+4+5	77,7	0,2	80,1	0,1			2,4
GLk2 scFv VL-VH (12)	4x G4S	56,6	0,2	58,6	0,1	10,9	10,5	2,0
GLk2 spFv VL-VH (13)	9+4+5	67,6	0,3	69,2	0,1			1,6
GLk2 scFv VH-VL (14)	4x G4S	56,4	0,1	58,3	0,1	7,3	7,1	1,9
GLk2 spFv VH-VL (15)	6+4+6	63,7	0,3	65,4	0,1			1,7
CAT2200a scFv VL-VH (16)	4x G4S							
CAT2200a spFv VL-VH (17)	8+4+4							
CAT2200b scFv VL-VH (18)	4x G4S	54,7	0,3	57,6	0,0	12,0	11,7	2,9
CAT2200a spFv VL-VH (19)	9+4+4	66,7	0,3	69,3	0,0			2,6
CAT2200a scFv VH-VL (20)	4x G4S	52,6	0,3	56,4	0,0	12,9	11,4	3,8
CAT2200b spFv VH-VL (21)	9+4+4	65,5	0,3	67,9	0,0			2,4
ΔTm_1 (°C): Diferencia en Tm1 (spFv) y Tm1 (scFv)								
ΔTm_2 (°C): Diferencia en Tm2 (spFv) y Tm2 (scFv)								
$\Delta(Tm1-Tm2)$: Diferencia de Tm2 y Tm1 de un scFv o spFv								

5

Los CAT2200 spFv se probaron respecto de su unión a IL-17. La unión fue comparable cuando se comparó con los CAT2200 scFv.

6.3 Ejemplo 3: Verificación del engrapado correcto por cristalización de las moléculas de scFv y spFv generadas

Las proteínas se concentraron en sus respectivos reguladores: GLk1 spFv VL-VH a 8,67 mg/ml en MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM; GLk1 spFv VH-VL a 5 mg/ml en MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM; GLk2 spFv VH-VL a 8,66 mg/ml en Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM; cat2200b spFv VH-VL a MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM. Se estableció la cristalización para cada proteína en formato de gota sentada en bandejas de cristal Corning 3550 con el uso de un robot Mosquito. Cada pocillo contiene 100 nl de proteína y 100 nl de solución de reserva y se incubó contra 70 µl de reserva a 20 °C. Las soluciones de reserva son IH1 y IH2 en condiciones habituales así como PEG Ion Screen HT (Hampton Research). Algunas de las condiciones iniciales se refinaron variando los componentes de reserva en intentos de optimización. Se obtuvieron cristales de calidad de difracción para algunas proteínas de scFv y spFv. La **Tabla 7** muestra el resumen de las condiciones usadas. Los cristales se remojaron durante unos pocos segundos en el licor madre complementado con glicerol al 20 % y se congelaron instantáneamente en N₂ líquido. Los datos de rayos X se recolectaron en IMCA-CAT Beamline 17ID en Argonne National Lab.

Tabla 7.

Nombre de la molécula	Proteína	Condición de cristalización	¿Disulfuros?	Resolución (Å)
GLk1 spFv VL-VH	8,67 mg/ml, MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM	Acet de Na 0,1 M 4,5 de pH, 18 % p/v de PEG 3350, LiCl 1 M	sí	1,65
GLk1 spFv VH-VL	5 mg/ml, MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM	MES 0,1 M 6,5 de pH, 5 % v/v de PEG 400, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,75 M	sí	2,10
GLk2 spFv VH-VL	8,66 mg/ml, Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM	Acet de Na 0,1 M, pH 4,5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,75 M	sí	1,50

Nombre de la molécula	Proteína	Condición de cristalización	¿Disulfuros?	Resolución (Å)
CAT2200b spFv VH-VL	4,91 mg/ml, MES 25 mM, pH 6,0 NaCl 100 mM	Acet de Na 0,1 M pH 4,5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,5 M	sí	2,40
Complejo CAT2200a scFv VL-VH/IL-17	2,69 mg/ml, HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM	Tris 0,1 M, pH 8,5, 18 % de PEG3K, LiSO ₄ 0,2 M	no engrapado	2,30
Complejo CAT2200a spFv VL-VH/IL-17	6,0 mg/ml, HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM	PEG 3350 al 15,5 %, NaH ₂ PO ₄ 0,4 M	sí	2,00

6.3.1 Cristalización de CAT2200a scFv VL-VH y CAT2200a spFv VL-VH en complejo con IL-17

El complejo IL-17/ CAT2200a scFv VL-VH se generó al mezclar 333 µl de IL17

- 5 (sec. con núm. de ident.: 22) (1,5 mg/ml) con 1,74 ml de Cat2200a scFv (0,69 mg/ml) e incubar durante 3 horas a 4 °C. La mezcla se concentró con 10 kDa de concentrador Amicon Ultra de corte a aproximadamente 400 µL y se cargó sobre una columna Superdex75 equilibrada en NaCl 250 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5. Las fracciones correspondientes al complejo se agruparon y concentraron hasta un volumen de 150 µL.
- 10 La muestra se diluyó y concentró 4 veces: adición de 350 µL de NaCl 50 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5 y concentración hasta justo por debajo de 150 µL. El volumen se llevó hasta ~105 µL y se determinó que la concentración era de 2,69 mg/ml. La cristalización se configuró en un formato de gota sentada mediante el uso de un robot de cristalización Mosquito con 150 nl de proteína + 150 nl de reserva en placas Corning3550 contra 80 µL
- 15 de reserva, que es un conjunto de amortiguador y condiciones precipitantes preformuladas internamente. Las placas se incubaron a 20 °C. Una de las condiciones

(acetato de Na, pH 4,5, PEG 3K al 25 %, acetato de Am 0,2 M) produjo cristales muy pequeños. Estos se cosecharon y transformaron en semillas de cristalización con el uso de Hampton Seed Bead en 100 μ L de PEG 3350 al 27 %, acetato de amonio 200 mM, acetato de sodio 100 mM, pH 4,5 en un tubo Hampton Seed Bead.

- 5 Los cristales de calidad de difracción se obtuvieron por el mismo procedimiento con la excepción de la adición de las semillas anteriores: 150 nl de proteína + 100 nl de reserva + 50 μ l de semillas. Los cristales crecieron de Tris 0,1 M 8,5, PEG3K al 18 %, LiSO₄ 0,2 M y se transfirieron a un licor madre sintético (Tris 0,1 M, pH 8,5, PEG 3350 al 10 %, LiSO₄ 0,2 M y glicerol al 20 %) y se congelaron
- 10 instantáneamente en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X se recolectaron en IMCA-CAT ID17 en Argonne National Laboratory.

- El complejo IL-17/ CAT2200a spFv VL-VH se generó al mezclar 167 μ l de IL-17 (250 μ g) con 154 μ l MSCW274 (467 μ g en NaCl 250 mM, MES 20 mM, pH 6,5) y la incubación a 4 °C durante la noche. La mezcla se concentró en 0,5 ml de concentrador
- 15 de 10kDa MWCO Amicon Ultra hasta ~100 μ L, después se diluyó repetidamente y se concentró 5 veces: se concentró hasta ~150 μ L y se añadió 350 μ L de NaCl 50 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5. El volumen final fue de 100 μ L y la concentración del complejo se determinó en 6,0 mg/ml. La cristalización se configuró de manera similar a la del complejo scFv/IL-17 en gotas sentadas mediante el uso del robot Mosquito. La gota
- 20 sentada está compuesta por 150 nl de proteína + 120 nl de reserva + 30 nl de semillas (scFv/IL-17 anterior). La solución de reserva era un conjunto de condiciones que variaba la concentración de PEG 3350 y las sales. Las placas de cristalización se incubaron a 20 °C. Se obtuvo cristales pequeños de PEG 3350 al 15,5 %, NaH₂PO₄

0,4 M. Los cristales se transfirieron a PEG 3350 al 16 %, NaH₂PO₄ 0,2 M, glicerol al 20 % y LN₂ congelado instantáneamente. Los datos de difracción de rayos X se recolectaron en IMCA-CAT ID17 en Argonne National Laboratory.

Todos los datos de difracción de rayos X se procesaron con XDS (Kabsch *et al.*

5 (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt. 2):125-132; Monsellier and Bedouelle (2006) *J Mol Biol* 362:580-593) y CCP4 (Collaborative Computational Project, N. (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240-255). Todas las estructuras cristalinas se resolvieron mediante reemplazo molecular (RM) con el uso de Phaser (Read (2001) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 10):1373-1382) con modelos de homología generados en MOE (Montreal, Canada) excepto para el complejo scFv CAT2200a scFv VL-VH/IL-17, para el cual se usó la estructura de pdb id 2vxs (Gerhardt *et al.* (2009) *J Mol Biol* 394:905-921) como modelos de búsqueda. Los modelos estructurales se refinaron en PHENIX (Adams *et al.* (2004) *J Synchrotron Radiat* 11(Pt 1):53-55) y se ajustaron manualmente en Coot (Emsley *et al.* (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 4):486-501). Las figuras de los gráficos moleculares se generaron en PyMol ([www_schrodinger_com](http://www.schrodinger.com)).

6.3.2 Las estructuras

Las estructuras de las moléculas de scFv y spFv nounidas se muestran en la Figura 8, Figura 9, Figura 10 y Figura 11. La Figura 8 muestra la estructura de GLk1 spFv VL-VH. La Figura 9 muestra la estructura de GLk1 spFv VH-VL. La Figura 10 muestra la estructura de GLk2 spFv VH-VL. La Figura 11 muestra la estructura de CAT2200b spFv VH-VL. Las estructuras fueron consistentes con las estructuras típicas de Fv con ambos dominios de VL y VH empaquetados uno contra el otro. Generalmente, la mayoría de los residuos enlazadores se ordenaron y resolvieron en

los mapas de densidad de electrones. Los enlaces disulfuro entre la grapa y los puntos de anclaje se ordenaron generalmente bien en ambas orientaciones de VL-VH. Además de las estructuras de scFv y spFv no unidas, también intentamos revelar cualquier impacto estructural sobre la unión al antígeno. Las moléculas variantes de CAT2200 scFv y spFv se cristalizaron en complejo con su objetivo cognado, IL-17. Para los scFv y spFv de las variantes de CAT2200 cristalizadas, las estructuras fueron casi idénticas con y sin un objetivo unido (Figura 12, Figura 13, Figura 14). La Figura 12 muestra la comparación entre el CAT2200b spFv VH-VL no unido y el CAT2200a scFv VL-VH unido a IL-17. La Figura 13 muestra la comparación entre las vistas delanteras de las estructuras del CAT2200b spFv VH-VL no unido y el CAT2200a spFv VL-VH unido a IL-17. La Figura 14 muestra la comparación entre las vistas posteriores de las estructuras del CAT2200b spFv VH-VL no unido y el CAT2200a spFv VL-VH unido a IL-17. Las estructuras fueron también idénticas independientemente de la orientación o la presencia o ausencia de la grapa. La rmsd para todos los átomos de Ca coincidentes entre pares de estructuras fue muy pequeña: 0,41 Å entre spFv-VH-VL no unido y scFv-VL-VH unido al antígeno (Figura 12), 0,46 Å entre spFv-VH-VL no unido y spFv-VL-VH (Figura 13 y Figura 14, respectivamente) y 0,37 Å entre scFv unido y spFv unido. La evidencia estructural muestra que el engrapado funciona tal como se diseñó. También, el engrapado no tiene impacto en las estructuras de dominio de VL y VH o empaque de VL/VH relativo.

6.4 Ejemplo 4: Diseño de puntos de anclaje adicionales

El método descrito en el Ejemplo 1 se usó para identificar cualquier punto de anclaje adicional para engrapado. Se identificaron los siguientes puntos de anclaje:

Para la orientación VL-enlazador-VH: posición de Chothia en VL 42, 45 y 39 y posiciones de Chothia en VH 105, 5 y 3. En la **Figura 6**, los residuos de la VL en GLk1VL son K42, K45, K39 y los residuos de la VH en GLk1 son Q105, L5 y Q3. La grapa se forma entre cualquiera de las posiciones indicadas.

5 Para la orientación VH-enlazador-VL: posiciones de Chothia en VH 43, 40 y 46, posiciones de Chothia en VL 102, 5 y 3, la grapa se forma entre cualquiera de las posiciones.

Los spFv que tienen los puntos de anclaje descritos en este ejemplo se clonan, expresan y prueban respecto de la formación de la grapa y su termoestabilidad
10 mediante el uso de ensayos descritos en la presente descripción y en el Ejemplo 2.

6.5 Ejemplo 5: Medio engrapado

Se generaron y expresaron constructos que contenían una grapa, ya sea entre la VH y el enlazador o entre la VL y el enlazador. Los constructos generados se expresan, purifican y analizan mediante los métodos descritos en la presente descripción.

15 6.6 Ejemplo 6: Constructos multiespecíficos que comprenden spFv

Las moléculas de unión multiespecíficas ilustrativas que incorporan las estructuras de spFv proporcionadas en la presente descripción se construyeron y probaron en este ejemplo. Específicamente, los anticuerpos biespecíficos y moléculas de control, derivados de las secuencias de unión al antígeno que se muestran en la
20 **Tabla 8**, se expresaron transitoriamente en cultivos de suspensión de CHO en medio libre de suero/libre de componente animal, y se purificaron por cromatografía de afinidad de proteína A, seguido por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) preparatoria en una columna SUPERDEX 200 10/300 GL (GE

Healthcare) mediante el uso de un instrumento ÄKTA PURE (GE Healthcare). Las cadenas pesadas contenían mutaciones de “botón en ojal” (KiH, por sus siglas en inglés) para promover la heterodimerización (Ridgway *et al.*, *Protein Eng.* 9(7):617-21 (1996); Atwell *et al.*, *J. Mol. Biol.* 270(1):26-35 (1997); Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 16(7):677-81 (1998)). Los anticuerpos contenían el Fc de IgG1sigma que comprendía un conjunto de siete mutaciones de Fc - L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S y P331S - cuando se compararon con la IgG1 silvestre para reducir las interacciones del receptor de Fc (Tam *et al.*, *Antibodies* (2017)).

Los anticuerpos biespecíficos se generaron con mutaciones de IgG1sigma y con mutaciones KiH.

Tabla 8: Secuencias de unión objetivo usadas para los constructos del Ejemplo 6.

Designación del anticuerpo / ligando	Objetivo / receptor	VH o cadena 1	VL o cadena 2
LTBRmAb1 (BHA10)	LTBR humano	WO2004002431/sec. con núm. de ident.: 69	WO2004002431/sec. con núm. de ident.: 70
EDBmAb1* (L19)	Extradominio B (EDB) humano de fibronectina	WO9745544/sec. con núm. de ident.: 71	WO9745544/sec. con núm. de ident.: 72
B21M	RSV	Vafa O <i>et al.</i> (2014) Methods 65(1)/sec. con núm. de ident.: 73	Vafa O <i>et al.</i> (2014) Methods 65(1)/sec. con núm. de ident.: 74
MSLNmAb1	Mesotelina humana	EP2322560/sec. con núm. de ident.: 75	EP2322560/sec. con núm. de ident.: 76

*: El EDBmAb1(WO9745544) usado aquí es un anticuerpo anti-ED-B que se ha probado en la clínica, otros anticuerpos que se unen a ED-B o a dominios adyacentes se han descrito anteriormente (Carnemolla *et al. Int. J. Cancer* 68:397-405 (1996))

Las secuencias en la **Tabla 8** son las siguientes:

Sec. con núm. de ident.: 69 (VH BHA10)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVH
 AQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGTTVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 70 (VL BHA10)

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGQGGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 71 (VH L19)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTT
 10 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLLTVSS

Sec. con núm. de ident.: 72 (VL L19)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATG
 IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGGTKVEIK

15

Sec. con núm. de ident.: 73 (VH B21M)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDD
 KRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWGQGTLL
 VTVSS

20

Sec. con núm. de ident.: 74 (VL B21M)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHYQQKPGQPPKLLIYAASN
 PESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQIIEDPWTFGQGGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 75 (VH MSLNmAb1)

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGA
 SSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSST
 PVTVSS

5

Sec. con núm. de ident.: 76 (VL MSLNmAb1)

DIELTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGV
 PGRFSGSGSGNSYSLTISSTVEAEEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIK

10 La concentración de proteína se determinó por medición de la absorbancia a 280 nm (OD280) y se determinó el rendimiento de la purificación. La SEC analítica se realizó mediante el uso de una columna Bio SEC-5 (Agilent, tamaño de partícula de 5 µm, 300 Å) en un sistema de HPLC Thermo VANQUISH. Se cargó 10 µl de proteína purificada en la columna y la elución se registró mediante OD280.

15 La **Tabla 9** muestra una reseña de las propiedades estructurales de los anticuerpos biespecíficos y moléculas de control que se describen en este ejemplo. Las moléculas en negritas son moléculas ilustrativas de acuerdo con la invención, mientras que otras son controles para aspectos diferentes. La **Tabla 10** muestra propiedades estructurales de otro anticuerpo biespecífico comparativo, dirigido a
 20 LTBR y mesotelina (un antígeno asociado al tumor no presente en la matriz extracelular), como se describe en el Ejemplo 9.

Tabla 9: Reseña de las propiedades estructurales de los anticuerpos biespecíficos EDB/LTBR y moléculas de control

			Sitios de unión			Dominio Fc	Características de scFv			Comentarios
	Nombre	Formato	LTBRmAb1	EDBmAb1	B21M (mAb de control de isotipo)	Proteína A mut.*	Conector grapado	Disulfuro estabilizado	Orientación	
Anticuerpos asimétricos; formato 2:1	COVA1480	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	sí	sí	-	VH-VL	scFv fusionado al N-terminal de EDBmAb1 HC
	COVA1481	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	sí	sí	-	VL-VH	scFv fusionado al N-terminal de EDBmAb1 HC
	COVA1482	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	sí	sí	-	VH-VL	scFv fusionado al C-terminal de EDBmAb1 HC
	COVA1483	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	sí	sí	-	VL-VH	scFv fusionado al C-terminal de EDBmAb1 HC
	COVA1484	2:1	1 (scFv)	-	2 (mAb)	sí	sí	-	VH-VL	LTBR/control nulo a COVA1480
	COVA1485	2:1	1 (scFv)	-	2 (mAb)	sí	sí	-	VL-VH	LTBR/control nulo a COVA1481
	COVA1486	2:1	1 (scFv)	-	2 (mAb)	sí	sí	-	VH-VL	LTBR/control nulo a COVA1482 y a COVA14146
	COVA1487	2:1	1 (scFv)	-	2 (mAb)	sí	sí	-	VL-VH	LTBR/control nulo a COVA1483
	COVA14107	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	sí	sí	No	VH-VL	El scFv (fusión C-terminal a EDBmAb1 HC) contiene mutaciones para la afinidad reducida a LTBR (VL3: Y36F_S49Y_F87)
	COVA14108	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	sí	sí	No	VH-VL	El scFv (fusión C-terminal a EDBmAb1 HC) contiene mutaciones para la afinidad reducida a LTBR (VH_CDR1_Y33A)
	COVA14133	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	No	sí	No	VH-VL	scFv fusionado al C-terminal de EDBmAb1 HC
	COVA14136	2:1	1 (scFv)	-	2(mAb)	No	sí	No	VH-VL	LTBR/control nulo a COVA14133

*: mutaciones en la porción de Fc para suprimir la unión a la proteína A y facilitar la purificación de heterodímeros, descrita en el documento WO2010151792.

Tabla 10: Reseña de las propiedades estructurales del anticuerpo biespecífico

MSLN/LTBR

		Sitios de unión		Dominio Fc	Características de scFv			Comentarios
Nombre	Formato	LTBRmAb1	MSLNmAb1	Proteína A mut.	Conector grapado	Disulfuro estabilizado	Orientación	
COVA14146	2:1	1 (scFv)	2(mAb)	sí	sí	No	VH-VL	Fusión del C-terminal de la HC del scFv derivado de LTBRmAb1 a MSLNmAb1. La molécula de control de isotipo para este constructo es COVA1486

Los anticuerpos asimétricos, con una estequiometría 2:1 (todos IgG1sigma,

5 todos con mutaciones KiH), listados anteriormente se generaron de la siguiente manera:

- i. COVA1484 se generó por la coexpresión de la cadena pesada del anticuerpo B21M anti-RSV que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el N-terminal (orientación VH-VL sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de ident.: 78, que comprende la sec. con núm. de ident.: 79) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 80) y cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 81) del anticuerpo B21M anti-RSV (**Figura 15A**).

Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFVKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGF
 PYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI
 TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 78 (BHA10 engrapado en el N-terminal de HC B21M

(VH-VL), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGF
 5 PYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
 TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGG
 GSGGGGSGQITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGK
 ALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCA
 10 RLYGFTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEM
 15 TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 79 (botón de HC B21M (RSV) IgG1s con mutaciones

de pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 20 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
 FAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV

VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK

5 **Sec. con núm. de ident.: 80 (ojal de HC B21M (RSV) IgG1s)**

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
 FAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 10 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSL
 CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 **Sec. con núm. de ident.: 81 [LC B21M (RSV)]**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHYQQKPGQPPKLLIYAA
 SNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDESTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 20 ii. COVA1485 se generó por la coexpresión de la cadena pesada del anticuerpo B21M anti-RSV que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el N-terminal (orientación VL-VH sec. con núm. de ident.: 82) (sec. con núm. de ident.: 83, que comprende la sec. con núm. de ident.: 79) con la cadena pesada

(HC; Sec. con núm. de ident.: 80) y cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 81) del anticuerpo B21M anti-RSV (**Figura 15B**).

Sec. con núm. de ident.: 82 [scFv BHA10 engrapado (VL-VH)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASY
 5 RYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEI
 KGGSGGSGGCPPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYL
 HWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS
 LRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGCGTTVTVSS

**Sec. con núm. de ident.: 83 (BHA10 engrapado en el N-terminal de HCB21M
 10 (VL-VH), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASY
 RYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEI
 KGGSGGSGGCPPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYL
 HWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS
 15 LRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGCGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
 GSGGGGSQITLKESGPTLVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKA
 LEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAR
 LYGFTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
 20 VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMT

KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 79 (botón de HC B21M (RSV) IgG1s con mutaciones de pA)

5 QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
FAYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
10 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 80 (ojal de HC B21M (RSV) IgG1s)

15 QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
FAYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
20 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 81 [LC B21M (RSV)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
 SNPESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 5 SVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- iii. COVA1486 se generó por la coexpresión de la cadena pesada del anticuerpo B21M anti-RSV que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-terminal (orientación VH-VL sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de ident.: 84, que comprende la sec. con núm. de ident.: 79) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 80) y cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 81) del anticuerpo B21M anti-RSV (**Figura 15C**).

Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
 15 PYWGQGTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI
 TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 84 (BHA engrapado en el C-terminal de HC B21M (VH-VL), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMNMDPVDATYYCARLYGFTYG
 20 FAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT

KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
 5 QGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQ
 SGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVH
 AQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGFPYWGQG
 TTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ
 NVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
 10 EDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 79 (botón de HC B21M (RSV) IgG1s con mutaciones de pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVD TATYYCARLYGFTYG
 15 FAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
 20 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 80 (ojal de HC B21M (RSV) IgG1s)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
 FAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 5 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSL
 CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 **Sec. con núm. de ident.: 81 [LC B21M (RSV)]**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
 SNPESGVPRDFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 15 iv. COVA1487 se generó por la coexpresión de la cadena pesada del anticuerpo
 B21M anti-RSV que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-
 terminal (orientación VL-VH sec. con núm. de ident.: 82) (sec. con núm. de
 ident.: 85, que comprende la sec. con núm. de ident.: 79) con la cadena pesada
 (HC; Sec. con núm. de ident.: 80) y cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.:
 20 81) del anticuerpo anti-RSV B21M (**Figura 15D**).

Sec. con núm. de ident.: 82 [scFv BHA10 engrapado (VL-VH)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASY
 RYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEI

KGSGSGSGGCPPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYL
 HWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS
 LRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGCGTTTVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 85 (BHA engrapado en el C-terminal de HC B21M

5 (VL-VH), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
 FAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 10 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
 15 SPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASYRYSQVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGQGTKVEIKGGSGG
 SGGCPPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQA
 PGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA
 VYYCARSWEGFPYWGCGTTTVTVSS

20 **Sec. con núm. de ident.: 79** (botón de HC B21M (RSV) IgG1s con mutaciones
de pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG

FAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 5 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 80 (oial de HC B21M (RSV) IgG1s)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 10 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
 FAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 15 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL
 CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 81 [LC B21M (RSV)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
 20 SNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- v. COVA1480 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el N-terminal (orientación VH-VL sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de ident.: 86, que comprende la sec. con núm. de ident.: 87) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 88) y la cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 89) de un anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 (**Figura 15E**).

Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
PYWGQGTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 86 (BHA10 (VH-VL) engrapado con HC L19 N-terminal, IgG1s, botón, con mutaciones pA)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
PYWGQGTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPG
KGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CAKPFYPYFDYWGGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMT
 KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
 5 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 87 (botón de HC L19 IgG1s con mutaciones de pA)

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 10 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 15 NVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 88 (ojal de HC L19 IgG1s)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 20 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASS
5 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- vi. COVA1481 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el N-
10 terminal (orientación VL-VH sec. con núm. de ident.: 82) (sec. con núm. de ident.: 90, que comprende la sec. con núm. de ident.: 87) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 88) y la cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 89) de un anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 (**Figura 15F**).

Sec. con núm. de ident.: 82 [scFv BHA10 engrapado (VL-VH)]

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASY
RYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEI
KGGSGGSGGCPGCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTTYL
HWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS
LRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGCGTTVTVSS

20 **Sec. con núm. de ident.: 90 (BHA10 engrapado en el N-terminal de HC L19 (VL-VH), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASY
RYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEI

KGGSGGSGGCPPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYL
 HWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS
 LRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGCGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
 GSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGK
 5 GLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AKPFYFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 10 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK
 NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 87 (botón de HC L19 IgG1s con mutaciones de pA)

VQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 15 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 20 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 88 (ojal de HC L19 IgG1s)

EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAAS GFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 5 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 **Sec. con núm. de ident.: 89 (LC L19)**

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASS
 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 15 vii. COVA1482 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-terminal (orientación VH-VL sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de ident.: 91, que comprende la sec. con núm. de ident.: 87) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 88) y la cadena ligera (LC; Sec. con núm. de
 20 ident.: 89) de un anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 (**Figura 15G**).

Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF

PYWGGQTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITI
 TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 91 (BHA10 engrapado en el C-terminal de HC L19

5 (VH-VL), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISG
 SSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWG
 QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
 10 SCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
 RFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA
 15 SGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTST
 AYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGFPYWGQTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCG
 GGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSA
 YRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 87 (botón de HC L19 IgG1s con mutaciones de pA)

20 VQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV

DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 5 NVFSCSVMEALHNHFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 88 (oial de HC L19 IgG1s)

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 10 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQG
 15 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIIYYASS
 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 20 SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- viii. COVA1483 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-terminal (orientación VL-VH sec. con núm. de ident.: 82) (sec. con núm. de

ident.: 92, que comprende la sec. con núm. de ident.: 87) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 88) y la cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 89) de un anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 (**Figura 15H**).

Sec. con núm. de ident.: 82 [scFv BHA10 engrapado (VL-VH)]

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASY
RYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEI
KGGSGGSGGCPPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYL
HWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS
LRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGC GTTVTVSS

10 **Sec. con núm. de ident.: 92** (BHA10 engrapado en el C-terminal de HC L19
(VL-VH), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)

EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISG
SSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWG
QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
15 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
20 RFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKA
SQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
EDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKGGSGGSGGCPPCGSGGQVQLVQSGAE

VKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEK
FKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGCGTTVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 87 (botón de HC L19 IgG1s con mutaciones de pA)

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS

5 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
WGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
10 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 88 (ojal de HC L19 IgG1s)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS

15 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
WGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
20 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASS
 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDESTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 5 ix. COVA14107 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-terminal (orientación VH-VL, VL3 Y36F_S49Y_F87Y sec. con núm. de ident.: 93) (sec. con núm. de ident.: 94, que comprende la sec. con núm. de ident.: 87) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 88) y la cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 89) de un anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 (**Figura 15I**).

Sec. con núm. de ident.:93 [BHA10 (VH-VL) del scFv engrapado

(VL3 Y36F S49Y F87Y)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
 15 PYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
 TCKASQNVGINVAWFQQKPGKAPKSLIYSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTLT
 ISSLPEDFAVYYCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.:94 (BHA (VH-VL) engrapado en el C-terminal de HC

L19 (VL3 Y36F S49Y F87Y), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)

20 EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISG
 SSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK

SCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSAEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 5 RFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA
 SGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTST
 AYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCG
 GGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVGINVAWFQQKPGKAPKSLIYSAS
 YRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

10 **Sec. con núm. de ident.: 87 (botón de HC L19 IgG1s con mutaciones de pA)**

VQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 15 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

20 **Sec. con núm. de ident.: 88 (ojal de HC L19 IgG1s)**

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCA
 5 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASS
 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKR
 10 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- x. COVA14108 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-terminal (orientación VH-VL, VH_CDR1_Y33A sec. con núm. de ident.: 95) (sec. con núm. de ident.: 96, que comprende la sec. con núm. de ident.: 87) con la
 15 cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 88) y la cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 89) de un anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 (**Figura 15J**).

Sec. con núm. de ident.: 95 [scFv BHA10 (VH-VL) engrapado (VH_CDR1_Y33A)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYALHWVRQAPGCGLEWMGWI
 20 YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
 PYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI
 TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 96 (BHA10 (VH-VL) engrapado en el C-terminal de HC L19 (VH CDR1 Y33A), IgG1s, botón, con mutaciones de pA)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISG
SSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWG
5 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
10 ESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
RFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA
SGYTFTTYALHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFGRVTITADKSTST
AYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGFPYWGQGTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCG
GGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSAS
15 YRYS GVP SRFS GSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 87 (botón de HC L19 IgG1s con mutaciones de pA)

VQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
20 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 88 (ojal de HC L19 IgG1s)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
5 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
10 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASS
15 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- xi. COVA14133 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-
20 terminal (orientación VH-VL sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de ident.: 97, que comprende la sec. con núm. de ident.: 98) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 88) y la cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 89) de un anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 (**Figura 15K**).

Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFVKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGF
 PYWGQGTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
 5 TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISSLPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

**Sec. con núm. de ident.: 97 (BHA10 (VH-VL) engrapado en el C-terminal de
 HC L19, IgG1s, botón, sin mutaciones de pA)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISG
 10 SSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCAKPFYFDYWG
 QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
 SCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 15 ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
 ENSGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA
 SGYTFTTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFVKGRVTITADKSTST
 AYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGQGTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCG
 20 GGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSAS
 YRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 98 (botón de HC L19 IgG1s)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 5 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 **Sec. con núm. de ident.: 88 (oial de HC L19 IgG1s)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
 GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY
 WGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 15 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20 **Sec. con núm. de ident.: 89 (LC L19)**

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIIYYASS
 RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKR

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- xii. COVA14136 se generó por la coexpresión de la cadena pesada del anticuerpo anti-RSV B21M que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-terminal (orientación VH-VL, sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de ident.: 99, que comprende la sec. con núm. de ident.: 100) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 80) y cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 81) de un anticuerpo anti-EDB EDBmAb1 (**Figura 15L**).

Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
PYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 99 (BHA10 (VH-VL) engrapado en el C-terminal de HC B21M, IgG1s, botón, sin mutaciones de pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
FAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW

CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ
 SGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVH
 AQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQG
 5 TTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQ
 NVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
 EDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 100 (botón de HC B21M (RSV) IgG1s)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 10 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
 FAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 15 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 80 (ojal de HC B21M (RSV) IgG1s)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY
 20 WDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYG
 FAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV

VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL
 CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 **Sec. con núm. de ident.: 81 [LC B21M (RSV)]**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHVYQQKPGQPPKLLIYAA
 SNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 10 xiii. COVA14146 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo
 anti-mesotelina MSLNmAb1 que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en
 el C-terminal (orientación VH-VL sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de
 ident.: 101, que comprende la sec. con núm. de ident.: 102) con la cadena
 pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 103) y la cadena ligera (LC; Sec. con núm.
 15 de ident.: 104) de un anticuerpo anti-mesotelina MSLNmAb1 (**Figura 15M**).

Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
 PYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI
 20 TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

**Sec. con núm. de ident.: 101 (BHA10 (VH-VL) engrapado en el C-terminal de
 MSLNmAb1 HC, IgG1s, botón, con mutaciones de pA)**

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLIT
 PYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGR
 GFDYWGSSTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 5 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL
 WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLV
 10 QSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNV
 HAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQ
 GTTQVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS
 QNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
 PEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

15 **Sec. con núm. de ident.: 102 (MSLNmAb1 HC, IgG1s, botón, con mutaciones de pA)**

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLIT
 PYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGR
 GFDYWGSSTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 20 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL

WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHFTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 103 (ojal de HC MSLNmAb1 IgG1s)

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLIT
 5 PYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGR
 GFDYWGSGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 10 WLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSL
 SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 104 (LC MLSNmAb1)

DIELTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLA
 15 SGVPGRFSGSGSGNSYSLTISVVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Todos los constructos descritos anteriormente pudieron ser expresados y
 purificados con un alto rendimiento y pureza (ver la **Tabla 11** a continuación), lo que
 20 indica que los constructos biespecíficos que incorporan el spFv proporcionado en la
 presente descripción tienen buenas propiedades biofísicas.

Tabla 11: Rendimiento y purezas de biespecíficos EBD/LTBR seleccionados

Nombre del biespecífico	Descripción	Rendimiento [mg/L]	Pureza [% de monómero]
COVA1482	Heterodímero 2:1 que consiste en EDBmAb1 HC fusionado al scFv BHA10 engrapado (VH-VL) (contiene la mutación en la Fc que suprime la unión a la Proteína A para facilitar la purificación del heterodímero) apareado con EDBmAb1 HC y EDBmAb1 LC	53	100
COVA14133	Heterodímero 2:1 que consiste en EDBmAb1 HC fusionado al scFv BHA10 engrapado (VH-VL) apareado con EDBmAb1 HC y EDBmAb1 LC	64,3	100

6.7 Ejemplo 7: Activación de LTBR *in vitro* dependiente de EDB –

Ensayo de reporteros de luciferasa NF-κB

Para mostrar que los biespecíficos EDB/LTBR son capaces de activar LTBR

5 en forma dependiente del EDB, la actividad de los compuestos se probó en un ensayo de reporteros de luciferasa NF-κB de células A549 en presencia o ausencia de fibronectina que contiene EDB (EDB+ fibronectina). La señalización de NF-κB tiene un rol pivotal en la regulación del desarrollo celular y homeostasis inmunitaria. La activación de NF-κB a través de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR, por sus siglas en inglés) o los

10 miembros de la superfamilia de TNFR (p. ej., LTBR) se produce al acoplarse a sus ligandos respectivos. La línea de células epiteliales de pulmón A549 expresa naturalmente LTBR y el constructo de reporteros de luciferasa de NF-κB se integra establemente en el genoma de la línea de células epiteliales de pulmón A549. Después de la activación por estimulantes, los factores de transcripción de NF-κB endógenos se unen a los elementos

15 de respuesta al ADN para inducir la transcripción del gen de luciferasa.

Para demostrar la activación dependiente de EDB de LTBR, se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos de alta unión µClear (Greiner; Monroe,

NC) durante la noche con 150 ng/pocillo de dominios de EDB+ fibronectina recombinante humana 7-B-8-9 (EDB+; Sec. con núm. de ident.: 105) o 150 ng/pocillo de dominios de fibronectina recombinante humana 7-8-9 (EDB-; Sec. con núm. de ident.: 106), cuyas secuencias se enumeran a continuación.

5

Sec. con núm. de ident.: 105 (dominios de fibronectina 7B89)

PLSPPTNLHLEANPDTGVLTVSWERSTTPDITGYRITTTPTNGQQGNSLEEVV
 HADQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVKDDKESVPISDTIPEVPQLTDLFSVDITD
 SSIGLRWTPLNSSTIIGYRITVVAAGEGIPIFEDFVDSSVGYYTVTGLEPGIDYDI
 10 SVITLINGGESAPTTLTQQTAVPPPTDLRFTNIGPDTMRVTWAPPPSIDLTNFLV
 RYSPVKNEEDVAELSISPSDNAVVLTNLLPGTEYVVS SVSSVYEQHESTPLRGR
 QKTGLDSPTGIDFSDITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEHFSGRPREDRVP
 HSRNSITLTNLTPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGQQSTHHHHHH

15

Sec. con núm. de ident.: 106 (dominios de fibronectina 789)

PLSPPTNLHLEANPDTGVLTVSWERSTTPDITGYRITTTPTNGQQGNSLEEVVHA
 DQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVKDDKESVPISDTIIPAVPPPTDLRFTNIGPDTMR
 VTWAPPPSIDLTNFLVRYSPVKNEEDVAELSISPSDNAVVLTNLLPGTEYVVS SVSS
 VYEQHESTPLRGRQKTGLDSPTGIDFSDITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEH
 20 FSGRPREDRVP HSRNSITLTNLTPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGQQSTHHHHHH

Después de la incubación durante la noche, las placas recubiertas se lavaron con PBS y se bloquearon durante 2 horas a 37 °C con medio de ensayo (DMEM + FBS

inactivado con calor al 10 %). Una serie de dilución 1:5 de los compuestos a ensayar se preparó en medio de ensayo como materias primas de concentración duplicada (las concentraciones finales probadas variaron de 200 nM a 2,6 pM). Se añadió 50 µl de compuestos diluidos a la placa prebloqueada después de que la solución de bloqueo se extrajo por aspiración. Se añadió 50 µl de una suspensión de células A549 (concentración de suspensión celular = 0,4 Mio células /ml de medio de ensayo) a cada pocillo (20.000 células/pocillo). Las células A549 se separaron previamente del frasco de cultivo celular mediante el uso de Accutase/EDTA y, después, se transfirieron a medio de ensayo. Las células se incubaron con los compuestos durante 18-20 horas a 37 °C/CO₂ al 5 %.

Después de la incubación durante 18 horas, se usó el sistema de ensayo de luciferasa BIO-GLO (Promega; Madison, WI) para detectar la actividad de la luciferasa. La luminiscencia se midió con el uso de un instrumento TECAN M1000 Pro con un tiempo de integración de 500 milisegundos. De las unidades de luz relativa (RLU) resultantes, las veces de inducción de la señalización de LTBR se calculó de la siguiente manera: Veces de inducción = $\text{RLU de las células}_{\text{estimuladas}} / \text{RLU promedio de las células}_{\text{no estimuladas}}$ (las células no estimuladas se incluyeron como control en cada placa probada).

Las curvas de respuesta a la dosis, que incluyen las desviaciones estándar, se graficaron con el uso de GRAPHPAD Prism y los ajustes no lineales se aplicaron (log(agonista) vs. respuesta (pendiente variable - tres parámetros)), si corresponde.

Para ajustarse a los datos, los valores de x (concentraciones de compuestos) se transformaron con el uso de la función $X=\text{Log}(x)$ del GRAPHPAD Prism.

COVA1482 se comparó en el mismo ensayo reportero de A549 NF-κB con COVA1456. COVA1482 difiere de COVA1456 solo en el método de estabilización usado

para el scFv. El scFv en COVA1482, que también se derivó de LTBRmAb1, se estabilizó con el uso de la plataforma engrapada descrita en la presente descripción (es decir, estabilizada a través del enlace disulfuro de VH/enlazador y enlazador de VL), en donde COVA1456 es disulfuro estabilizado entre la VH y la VL (es decir, estabilizado a través del enlace disulfuro de VH/VL). La **Figura 16A** mostró que tanto COVA1482 como COVA1456 5 activaron potentemente LTBR en una forma dependiente de EDB. Los controles de isotipo correspondientes COVA1486 y COVA1462 no activaron el LTBR (**Figura 16A**). Estos resultados demuestran que la incorporación de spFv en una molécula multiespecífica no tuvo ningún impacto negativo sobre la actividad de la molécula multiespecífica. Los anticuerpos EDB/LTBR biespecíficos 2:1 (COVA1482 o COVA1456) mostraron una 10 potencia incrementada en la inducción de la señalización de NF- κ B en este ensayo de reporteros. La EC_{50} promedio calculada para COVA1482 en varios ensayos con la misma configuración experimental fue de aproximadamente $30 \text{ pM} \pm 10 \text{ pM}$, mientras que un constructo heterodimérico 1:1 de control mostró una EC_{50} de aproximadamente 3 nM en el 15 ensayo (los datos no se muestran aquí), lo que indica que los biespecíficos 2:1 pueden ser 100 veces más potentes que los biespecíficos 1:1. Esto podría explicarse por la mayor agrupación del sitio de unión de LTBR lograda con 2 sitios de unión al TAA.

Para estudiar los efectos de la afinidad a LTBR sobre la capacidad de tales biespecíficos para activar LTBR de manera dependiente de TAA, se generaron 20 variantes de menor afinidad (sec. con núm. de ident.: 107, $KD \approx 60 \text{ nM}$ y sec. con núm. de ident.: 108, $KD \approx 600 \text{ nM}$) del fragmento de scFv derivado de LTBRmAb1 y se usaron para construir los biespecíficos 2:1 COVA14107 y COVA14108 (ver la **Tabla 9**).

Sec. con núm. de ident.: 107 [BHA10 (VH-VL) del scFv engrapado**(VL3 Y36F S49Y F87Y)]**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
 5 PYWGQGTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
 TCKASQNVGINVAWFQQKPGKAPKSLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
 ISSLQPEDFATYYCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 108 [BHA10 (VH-VL) del scFv engrapado**(VH CDR1 Y33A)]**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYALHWVRQAPGCGLEWMGWI
 YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
 PYWGQGTTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
 TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTL
 15 TISSLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Los biespecíficos generados se probaron en el ensayo de reporteros NF- κ B A549 para ver los efectos de la afinidad en la activación de LTBR. La **Figura 16B** mostró que la menor afinidad a LTBR correspondía a una menor capacidad del biespecífico para activar LTBR en forma dependiente de TAA en este ensayo. Los
 20 datos también demostraron que la incorporación de spFv en una molécula multiespecífica no tuvo ningún impacto negativo sobre la actividad de la molécula.

Como se mencionó en el Ejemplo 6, las mutaciones (WO2010151792) para suprimir la unión a la Proteína A (usada para la purificación de anticuerpos) se

introdujeron en el Fc de algunos constructos para facilitar la purificación del heterodímero deseado. Se generó COVA14133 sin estas mutaciones, y su actividad se comparó con COVA1482 para mostrar que las mutaciones en la región Fc no influyeron sobre la actividad del biespecífico. COVA14133 y COVA1482 y sus

5 controles de isotipo respectivos COVA14136 y COVA1486 se compararon en el ensayo de reporteros de A549 NF- κ B. La **Figura 16C** mostró que COVA14133 activó el LTBR en una forma dependiente de TAA con una eficacia similar a COVA1482, lo que demuestra que las mutaciones en el Fc no afectaron la capacidad del biespecífico para activar LTBR y no tuvieron ningún efecto sobre el funcionamiento del spFv.

10 En conclusión, se mostró que COVA14133 tiene una excelente capacidad para activar LTBR de manera dependiente de TAA.

6.8 Ejemplo 8: Activación de LTBR *in vitro* dependiente de EDB – ensayo de células en cocultivo de A375/WI38VA subline2RA

El ensayo de cocultivo de A375/WI38VA subline2RA se realizó para verificar si la

15 activación de LTBR en presencia de EDB+ fibronectina (producida y depositada en la matriz extracelular por células WI38VA (Zardi, L., *et al.*, *EMBO J*, 6, 2337-42 (1987)) conduce a la liberación de citocinas y quimiocinas y a la regulación positiva de la molécula de adhesión ICAM-1 en las células A375 y que la incorporación de spFv no tiene un efecto negativo en la actividad. Las células WI38VA subline2RA (ATCC® CCL75.1™) fueron

20 sembradas en una placa de 96 pocillos en una densidad de 5000 células/pocillo y se incubaron durante 48 horas en su medio de crecimiento (MEM sin Glutamina + FBS inactivado con calor al 10 % + NEAA 0,1 mM + L-Gln 2 mM + piruvato de sodio 1 mM) a 37 °C/CO₂ al 5 %. Una serie de dilución 1:5 de los compuestos a ensayar se preparó en

medio de ensayo (DMEM + FBS inactivado con calor al 10 %) como materias primas de concentración duplicada (las concentraciones finales probadas variaron de 40 nM a 0,5 pM). Antes de la incubación en el cocultivo con las células WI38VA subline2RA se marcó células A375 (ATCC® CRL-1619™) con violeta CELLTRACE (CTV, Invitrogen; Carlsbad, CA). Para el etiquetado se incubó una suspensión celular, con una concentración de 5 10×10^6 células/ml y 2,5 μ M de CTV en FBS al 5 % en PBS durante 5 minutos a TA mientras se protegía de la luz. Después, las células se lavaron y resuspendieron en medio de ensayo en una densidad de $0,4 \times 10^6$ células/ml. La extracción cuidadosa del medio de cultivo de la placa que contenía el cultivo de WI38VA subline2RA de 48 horas fue seguida 10 por la adición de 50 μ l de suspensión de células A375 (20.000 células/pocillo; CTV+ o CTV-) en cada pocillo. Se añadió 50 μ l de los compuestos diluidos en serie (volumen final por pocillo 100 μ l) a las células y se incubó durante 24 horas a 37 °C/CO₂ al 5 %.

Después de la incubación durante 24 horas, los sobrenadantes se depuraron por centrifugación y se almacenaron para la medición de citocinas y quimiocinas con 15 el uso de ensayos de MSD. Las células se procesaron aún más para la medición ICAM-1 por citometría de flujo.

6.8.1 Detección de ICAM-1 por citometría de flujo

Cualquier medio restante en la placa de 96 pocillos se eliminó cuidadosamente, las células se separaron con Accutase, se transfirieron a una placa 20 de 96 pocillos DeepWell (los triplicados se agruparon en 1 pocillo), se lavaron, se resuspendieron en 100 μ l de regulador FACS (PBS + FBS al 1 % + NaN₃ al 0,1 %) y se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo. El anticuerpo, es decir, ICAM-1 antihumano marcado con PE (clon 1H4, Thermo; Waltham, MA) o el

anticuerpo de control de isotipo marcado con PE (MPC-11, BioLegend; San Diego, CA) y la tinción casi IR fijable LIVE/DEAD (Invitrogen), tinción única o tinción combinada se diluyó como se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Esquema de dilución de tinción simple o tinción combinada en regulador de

5 FACS

	Anticuerpo o tinción	Concentración final usada (µg/ml)	Factor de dilución
Tinciones simples	ICAM-1	1,25	20
	Control de isotipo	1,25	160
	Vivas/Muertas	-	400
Combo de tinción ICAM-1+VIVAS/MUERTAS	ICAM-1	1,25	20
	Vivas/Muertas	-	400

Las células se centrifugaron a 400 x g a 4 °C durante 4 minutos, el sobrenadante se desechó, y se preparó 50 µl de soluciones de anticuerpo como se describe en la **Tabla 12**. Las células y los anticuerpos se incubaron en la oscuridad a 4 °C durante 30 minutos. Después de la incubación se añadió 120 µl en cada pocillo y, después, las células se centrifugaron a 400 x g a 4 °C durante 4 minutos. Las células se lavaron una vez con regulador de FACS, se centrifugaron y se resuspendieron en 90 µl de regulador de FACS. Después, las células se fijaron mediante la adición de 90 µl de una solución de formalina al 3,7 % en PBS y se incubaron durante 15 minutos sobre hielo en la oscuridad. Después de la fijación, las células se centrifugaron a 400 x g a 4 °C durante 4 minutos y se resuspendieron en 100 µl de regulador de FACS. Las células se midieron con el uso de un instrumento MACS Quant a un régimen de flujo alto en modo de tamiz, 49 µl/pocillo de adquirieron. Los datos se analizaron con el uso del software FLOWLOGICS (versión 700.2A) y se graficaron con GRAPHPAD Prism.

6.8.2 Medición de citocinas en los sobrenadantes de células tratadas usando la plataforma MSD

Varias citocinas que se conoce están bajo el control de la señalización de NF- κ B se midieron con el uso de la plataforma MSD y placas MSD multiplex. Aquí se

5 enumeran algunos ejemplos de citocinas medidas:

- RANTES: con el uso de R-Plex Antibody Set human RANTES (MSD);
- I-TAC, IP-10, MIP-3b: con el uso del ensayo de liberación de citocinas 3-PLEX (MSD);
- IL-8, IP-10, MIP-3b: con el uso del ensayo de liberación de citocinas 3-PLEX (MSD); y
- 10 ▪ IL-12p70, IL-6, TNF- α , MIP-3a, SDF-1a: con el uso del ensayo de liberación de citocinas 5-PLEX (MSD)

La concentración de citocinas en el sobrenadante de células tratadas se midió mediante el uso de la plataforma MSD siguiendo las instrucciones del

15 fabricante. Brevemente, el protocolo incluyó las siguientes etapas:

(1) Preparación de la placa que implicó el recubrimiento de la placa proporcionada con los anticuerpos de captura acoplados al enlazador. Las placas se incubaron con agitación durante la noche a 2-8 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBST (PBS más Tween-20 al 0,05 %) con el uso de un lavador de placas

20 (Biotek; Winooski, VT);

(2) Preparación de una solución de anticuerpos de detección y estándar calibradora;

(3) Los sobrenadantes se diluyeron 1:3 o 1:5 dependiendo de la disponibilidad de material.

6.8.3 Protocolo de ensayo:

- Etapa 1: La muestra o el estándar de calibración se añadió a la placa, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora mientras se agitaba;
- Etapa 2: Las placas se lavaron, y se añadió el anticuerpo de detección. Las placas se incubaron con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente
- Etapa 3: Las placas se lavaron y se añadió el regulador T de lectura 2x.

La placa se analizó en un instrumento MSD

Los datos se analizaron con el uso del Software MESOSCALE (programa de la plataforma de trabajo del MSD discovery v 4.0.12.1) y se graficaron con el uso de GRAPHPAD Prism.

6.8.4 Resultados - Detección de ICAM-1 por citometría de flujo

Anteriormente se mostró que la señalización de NF-κB puede llevar a la regulación positiva de ICAM-1 en la superficie de células (da Silva Antunes, *et al. Front Immunol*, 9:576, (2018)). Por lo tanto, se midieron los niveles de la expresión de ICAM-1 en la superficie de células A375 después de la incubación por cocultivo con biospecíficos EDB/LTBR. Como ejemplo, la **Figura 17** muestra la regulación positiva de ICAM-1 después de la incubación con el biospecífico de EDB/LTBR COVA1482, lo que demuestra la funcionalidad del spFv que se une a LTBR. La molécula de control de isotipo COVA1486 no causó la regulación positiva de ICAM-1. Estos hallazgos indicaron que la capacidad para agrupar el scFv de LTBR a través de la unión a EDB era un requisito previo para la activación de LTBR y, como consecuencia, la regulación positiva de ICAM-1.

6.8.5 Resultados - Medición de citocinas en los sobrenadantes de células tratadas

Varias citocinas y quimiocinas, que se expresan como resultado de la activación de LTBR se midieron en el sobrenadante de los cocultivos tratados con
 5 bienespecíficos EDB/LTBR y moléculas de control como se describió anteriormente. Las **Figuras 18A-18D** muestran 4 ejemplos representativos de citocinas (**Figura 18A:** RANTES, **Figura 18B:** IL-6, **Figura 18C:** IL-8 y **Figura 18D:** MIP-3b) que se regularon positivamente por la activación de LTBR con COVA14133. El scFv derivado de LTBRmAb1 no dirigido en COVA14136 no activó LTBR y, como consecuencia, la
 10 concentración de citocinas en el sobrenadante no aumentó por encima del fondo. El fondo se representó por el nivel logrado con el anticuerpo B21M o COVA1440 (un mAb de control de isotipo 2(mAb) B21M) (mostrado como una concentración única en los gráficos). Los resultados demuestran que el spFv de unión a LTBR es funcional *in vitro*.

En conjunto, la regulación positiva de ICAM-1 y la secreción de citocinas al
 15 producirse la activación de LTBR confirmaron los efectos esperados en las células que puede tener la activación de LTBR.

En este ejemplo se demostró que las moléculas proporcionadas en la presente descripción lograron una actividad eficaz dependiente del antígeno asociado al tumor (aquí fibronectina que contiene EDB) de LTBR.

20 **6.9 Ejemplo 9: Activación de LTBR *in vitro* dependiente de mesotelina – ensayo celular en cocultivo con células reporteras A549 NF-κB y CHOK1-huMSLN o H226**

En los Ejemplos 7 y 8, se demostró que los anticuerpos biespecíficos que comprenden estructuras de spFv proporcionadas en la presente descripción, EDB de direccionamiento (un antígeno asociado al tumor en la matriz extracelular) y LTBR, activaron LTBR muy eficazmente en una forma dependiente del antígeno tumoral.

5 Para verificar si este hallazgo sigue siendo verdadero para cualquier antígeno tumoral independientemente de su ubicación (depositado en la matriz extracelular o en la superficie celular de células tumorales), se diseñó y produjo un anticuerpo biespecífico 2:1 dirigido a la mesotelina (MSLN), un antígeno asociado a un tumor expresado en diferentes tipos de tumor (Hassan and Ho, *Eur. J. Cancer*, 44:46-53
10 (2008)) y LTBR como se describe en el Ejemplo 6. COVA14146 es un anticuerpo biespecífico 2:1 MSLN/LTBR que consiste en un anticuerpo anti-mesotelina (MSLNmAb1) fusionado a un fragmento de spFv derivado de LTBRmAb1. Para mostrar si un anticuerpo biespecífico de LTBR dirigido a LTBR y un antígeno asociado a un tumor presentes de la superficie celular de células tumorales (p. ej., mesotelina)
15 fue capaz de activar LTBR eficazmente de manera dependiente del tumor se usó un ensayo de células en cocultivo. Los ensayos en cocultivo usados fueron el ensayo de células de reporteros de luciferasa NF-κB de células A549 (descrito en el Ejemplo 7) y células H226 (línea de célula de mesotelioma; ATCC® CRL-5826) que se conoce expresa mesotelina (Fan *et al. Mol. Canc. Ther.* 1:595–600 (2002)) y LTBR.

20 **6.9.1 Preparación de células H226**

Se sembraron 10.000 células por pocillos (en 75 µl de medio de ensayo: DMEM + FBS-HI al 10 %) de una suspensión de células H226 (expresa aproximadamente 200.000 copias de mesotelina y 10.000 copias de LTBR) en una

placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se incubaron durante 6 horas a 37 °C/CO₂ al 5 % en su medio de crecimiento (MEM + glutamina 2 mM + FBS-HI al 10 % + 10 µg/ml de puromicina y RPMI-1640 + FBS al 10 % + piruvato de Na 1 mM respectivamente) para permitir que las células se acoplen a la placa.

5 **6.9.2 Preparación de los compuestos**

Los compuestos se probaron en un rango de concentración de 100 nM a 1,3 pM. Se preparó una dilución en serie de 1 en 5 por cuádruplado de los compuestos en medio de ensayo (DMEM + FBS-HI al 10 %) y se almacenó a 4 °C hasta el uso.

6.9.3 Preparación y adición de células reporteras A549

10 Las células reporteras A549 se separaron del frasco de cultivo celular con Accutase/EDTA y se transfirieron al medio de ensayo (DMEM + FBS-HI al 10 %). Después de agregar un total de 20.000 células reporteras A549 por pocillo a las placas que contenían células H226, se añadió 50 µl de los compuestos prediluidos a cada pocillo y se incubó durante 20 horas a 37 °C/CO₂ al 5 %.

15 **6.9.4 Medición de luminiscencia en cocultivos tratados**

Después de la incubación durante 20 horas, se usó el sistema de ensayo de luciferasa BIO-GLO (Promega; Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detectar la actividad de la luciferasa. La luminiscencia se midió con el uso de un instrumento TECAN M1000 Pro con un tiempo de integración de 500
20 milisegundos. De las unidades de luz relativa (RLU) resultantes, las veces de inducción de la señalización de LTBR se calculó de la siguiente manera: Veces de inducción = $RLU_{\text{de las células estimuladas}} / RLU_{\text{promedio de las células no estimuladas}}$ (las células no estimuladas se incluyeron como control en cada placa probada).

Las curvas de respuesta a la dosis, que incluyen las desviaciones estándar, se graficaron con el uso de GRAPHPAD Prism y los ajustes no lineales se aplicaron (log(agonista) vs. respuesta (pendiente variable - tres parámetros)), si corresponde. Para ajustarse a los datos, los valores de x (concentraciones de compuestos) se transformaron con el uso de la función $X=\text{Log}(x)$ del GRAPHPAD Prism.

6.9.5 Medición de citocinas en los sobrenadantes de células tratadas con el uso de la plataforma MSD

Varias citocinas que se conoce están bajo el control de la señalización de NF- κ B pueden medirse con el uso de la plataforma MSD y placas MSD multiplex.

Como un ejemplo, el método para la medición de RANTES con el uso de R-Plex Antibody Set human RANTES (MSD) se describe en la presente descripción.

La concentración de RANTES en el sobrenadante de células tratadas se midió mediante el uso de la plataforma MSD siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el protocolo incluyó las siguientes etapas:

(1) Preparación de la placa que implicó el recubrimiento de la placa proporcionada con los anticuerpos de captura acoplados al enlazador. Las placas se incubaron con agitación durante la noche a 2-8 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBST (PBS más Tween-20 al 0,05 %) con el uso de un lavador de placas (Biotek; Winooski, VT);

(2) Preparación de una solución de anticuerpos de detección y estándar calibradora;

(3) Los sobrenadantes se diluyeron 1:3 o 1:5 dependiendo de la disponibilidad de material.

6.9.6 Protocolo de ensayo:

- Etapa 1: La muestra o el estándar de calibración se añadió a la placa, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora mientras se agitaba;
- Etapa 2: Las placas se lavaron, y se añadió el anticuerpo de detección. Las placas se incubaron con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente
- Etapa 3: Las placas se lavaron y se añadió el regulador T de lectura 2x.

La placa se analizó en un instrumento MSD

Los datos se analizaron con el uso del Software MESOSCALE (programa de la plataforma de trabajo del MSD discovery v 4.0.12.1) y se graficaron con el uso de GRAPHPAD Prism.

6.9.7 Resultados – Activación de LTBR dependiente de mesotelina en células reporteras A549 / ensayo de cocultivo de H226

Se realizó un ensayo de cocultivo con células reporteras A549 y células H226 para verificar si COVA14146 fue capaz de activar LTBR en un sistema más fisiológico, donde, se espera que, debido a su amplia expresión (Lukashev, *et al. Cancer Res.*, 66(19):9617-24 (2006), LTBR y la mesotelina (y otros antígenos asociados al tumor en la superficie celular de células tumorales, p. ej., EGFR) se coexpresen en la superficie celular de células tumorales. En la **Figura 19A** se mostró que en estas condiciones COVA14146 no activó LTBR eficazmente. Las concentraciones RANTES secretadas en los sobrenadantes de células tratadas se midieron para confirmar la incapacidad de COVA14146 para activar LTBR eficazmente. Como se esperaba, la **Figura 19B** muestra que RANTES fue secretado por células tratadas con COVA14146 en la misma

medida que las células que fueron tratadas con la molécula de control de isotipo COVA1486, lo que confirma que LTBR no puede activarse en estas condiciones.

6.10 Ejemplo 10: Anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a LTBR y otras TAA presentes en la matriz extracelular

5 Los ejemplos anteriores demostraron que los anticuerpos biespecíficos dirigidos a LTBR y un TAA expresado en la matriz extracelular, en ese caso EDB de fibronectina, pueden activar LTBR selectivamente en tejido tumoral que expresa EDB. Este ejemplo demostró que esto se aplica más generalmente a anticuerpos biespecíficos dirigidos a LTBR y otra TAA presente en la matriz extracelular, al proporcionar dos ejemplos más de
10 tales TAA, es decir, el dominio A2 de tenascina C y el extradominio A de fibronectina.

Siguiendo generalmente los métodos descritos en los ejemplos anteriores se prepararon otros anticuerpos biespecíficos que se unen a LTBR y otros TAA presentes en la matriz extracelular, a saber el dominio A2 de tenascina C (TnCA2) o el extradominio A de fibronectina (EDA). La secuencia de estos TAA se ha descrito, por ejemplo, en:

- 15
- TnCA2: número de acceso de UniProt P24821.3;
 - EDA: número de acceso de UniProt P02751.

Además, los anticuerpos contra estos TAA se han descrito anteriormente, por ejemplo, en:

- 20
- TnCA2: WO2011/020783;
 - EDA: la patente núm. EP2142567.

Las secuencias ilustrativas de los dominios de unión contra estos objetivos usados para el presente ejemplo (mediante la combinación con un LTBR scFv para crear una molécula de unión multiespecífica de la invención) se proporcionan como:

- TnCA2: VH sec. con núm. de ident.: 109 y VL de la sec. con núm. de ident.: 110;
- EDA: VH sec. con núm. de ident.: 111 y VL de la sec. con núm. de ident.: 112.

Estas secuencias son las siguientes:

5 **Sec. con núm. de ident.: 109 (VH de Anti-TnCA2 Ab 2B10)**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII
PIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLYGYAYY
GAFDYWGQGTTVTVSS

10 **Sec. con núm. de ident.: 110 (VL de Anti-TnCA2 Ab 2B10)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSL
QSGVPSRFSGGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQNGLQPATFGQGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 111 (VH Anti- EDA Ab F8)

15 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLF
DYWGQGTLVTVSS

Sec. con núm. de ident.: 112 (VL Anti-EDA Ab F8)

20 EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIK

Los anticuerpos biespecíficos que se unen a LTBR y estos TAA se prepararon y probaron para la activación de LTBR específica de TAA en una activación de LTBR *in vitro* dependiente de TAA – ensayo de reporteros de luciferasa NF- κ B de acuerdo con un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 7.

5 Los anticuerpos asimétricos, con una estequiometría 2:1 se generaron de la siguiente manera:

COVA14198 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo anti-EDA que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-terminal (orientación VH-VL sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de ident.: 113, que
10 comprende la sec. con núm. de ident.: 114) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 115) y cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 116) de un anticuerpo anti-EDA. Las secuencias se enumeran a continuación.

Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
PYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI
TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

20

Sec. con núm. de ident.: 113 (F8 HC con scFv engrapado al BHA10 (VH-VL) fusionado al C-ter, IgG1 sigma, mutaciones de botón)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
 GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLF
 DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 5 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQ
 10 SGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVH
 AQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGQG
 TTVTVSSGGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ
 NVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
 EDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 114 (F8 HC,IgG1 sigma, mutaciones de botón)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
 GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLF
 DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 20 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW

CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 115 (F8 HC, IgG1 sigma y mutaciones de ojal)

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLF
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
10 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSL
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 **Sec. con núm. de ident.: 116 (F8 LC)**

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

El COVA14202 se generó por la coexpresión de una cadena pesada del anticuerpo antidominio A2 de tenascina C que tiene una fusión de scFv BHA10 engrapado en el C-terminal (orientación VH-VL sec. con núm. de ident.: 77) (sec. con núm. de ident.:

117, que comprende la sec. con núm. de ident.: 118) con la cadena pesada (HC; Sec. con núm. de ident.: 119) y cadena ligera (LC; Sec. con núm. de ident.: 120) de un A2 antidominio del anticuerpo de tenascina C. Las secuencias se enumeran a continuación.

5 **Sec. con núm. de ident.: 77 [scFv BHA10 grapado (VH-VL)]**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWI
YPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGF
PYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
TCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTL
10 TISSLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

Sec. con núm. de ident.: 117 (2B10 HC con scFv engrapado al BHA10 (VH-VL) fusionado al C-ter, IgG1 sigma, mutaciones de botón)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII
15 PIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLYGYAYY
GAFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
20 DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQ
LVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPG

NVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGFPYW
 GQGTTVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK
 ASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 LQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGCGTKVEIK

5

Sec. con núm. de ident.: 118 (2B10 HC, IgG1 sigma, mutaciones de botón)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII
 PIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARLYGYAYY
 GAFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 10 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
 SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS
 LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 15 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sec. con núm. de ident.: 119 (2B10 HC, IgG1 sigma y mutaciones de ojal)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII
 PIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARLYGYAYY
 20 GAFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
 SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS
 LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 **Sec. con núm. de ident.: 120 (2B10 LC)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSL
 QSGVPSRFSGGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQNGLQPATFGQGTKVEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

Para demostrar la activación dependiente de TAA de LTBR, se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos de alta unión µClear (Greiner; Monroe, NC) durante la noche con:

- 150 ng/pocillo de dominios de tenascina C que contienen A2 (A2⁺) de dominio recombinante A1-A2-A3 (TnCA2⁺; Sec. con núm. de ident.: 121) o 150 ng/pocillo de dominios de tenascina recombinante humana A1-A3 (es decir, que carecen del dominio A2, indicados como A2⁻) (TnCA2⁻; Sec. con núm. de ident.: 122); o
- 150 ng/pocillo de dominios de fibronectina que contienen EDA (EDA⁺) recombinante 11-A-12 (EDA⁺; Sec. con núm. de ident.: 123) o 150 ng/pocillo de dominios de fibronectina recombinante humana 11-12 (es decir, que no contienen EDA, indicados como EDA⁻) (EDA⁻; Sec. con núm. de ident.: 124).

Las secuencias mencionadas anteriormente son las siguientes:

Sec. con núm. de ident.: 121 (dominios C de tenascina Hu A1-A2-A3, que incluyen (His)₆- Tag para purificación)

EQAPELENLTVTEVGWDGLRLNWTAAADQAYEHFIIQVQEANKVEAARNLTVPG
SLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIIQGYRTPVLSAEASTGETPNLGEVVVAEVGW
5 DALKLNWTAPEGAYEYFFIIQVQEADTVEAAQNLTVPGLRSTDLPGLKAATHY
TITIRGVTQDFSTTPLSVEVLTEEVPDMGNLTVTEVSWDALRLNWTPDGT
QFTIQVQEADQVEEAHNLTVPGLSMEIPGLRAGTPYTVTLHGEVRGHSTRP
LAVEVVTHHHHHH

10 **Sec. con núm. de ident.: 122** (dominios C de tenascina Hu A1-A3, que incluyen (His)₆- Tag para purificación)

EQAPELENLTVTEVGWDGLRLNWTAAADQAYEHFIIQVQEANKVEAARNLTVPG
SLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIIQGYRTPVLSAEEEEVPDMGNLTVTEVSWDAL
RLNWTPDGTQFTIQVQEADQVEEAHNLTVPGLSMEIPGLRAGTPYTVT
15 LHGEVRGHSTRPLAVEVVTHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 123 (dominios de fibronectina Hu 11-A-12, que incluyen (His)₆- Tag para purificación)

EIDKPSQMQRVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGP
20 DQTEMTIEGLQPTVEYVVSVAQNPSGESQPLVQTAVTNIDRPKGLAFTDQDV
DSIKIAWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEY
TVSVVALHDDMESQPLIGTQSTAIPAPDLKFTQVTPTSLSAQWTPPNVQLTG

YRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDSSSVVVSGLMVATKYEVSVYALKDTLTSRPA
QGVVTTLEHHHHHH

Sec. con núm. de ident.: 124 (dominios de fibronectina Hu 11-12, que
incluyen (His)₆- Tag para purificación)

EIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGP
DQTEMTIEGLQPTVEYVVSVAQNPSGESQPLVQTAVTTIPAPTDLKFTQVTPT
SLSAQWTPPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDSSSVVVSGLMVATKY
EVSVYALKDTLTSRPAQGVVTTLEHHHHHH

Los resultados de estos ensayos concordaron con los resultados mostrados anteriormente para los biespecíficos EDB/LTBR, es decir, mostraron la activación de LTBR principalmente en presencia del antígeno tumoral de la matriz extracelular objetivo por la respectiva molécula de unión biespecífica (**Tabla 13**).

Tabla 13: Veces máximas de inducción de la señalización de NF-κB en presencia o ausencia de EDA o TnCA2 para COVA14198 y COVA14202, respectivamente.

Nombre	Veces máximas de inducción en presencia de TAA	Veces máximas de inducción en ausencia de TAA	Relación (veces máx. de inducción TAA ⁺)/veces máx. de inducción TAA ⁻)
COVA14198 (EDA/LTBR)	4,5	1,3	3,5
COVA14202 (TnCA2/LTBR)	4,2	1,2	3,5

En particular, la molécula de unión biespecífica TnCA2/LTBR pudo activar el LTBR y, por lo tanto, desencadenar la señalización de NF-κB, fuertemente en presencia del antígeno de TnCA2, y la molécula de unión biespecífica EDA/LTBR

pudo activar el LTBR y, por lo tanto, desencadenar la señalización de NF- κ B, fuertemente en presencia del antígeno de EDA. En ausencia de los TAA respectivos, estos biespecíficos no activaron o solo lo activaron en forma mínima.

Este ejemplo demostró que el enfoque para activar LTBR a través de una
5 molécula de unión multiespecífica de proporcionada en la presente descripción, por ejemplo, que se une a LTBR y a un antígeno asociado al tumor asociado con la matriz extracelular, actúa para los tres antígenos diferentes asociados al tumor de la matriz extracelular que se han probado hasta ahora y, por lo tanto, es generalmente aplicable para los antígenos asociados al tumor presentes en la matriz extracelular. El
10 ejemplo también demostró que las moléculas que incorporan spFv son funcionales.