

ANTICUERPOS AGONISTAS ANTI-LTBR Y ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS QUE LOS COMPRENDEN

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere a novedosos anticuerpos que se unen al receptor de linfotoxina
beta (LTBR) y a moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden estos
novedosos anticuerpos anti-LTBR y un dominio de unión a antígeno que se une a un
antígeno asociado a un tumor, en particular a la proteína de activación de fibroblastos
(FAP), a procedimientos de producción de estas moléculas y a procedimientos de uso
10 de las mismas.

ANTECEDENTES

- El panorama del tratamiento del cáncer ha cambiado profundamente en los últimos
años después del desarrollo y la aprobación de las inmunoterapias contra el cáncer,
15 tales como los agentes que bloquean los puntos de control inmunitario PD-1/PD-L1 y
CTLA-4. Estas inmunoterapias contra el cáncer pueden lograr respuestas duraderas
en indicaciones de cáncer tales como melanoma, carcinoma de pulmón no microcítico
y cáncer de vejiga, y por lo tanto se están convirtiendo en el nuevo tratamiento de
referencia solo o en combinación con otros tratamientos. Sin embargo, sólo un
20 subconjunto de pacientes (<30 %) experimenta un beneficio duradero de estos
tratamientos y la mayoría de los pacientes manifiesta recidiva debido a mecanismos
de resistencia primaria o adquirida. Además, varias indicaciones de cáncer comunes
(por ejemplo, cáncer colorrectal y cáncer de páncreas) son en su mayoría refractarias
a estos inmunomoduladores. En consecuencia, existe una necesidad médica urgente
25 de desarrollar tratamientos para abordar los mecanismos de resistencia e incrementar
las respuestas a las inmunoterapias contra el cáncer, que incluye los inhibidores de
puntos de control.

- Los datos clínicos muestran que los pacientes que no responden o responden mal al
tratamiento con los inhibidores de puntos de control muestran un fenotipo inmunitario
30 no inflamado de linfocitos T, caracterizado por la ausencia de linfocitos T citotóxicos o
por su localización restringida al estroma tumoral. Por lo tanto, los tratamientos
novedosos dirigidos a incrementar la infiltración inmunitaria, serían de gran utilidad
para mejorar la tasa de respuesta a los inhibidores de puntos de control, ampliando su
beneficio clínico.

La superfamilia del TNFR está compuesta por 19 ligandos y 29 receptores, que comparten cierta similitud estructural, pero están implicados en muchas diversas funciones fisiológicas. En términos generales, los miembros de esta superfamilia pueden inducir la muerte celular (por ejemplo, DR5-TRAIL, Fas-FasL) o pueden promover la supervivencia y la inflamación (por ejemplo, TNF-TNFR). El receptor de linfotóxina beta (LTBR) es un miembro de la superfamilia TNFR que pertenece a esta segunda categoría, y es expresado por una variedad de células, que incluye las células del estroma del microambiente tumoral, las células mieloides y las células tumorales de origen epitelial. Las interacciones ligando-receptor dentro de la superfamilia TNFR pueden ser mono y polivalentes. Por ejemplo, OX40 y su ligando (OX40L) forman un par ligando-receptor monotípico, mientras que LTBR, LT α , LT β y LIGHT presentan interacciones multivalentes que crean una compleja red de vías interconectadas. La activación de LTBR mediante la linfotóxina $\alpha 1\beta 1$ (LT $\alpha 1\beta 1$) o la unión del ligando LIGHT induce la oligomerización del receptor y la transducción de señales a través de las vías canónicas y no canónicas de NF κ B, lo que da lugar a la regulación por incremento de genes inflamatorios y de desarrollo, tales como las moléculas de adhesión (ICAM y VCAM), los quimioatrayentes (CXCL9, 10, 11) y las quimiocinas organizadoras del tejido linfático (CCL21, CCL19, CXCL13) (Lu y Browning., Front Immunol. 2014, 5:47, doi: 10.3389/fimmu.2014.00047). Esta vía es esencial para el desarrollo y el mantenimiento de los órganos linfáticos secundarios, como se muestra por el fenotipo de los ratones con inactivación de *ltbr*, que no desarrollan los ganglios linfáticos ni las placas de Peyer (Fütterer y col, Immunity 1998, 9(1), 59-70, doi: 10.1016/s1074-7613(00)80588-9). Además, también es clave para el desarrollo y el mantenimiento de las vénulas de endotelio alto (HEV) (Browning y col, Immunity 2005, 23(5), 539-550, doi: 10.1016/j.immuni.2005.10.002). En muchos tumores sólidos se detectan histológicamente agregados pluricelulares que se asemejan a órganos linfáticos secundarios, compuestos por linfocitos T y células dendríticas (CD) activadas, linfocitos B y HEV. Las pruebas clínicas muestran que la presencia de dichos órganos linfáticos ectópicos, también llamados estructuras linfáticas terciarias (TLS) o la presencia de HEV se correlaciona con un mejor pronóstico en varias indicaciones tumorales (Dieu-Nosjean y col, Immunol. Rev. 2016, 271(1), 260-275, doi: 10.1111/imr.12405). Se cree que las TLS y las HEV se forman en respuesta a las mismas señales moleculares implicadas en el desarrollo de los ganglios linfáticos, tales como la activación de la vía LTBR. La activación de la vía

LTBR tiene, por lo tanto, el potencial de promover la formación de TLS en el microambiente tumoral e inducir respuestas inmunitarias antitumorales.

De hecho, las pruebas preclínicas apoyan la hipótesis de que la activación de LTBR puede incrementar la infiltración inmunitaria, potenciar las respuestas a los inhibidores de puntos de control e inducir la formación de TLS. La activación de LTBR por medio de un anticuerpo agonista o un ligando dirigido, incrementó la infiltración de linfocitos T en varios modelos tumorales de ratón (Lukashev y col, Cancer Res. 2006, 66(19), 9617-9624, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0217). En consecuencia, la politerapia con inhibidores de puntos de control fue más eficaz cuando se combinó con un agonista de LTBR (Allen y col, Sci Transl Med. 2017, 9(385), eaak9679, doi: 10.1126/scitranslmed.aak9679; Johansson-Percival y col, Cell Rep. 2017, 13(12), 2687-2698, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.004; y Tang y col, Cancer Cell 2016, 29(3), 285-296, doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.004). Además, se informaron pruebas de la formación de TLS y del desarrollo de HEV en respuesta a dichos agonistas.

Además del papel clave de LTBR en el desarrollo de TLS y HEV, se ha encontrado que la activación de LTBR induce la muerte celular de determinadas líneas celulares de carcinoma (Browning y col, J Exp Med 1996, 183(3), 867-878, doi: 10.1084/jem.183.3.867). Un estudio de fase I evaluó la seguridad y tolerabilidad de un anticuerpo agonista anti-LTBR humanizado (hCBE11) en pacientes con tumores sólidos avanzados (ClinicalTrials.gov, NCT00105170). El estudio se suspendió y posteriormente se finalizó antes de completar la inscripción de pacientes. Esto sugiere la posibilidad de que se produzcan graves problemas de seguridad asociados al agonismo generalizado de LTBR en humanos.

Dado el enorme potencial terapéutico de los agonistas de LTBR para mejorar las inmunoterapias contra el cáncer, existe la necesidad de proporcionar anticuerpos agonistas anti-LTBR con un excelente perfil farmacológico o anticuerpos biespecíficos con un perfil de seguridad ventajoso y la capacidad de activar LTBR solo en el microambiente tumoral y no en otros tejidos que expresan LTBR.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos que se unen específicamente al receptor de linfotóxina beta humano (LTBR), en particular anticuerpos agonistas anti-LTBR hu. Estos anticuerpos son capaces de unirse al LTBR humano y al LTBR de cynomolgus con una diferencia de afinidad de menos de 2 veces. Algunos de los nuevos anticuerpos agonistas anti-LTBR hu son incluso capaces de unirse a LTBR

humano, LTBR de cynomolgus y LTBR murino. La invención también se refiere a anticuerpos multiespecíficos que comprenden estos nuevos anticuerpos agonistas.

Por tanto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo agonista anti-receptor de linfotoxina beta (LTBR) que se une específicamente a LTBR humano y a

5 LTBR de cynomolgus, en el que dicho anticuerpo comprende

- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que

10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de

15 aminoácidos de SEQ ID NO:32; o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la

20 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la

25 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80; o

30
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una

35 CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región

variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88; o

- 5 (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, o
- 10 (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- 15 (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o
- 20 (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de
- 25
- 30

aminoácidos de SEQ ID NO:71, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente, en el que el anticuerpo agonista tiene al menos una de las siguientes propiedades:

- (a) se une a LTBR humano y a LTBR de cynomolgus con una diferencia de afinidad de menos de 2 veces; o
- (b) se une al dominio extracelular de LTBR humano con una CE_{50} de menos de 4 nM medida por ELISA y se une al dominio extracelular de LTBR de cynomolgus con una CE_{50} de menos de 5 nM medida por ELISA; o
- (c) requiere reticulación para que su actividad agonista active el LTBR humano; o
- (d) requiere reticulación para que su actividad agonista induzca la regulación por incremento de ICAM en células endoteliales de la vena umbilical humana o en fibroblastos asociados al cáncer; o
- (e) inhibe la interacción entre el LTBR humano y sus ligandos humanos linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ y LIGHT.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-LTBR que comprende

- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera

- (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98,
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42,
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, o
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.
- En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente comprende
- 30 (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 35 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o

- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98, o
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66,
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.

En un aspecto particular, se proporciona un anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente, en el que el anticuerpo agonista anti-LTBR se une además específicamente a LTBR murino. En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR se une al dominio extracelular de LTBR murino con una CE_{50} de menos de 1 nM, medida por ELISA.

En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR que se une además específicamente a LTBR murino comprende

- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, o

5 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o

10 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80, o

20 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.

En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR que se une además específicamente a LTBR murino comprende

30 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

35 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

En un aspecto particular, el anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento se une a la región epitópica de SEQ ID NO:351 en LTBR humano. En un aspecto, dicho anticuerpo agonista anti-LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32. En un aspecto, comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.

La invención también se refiere a anticuerpos agonistas anti-LTBR que son anticuerpos específicos multiespecíficos que comprenden el anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente. En un aspecto particular, se proporcionan anticuerpos agonistas anti-LTBR que son anticuerpos biespecíficos. En cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento anteriormente, el anticuerpo agonista anti-LTBR comprende preferentemente un dominio Fc de origen humano, en particular de la subclase IgG humana, más en particular de la subclase IgG1 humana. En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR comprende un dominio Fc de la subclase IgG1 humana que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora. En un aspecto, el

anticuerpo agonista anti-LTBR comprende un dominio Fc de la subclase IgG1 humana con las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a LTBR y a un antígeno asociado a tumor (TAA).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-LTBR que es un anticuerpo biespecífico que puede unirse específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR) y a la proteína de activación de fibroblastos (FAP) y, por tanto, combina un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP con al menos un dominio de unión a antígeno que puede unirse de manera agonista a LTBR, en particular LTBR hu, en el que la activación a través de LTBR se proporciona mediante la reticulación a través de la unión a FAP expresada en las células estromales tumorales. A diferencia de los anticuerpos agonistas anti-LTBR convencionales no dirigidos, el direccionamiento a una diana asociada a tumor (TAA) como FAP permite restringir el agonismo de LTBR exclusivamente al microambiente tumoral (endotelio tumoral y fibroblastos asociados al cáncer), reduciendo de este modo los efectos secundarios potenciales.

La proteína de activación de fibroblastos (FAP) es una serina proteasa altamente expresada en la superficie celular de las células estromales asociadas al cáncer y en las células reticulares fibroblásticas de los órganos linfáticos secundarios, pero tiene, de otro modo, una expresión muy limitada en los tejidos normales. La FAP es altamente prevalente en diversas indicaciones de cáncer, lo que permite su uso como resto de direccionamiento para fármacos que deben acumularse dentro del estroma tumoral.

Por tanto, en un aspecto se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende

- (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP),
- (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), y
- (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del anticuerpo a un receptor de Fc y/o la función efectora.

Los anticuerpos biespecíficos poseen un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que

reducen la afinidad de unión del anticuerpo a un receptor de Fc y/o la función efectora. La reticulación mediada por el receptor de Fc queda de este modo anulada y la activación específica de tumor se logra mediante la reticulación a través de la unión del dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP a través de la unión a su diana asociada al tumor. Se proporciona un anticuerpo biespecífico que solo activa LTBR al unirse a FAP. Por tanto, se proporciona un anticuerpo que activa LTBR en el estroma tumoral. Por tanto, se proporciona un anticuerpo biespecífico que activa LTBR en el estroma tumoral.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende

- (a) un primer fragmento Fab que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP),
- (b) un segundo fragmento Fab que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, en el que el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende un tercer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR, es decir un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP), (b) un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.

En un aspecto particular, el tercer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR es idéntico al segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR, lo que significa que el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR) son el mismo. En un aspecto, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR son fragmentos Fab que se unen específicamente a LTBR. En un aspecto, los fragmentos Fab que se unen específicamente a LTBR son

fragmentos fab cruzados. En otro aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP es un fragmento Fab.

En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une

5 específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP) que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, y una CDR-H3 que

10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende (i) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que

35 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una CDR-H2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, o (ii) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En un aspecto particular, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende (i) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, o comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, o comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 o comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En un aspecto particular, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En particular, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 y es un fragmento Fab.

En otro aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento comprende un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; o

- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
10 aminoácidos de SEQ ID NO:48; o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la
15 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80; o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la
25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88; o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una CDR-H3 que
30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, o

- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la
- 5 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-
- 10 H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de
- 15 aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-
- H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y una CDR-H3 que
- 20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.
- 25 En un aspecto, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que
- 30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; o

- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que
 5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
 10 aminoácidos de SEQ ID NO:48; o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la
 15 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80; o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que
 20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la
 25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88; o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una CDR-H3 que
 30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, o

- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la
- 5 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-
- 10 H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de
- 15 aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-
- 20 H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.
- 25 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento, en el que el segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente el tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR, comprenden cada uno
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 30 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 35 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la

- secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 5 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 10 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 15 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98,
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 20 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42,
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 25 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 30 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, o
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 35 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.

En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento comprende un segundo dominio de unión a antígeno (y

5 opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR que comprende

- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 10 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia
- 15 de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- 20 (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98, o
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 25 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia
- 30 de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66,
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.

- En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento, en el que el segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente el tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR humano, LTBR de cynomolgus y LTBR murino comprende
- 5 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la
 - 10 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, o
 - 15 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la
 - 20 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o
 - una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que
 - 25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la
 - cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
 - 30 aminoácidos de SEQ ID NO:80, o
 - una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una
 - 35 CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región
 - variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.

En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende un segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR humano, LTBR de cynomolgus y LTBR murino que comprende

- 5 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 10 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 15 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- 20 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR comprende

- 25 (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 30 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.

En un aspecto particular, el segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR comprende

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34. En otro aspecto particular, el segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42. Aún en otro aspecto particular, el segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.

Por tanto, en un aspecto particular, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento comprende (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y (b) un segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento comprende (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y (b) un segundo dominio de unión a antígeno (y opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42. Aún en otro aspecto, la molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento comprende (a) un primer dominio de unión a

- antígeno que se une específicamente a FAP, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y (b) un segundo dominio de unión a antígeno (y
- 5 opcionalmente un tercer dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.
- 10 En todos estos aspectos descritos en el presente documento anteriormente, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora. En un aspecto, el dominio Fc compuesto por
- 15 una primera y una segunda subunidad es un dominio Fc de IgG. En un aspecto particular, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad es un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. En un aspecto particular, el dominio Fc es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 20 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se define en el presente documento anteriormente, en el que la primera subunidad de la región Fc comprende botones y la segunda subunidad de la región Fc comprende ojales de acuerdo con el procedimiento de botón en ojal. En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica, en la que (i) la primera subunidad de la
- 25 región Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y la segunda subunidad de la región Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), o (ii) la primera subunidad de la región Fc comprende las sustituciones aminoacídicas K392D y K409D (numeración de acuerdo
- 30 con el índice EU de Kabat) y la segunda subunidad de la región Fc comprende las sustituciones aminoacídicas E356K y D399K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Más en particular, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, en el que la primera subunidad de la región Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y

la segunda subunidad de la región Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se define en el presente documento anteriormente, que comprende

- 5 (a) un primer fragmento Fab que se une específicamente a FAP,
- (b) un segundo fragmento Fab que se une específicamente a LTBR, y
- (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del anticuerpo a un receptor de Fc y/o la función efectora. En un aspecto, el segundo
- 10 fragmento Fab que se une específicamente a LTBR es un fragmento Fab cruzado. Por tanto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que proporciona una unión monovalente hacia LTBR y una unión monovalente hacia FAP.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende

- 15 (a) un primer fragmento Fab que se une específicamente a FAP,
- (b) un segundo y un tercer fragmento Fab que se unen específicamente a LTBR, y
- (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del anticuerpo a un receptor de Fc y/o la función efectora, en el que el primer
- 20 fragmento Fab que se une específicamente a FAP está fusionado en su extremo N al extremo C de una de las subunidades del dominio Fc y el segundo y un tercer fragmento Fab que se unen específicamente a LTBR están fusionados cada uno en su extremo C al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc.

- 25 Por tanto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que proporciona una unión bivalente hacia LTBR y una unión monovalente hacia FAP.

- De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona uno o más polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente. La invención proporciona además un vector, en particular
- 30 un vector de expresión, que comprende el polinucleótido aislado de la invención y una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado o el vector de expresión de la invención. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula eucariota, en particular una célula de mamífero. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista
- 35 biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente,

que comprende cultivar la célula huésped como se describe anteriormente en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, y aislar el anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR. La invención también engloba el anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR producido mediante el procedimiento de la invención.

La invención proporciona otra composición farmacéutica que comprende un anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la composición farmacéutica comprende un agente terapéutico adicional.

También se engloba por la invención el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente, o la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, para su uso como medicamento.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en (a) inducir la regulación por incremento de ICAM en las células endoteliales o los fibroblastos asociados al cáncer, o (b) potenciar la adhesión de linfocitos T.

En un aspecto específico, se proporciona el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer. En otro aspecto específico, la invención proporciona el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR se administra en combinación con un agente quimioterápico, radiación y/u otros agentes para su uso en la inmunoterapia del cáncer. En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento es para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR es para su administración en combinación con un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1. En otro aspecto, se proporciona el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe

en el presente documento anteriormente o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en la regulación por incremento o la prolongación de la actividad de los linfocitos T citotóxicos.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de células tumorales en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo agonista anti-LTBR o del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente, o la composición farmacéutica de la invención, para inhibir el crecimiento de las células tumorales. En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar o retrasar el cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo agonista anti-LTBR o del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento anteriormente, o la composición farmacéutica de la invención.

También se proporciona el uso de la molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesita, en particular para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, así como un procedimiento para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En un aspecto específico, la enfermedad es cáncer. En cualquiera de los aspectos anteriores, el individuo es un mamífero, en particular un ser humano.

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Las **Figuras 1A a 1G** muestran representaciones esquemáticas de las proteínas solubles recombinantes (receptores, ligandos y proteínas herramienta) usadas como antígenos para la presentación en fagos y la inmunización para generar anticuerpos anti-LTBR. La **Figura 1A** muestra una representación esquemática del denominado agotador de Fc biotinilado (agotador de Fc kh NC avi biotinilado, P1AA0981), que comprende un dominio Fc botón en ojal (kh) que se usa como agente de preaclaramiento para evitar que los clones se unan al dominio Fc. La **Figura 1B** muestra una representación esquemática de la linfoxina $\alpha 1\beta 2$ humana monocatenaria avi his (P1AE1235). La **Figura 1C** muestra una representación esquemática de la linfoxina $\alpha 1\beta 2$ murina monocatenaria avi his (P1AE1236). La

Figura 1D muestra una representación esquemática del ectodominio DEC de LTBR hu monomérico (S28-M227) como fusión Fc avi biotinilado (P1AE2835). La **Figura 1E** muestra una representación esquemática de la fusión Fc ectodominio DEC de LTBR mu monomérico (S28-L223) avi biotinilado (P1AE4410). La **Figura 1F** muestra una
 5 representación esquemática de la fusión Fc ectodominio DEC de LTBR cyno monomérico (S28-M227) avi biotinilado (P1AE4411). La **Figura 1G** muestra una representación esquemática de la fusión Fc LTBR humano monomérico N-terminal (DEC de longitud completa) IgG1 hu kih HRYF avi (P1AE1217).

Las **Figuras 2A a 2f** muestran representaciones esquemáticas de antígenos
 10 adicionales usados para el cribado y la caracterización de clones de anticuerpos anti-LTBR y anticuerpos biespecíficos anti-FAP-LTBR. La **Figura 2A** muestra una representación esquemática de una fusión Fc LTBR hu dimérico biotinilado (P1AE2401). La **Figura 2B** muestra una representación esquemática de una fusión Fc DEC LTBR humano (S28-M227) N- y extremo C extendido - wt kih HRYF - Avi - His
 15 biotinilado (P1AE7979). La **Figura 2C** muestra una representación esquemática de una fusión Fc LTBR cyno monomérico N terminal (DEC de longitud completa) IgG1 hu kih HRYF avi biotinilado (P1AE2656). La **Figura 2D** muestra una representación esquemática de LTBR murino dimérico-Fc conectado por enlace disulfuro homodímero biotinilado (P1AE2655). La **Figura 2E** muestra una representación esquemática de
 20 FAP humana - Avi - His biotinilada (P1AA5347). La **Figura 2F** muestra una representación esquemática de FAP murina - Avi - His biotinilada (P1AD9907).

La **Figura 3** muestra la identificación del clon Fab FAPltbr.P218.076 (P1AE5929) después de la conversión a IgG) como anticuerpo que presenta reactividad cruzada en un ELISA tipo sándwich en el que se determinó la unión específica a LTBR humano
 25 (P1AE2835) y LTBR murino (P1AE4410). El anticuerpo se origina de la presentación en fagos. Se usó un fragmento Fc humano (P1AA0981) para confirmar la unión específica a LTBR y excluir la unión Fc, ya que los antígenos usados en la presentación en fagos han sido proteínas de fusión etiquetadas con Fc. El eje Y representa DO₄₅₀₋₉₀₀.

30 La **Figura 4** muestra la inhibición de las interacciones LTBR-linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ mediante anticuerpos IgG anti-LTBR. Las IgG anti-LTBR seleccionadas se han titulado en diluciones de 3 veces a partir de 100 nM (15 μ g/ml).

La **Figura 5** muestra la inhibición de las interacciones LTBR-LIGHT mediante anticuerpos IgG anti-LTBR. Las IgG anti-LTBR seleccionadas se han titulado en
 35 diluciones de 3 veces a partir de 100 nM (15 μ g/ml).

La **Figura 6** muestra los resultados para diversas IgG anti-LTBR en ausencia o presencia de un anticuerpo de reticulación (conector) como se determinó en el ensayo reportero de HeLa NF κ B como se describe en el Ejemplo 1.7. La concentración de las IgG anti-LTBR se representa contra las unidades de iluminación liberadas (RLU) medidas después de la incubación y la adición de la solución de detección de luciferasa.

La **Figura 7** muestra los resultados de la evaluación de la unión a LTBR en la superficie celular (FACS en células CHO LTBR humanas recombinantes) para las IgG anti-LTBR representadas como la mediana de la intensidad de fluorescencia contra la concentración. Las IgG anti-LTBR se han usado en una titulación con etapas de dilución de 3 veces a partir de 20 μ g/ml.

La **Figura 8** muestra el mapa de calor de agrupamiento de epítomos basado en los respectivos valores de unión en porcentaje para 8 IgG anti-LTBR seleccionadas.

Las **Figuras 9A a 9E** muestran representaciones esquemáticas de anticuerpos anti-LTBR y anticuerpos biespecíficos anti-FAP-LTBR. La **Figura 9A** muestra una representación esquemática de un anticuerpo monoespecífico anti-LTBR humano IgG1 PG LALA. La **Figura 9B** muestra una representación esquemática del anticuerpo biespecífico anti-LTBR/anti-FAP 1+1 como anticuerpo cruzado IgG1 PG LALA humano con dominios V cruzados en el brazo Fab anti-LTBR y cargas en los dominios CH1/Ck del brazo Fab anti-FAP. La **Figura 9C** muestra una representación esquemática del anticuerpo biespecífico anti-LTBR/anti-FAP 1+1 como anticuerpo cruzado IgG1 PG LALA humano con dominios CH1/Ck cruzados en el brazo Fab anti-FAP. La **Figura 9D** muestra una representación esquemática del anticuerpo biespecífico anti-LTBR/anti-FAP 2+1 como anticuerpo cruzado IgG1 PG LALA humano con dominios CH1/Ck cruzados en el brazo Fab anti-FAP y un segundo fragmento Fab anti-LTBR fusionado al extremo C del dominio Fc. La **Figura 9E** muestra una representación esquemática del anticuerpo biespecífico anti-LTBR/anti-FAP 2+1 como anticuerpo cruzado IgG1 PG LALA humano con dominios V cruzados en ambos brazos Fab anti-LTBR y cargas en los dominios CH1/Ck del fragmento Fab anti-FAP que está fusionado al extremo C del dominio Fc.

La **Figura 10** muestra la inhibición de las interacciones LTBR-linfotoxina α 1 β 2 mediante anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR. Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR seleccionados se han titulado en diluciones de 3 veces a partir de 100 nM (15 μ g/ml).

La **Figura 11** muestra la inhibición de las interacciones LTBR-LIGHT mediante anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR. Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR seleccionados se han titulado en diluciones de 3 veces a partir de 100 nM (15 µg/ml).

- 5 Las **Figuras 12A y 12B** muestran representaciones esquemáticas de los anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP-LTBR. La **Figura 12A** muestra una representación esquemática del anticuerpo biespecífico anti-LTBR/anti-FAP 1+1 como anticuerpo cruzado IgG1 DA PG murino con dominios V cruzados en el brazo Fab anti-FAP y cargas en los dominios CH1/Ck del brazo Fab anti-LTBR mu. La **Figura 12B**
10 muestra una representación esquemática del anticuerpo biespecífico anti-LTBR/anti-FAP 2+1 como anticuerpo cruzado IgG1 DA PG murino con cargas en los dominios CH1/Ck de ambos Fab anti-LTBR y dominios CH1/Ck cruzados en el fragmento Fab anti-FAP que está fusionado al extremo C del dominio Fc. La **Figura 12C** muestra una representación esquemática de un anticuerpo biespecífico anti-LTBR/no-dirigido 2+1
15 (DP47) como anticuerpo cruzado IgG1 DA PG murino con cargas en los dominios CH1/Ck de ambos Fabs anti-LTBR y dominios CH1/Ck cruzados en el fragmento Fab no-dirigido (DP47) que está fusionado al extremo C del dominio Fc.

Las **Figuras 13A a 13D** muestran que los anticuerpos agonistas anti-LTBR regulan por incremento ICAM en las células endoteliales de una manera dependiente de la
20 reticulación. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia de ICAM en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratadas con anticuerpos agonistas anti-LTBR humano en presencia (**Figura 13A y Figura 13C**) o ausencia (**Figura 13B y Figura 13D**) de un anticuerpo de reticulación de Fc (reticulador anti-Fc). Los datos están normalizados con respecto a la actividad del anticuerpo anti-LTBR
25 CBE11 (P1AE1873).

Las **Figuras 14A a 14D** muestran que los anticuerpos agonistas anti-LTBR regulan por incremento ICAM en los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) de manera dependiente del reticulador. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia de ICAM en CAF inmortalizados tratados con anticuerpos agonistas anti-LTBR
30 humano en presencia (**Figura 14A y Figura 14C**) o ausencia (**Figura 14B y Figura 14D**) de un reticulador anti-Fc. Los datos están normalizados con respecto a la actividad del anticuerpo anti-LTBR CBE11 (P1AE1873).

Las **Figuras 15A a 15F** muestran la unión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti FAP-LTBR a LTBR humano (**Figura 15A y Figura 15D**), cyno
35 (**Figura 15B y Figura 15E**) y murino (**Figura 15C y Figura 15F**) en células CHO-K1

genomanipuladas para sobreexpresar LTBR humano, cyno o murino. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo secundario anti-Fc humano que detecta las moléculas biespecíficas FAP-LTBR unidas en células que sobreexpresan LTBR humano (**Figura 15A y Figura 15D**), LTBR de mono cynomolgus (**Figura 15B y Figura 15E**) o LTBR murino (**Figura 15C y Figura 15F**). Los datos están normalizados con respecto al valor de referencia.

Las **Figuras 16A a 16D** muestran que las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti FAP-LTBR regulan por incremento ICAM en los fibroblastos asociados al cáncer de manera dependiente de FAP. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia de ICAM en CAF inmortalizados que expresan endógenamente LTBR y FAP (**Figura 16A y Figura 16C**, hTERT CAF) o que sólo expresan LTBR (**Figura 16B y Figura 16D**, hTERTCAFs_{delFAP}). Los datos están normalizados con respecto a la expresión de ICAM del control no tratado.

Las **Figuras 17A a 17D** ilustran que las moléculas biespecíficas anti-FAP-LTBR regulan por incremento ICAM en las células endoteliales de manera dependiente de FAP. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia de ICAM en HUVEC CD31⁺ cultivadas conjuntamente con células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP (**Figura 17A y Figura 17C**) o células NIH-3T3 sin expresión de FAP (**Figura 17B y Figura 17D**). Los datos se normalizan con respecto a la expresión de ICAM del control no tratado y los valores de CE₅₀ se indican en la leyenda.

Las **Figuras 18A a 18F** demuestran que las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-FAP-LTBR inducen la secreción de quimioatrayentes por parte de las células endoteliales de manera dependiente de FAP. La concentración de diferentes quimiocinas (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) se midió mediante Bio-plex en sobrenadantes de HUVEC cultivadas conjuntamente con células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP (**Figura 18A, Figura 18C y Figura 18E**) o células NIH-3T3 sin expresión de FAP (**Figura 18B, Figura 18D y Figura 18F**) tratadas durante 48 horas con moléculas biespecíficas anti FAP-LTBR.

La **Figura 19** muestra el incremento de la adhesión de linfocitos T en el endotelio estimulado con moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti FAP-LTBR. Se muestra el área de linfocitos T marcados adheridos a cultivos de HUVEC que se estimulan con anticuerpos biespecíficos anti FAP-LTBR (2 nM) en presencia (barras negras) o ausencia (barras blancas) de FAP. Se usa TNF α (0,5 ng/ml) como control positivo.

Las **Figuras 20A y 20B** demuestran que las moléculas sustitutas de anticuerpos biespecíficos anti FAP-LTBR regulan por incremento las moléculas de adhesión en los fibroblastos de ratón de manera dependiente de FAP *in vitro*. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia de VCAM en células NIH-3T3 (**Figura 20A**) o en
 5 células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP (**Figura 20B**) tratadas con moléculas sustitutas del anticuerpo anti FAP-LTBR o con un anticuerpo agonista anti-LTBR de ratón (5G11). Los datos están normalizados con respecto a la expresión del valor de referencia de VCAM de los controles no tratados.

Las **Figuras 21A y 21B** muestran que las moléculas sustitutas del anticuerpo biespecífico anti FAP-LTBR regulan por incremento las moléculas de adhesión en las
 10 células endoteliales de manera dependiente de FAP *in vitro*. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia de ICAM en HUVEC CD31⁺ cultivadas conjuntamente con NIH-3T3 (**Figura 21A**) o células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP (**Figura 21B**).

La **Figura 22** muestra el diseño de un estudio *in vivo* en ratones para evaluar la
 15 seguridad, la eficacia y el perfil farmacodinámico de los anticuerpos biespecíficos anti FAP-LTBR solos o en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo tumoral subcutáneo MC38-hu CEA. La línea temporal describe los puntos temporales de tratamiento y sacrificio y la tabla describe los detalles de los grupos de tratamiento, la administración de dosis y la programación de este estudio.

En la **Figura 23A** se muestra que las moléculas sustitutas anti FAP-LTBR inhiben el
 20 crecimiento tumoral en un modelo tumoral subcutáneo MC38-huCEA en monoterapia y mejoran la respuesta al tratamiento con aPD-L1. Las curvas de crecimiento tumoral de los ratones tratados con vehículo, P1AF4664, P1AF4674, aPD-L1, P1AF4664+aPD-L1 y P1AF4674+aPD-L1 se representan gráficamente en la **Figura 23A**. La comparación de los volúmenes tumorales a los 12 días de inicio del tratamiento muestra un volumen mayor estadísticamente significativo en el vehículo frente a P1AF4674, en el vehículo frente a P1AF4664+aPD-L1, en el Vehículo frente a P1AF4674+aPD-L1 y en aPD-L1 frente a P1AF4674+aPD-L1. El análisis estadístico se realizó con Anova unidireccional, prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,
 25 *** $p < 0,001$). (**Figura 23B**). En las **Figuras 23C a 23H** se muestran las curvas individuales de crecimiento tumoral de los ratones tratados con vehículo, P1AF4664, P1AF4674, aPD-L1, P1AF4664+aPD-L1 y P1AF4674+aPD-L1.

Las **Figuras 24A y 24B** demuestran que las moléculas sustitutas anti FAP-LTBR fueron capaces de inducir la activación endotelial en un modelo tumoral subcutáneo
 35 MC38-huCEA. El análisis por citometría de flujo de las suspensiones de células

individuales del tumor se llevó a cabo el día 9 y el día 16 posteriores al inicio del tratamiento. Las células endoteliales se clasificaron como CD45-, huCEA-, CD31⁺ y podoplanina- y se cuantificó la mediana de la intensidad de fluorescencia para ICAM (**Figura 24A** y **Figura 24B**). Los datos muestran que el tratamiento con P1AF4664 y P1AF4674 incrementa ICAM en las células endoteliales tumorales durante todo el tratamiento. El análisis estadístico se realizó con Anova unidireccional, prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

La **Figura 25** muestra el diseño de un estudio *in vivo* en ratones para evaluar la seguridad, la eficacia y el perfil farmacodinámico de los anticuerpos biespecíficos anti FAP-LTBR solos o en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo tumoral subcutáneo KPC4662-huCEA. La línea temporal describe los puntos temporales de tratamiento y sacrificio y la tabla describe los detalles de los grupos de tratamiento, la administración de dosis y la programación de este protocolo de estudio KPC4662-huCEA.

Las **Figuras 26A** a **26C** demuestran que las moléculas sustitutas anti FAP-LTBR inducen vénulas del endotelio alto en el modelo tumoral subcutáneo KPC4662-huCEA. En los grupos de tratamiento se registró un incremento significativo de los vasos sanguíneos positivos a Meca79, como fracción de todos los vasos sanguíneos, en comparación con el grupo vehículo. El análisis estadístico se realizó con Anova unidireccional, prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (**Figura 26A**). La tinción por inmunofluorescencia representativa de CD31 (todos los vasos sanguíneos) y Meca79 (HEV) en una muestra tratada con P1AF4664 a partir del día 6 después del inicio del tratamiento se muestra en la **Figura 26B** y **Figura 26C**, respectivamente.

La **Figura 27** muestra el diseño del estudio de un estudio *in vivo* en ratones para evaluar la seguridad, la eficacia y el perfil farmacodinámico de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-LTBR solas o en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo tumoral ortotópico EMT6. La línea temporal describe los puntos temporales de tratamiento y sacrificio y la tabla describe los detalles de los grupos de tratamiento, la administración de dosis y la programación de este protocolo de estudio EMT6. El vehículo y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-LTBR murinas P1AG5459 y P1AG5461 (control no dirigido) se inyectaron en todos los puntos temporales indicados anteriormente (d0, d2, d5, d7, etc.), si no se indica de otro modo. PDL1 se inyectó sólo en los puntos temporales indicados por las flechas vacías, si no se indica de otro modo.

En la Figura 28A y 28B se muestra que los anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP-LTBR (P1AG5459) inhiben el crecimiento tumoral en un modelo tumoral ortotópico EMT6 en monoterapia y mejoran la respuesta al tratamiento con aPD-L1. Las curvas de crecimiento tumoral (mediana) de los ratones tratados con
 5 vehículo, P1AG5459, P1AG5461, aPD-L1 y P1AG5459 + aPD-L1 se representan gráficamente en la **Figura 28A**. La comparación de los volúmenes tumorales a los 22 días después del inicio del tratamiento se representa gráficamente en la **Figura 28B** y muestra un volumen mayor estadísticamente significativo en el vehículo frente a P1AG5459, en el vehículo frente a P1AG5459+aPD-L1, en P1AG5459 frente a
 10 P1AG5461 y en P1AG5461 frente a P1AG5459+aPD-L1. El análisis estadístico se realizó con Anova unidireccional, prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Las **Figuras 29A a 29C** demuestran que el anticuerpo sustituto murino biespecífico anti-LTBR P1AG5459 fue capaz de inducir la activación endotelial y la diferenciación de HEV de manera dependiente de FAP en un modelo tumoral ortotópico EMT6. El
 15 análisis por citometría de flujo de las suspensiones de células tumorales individuales se llevó a cabo el día 13 después del inicio del tratamiento. Las células endoteliales se clasificaron como CD45-, CD31⁺ y podoplanina- y se cuantificaron las medianas de la intensidad de fluorescencia para ICAM (**Figura 29A**) y VCAM (**Figura 29B**) o el % de
 20 células endoteliales Meca79+ (**Figura 29C**). Los datos muestran que el tratamiento con P1AG5459 solo o en combinación con aPD-L1, pero no con el control no dirigido P1AG5461, incrementa ICAM y VCAM en las células endoteliales del tumor e incrementa la frecuencia de células endoteliales Meca79+ (**Figura 29C**). Los efectos sobre la activación endotelial y la diferenciación de HEV son más pronunciados en los
 25 ratones que responden al tratamiento (□) que en los que no responden al tratamiento (●).

La **Figura 30A** muestra que el tratamiento con P1AG5459 solo o en combinación con aPD-L1, pero no con P1AG5461, incrementa la cantidad de células endoteliales Meca79+ cuantificadas mediante formación de imágenes de inmunofluorescencia en el
 30 día 13 posterior al inicio del tratamiento. Una imagen de ejemplo muestra la localización de la vasculatura principal (representada por la tinción CD31) y del endotelio Meca79+.

Las **Figuras 30B, 30C y 30D** muestran la cuantificación de la infiltración de linfocitos T CD8 (**Figura 30B**), linfocitos T CD4 (**Figura 30C**) y linfocitos B B220+ (**Figura 30D**) en
 35 el tumor ortotópico EMT6, según se midió mediante la formación de imágenes por

inmunofluorescencia en el día 13 posterior al inicio del tratamiento. P1AG5459 solo o en combinación con aPD-L1, también aPD-L1 hasta determinado punto solo, pero no P1AG5461, incrementa la cantidad de linfocitos T y B en el tumor. En el caso de la monoterapia con P1AG5459 puede observarse una clara correlación en los ratones que responden al tratamiento (□) en comparación con los que no responden al tratamiento (●).

Las **Figuras 31A a 31C** demuestran que el anticuerpo sustituto murino biespecífico anti-FAP-LTBR (P1AG5459) induce la regulación por incremento de las quimiocinas en el modelo tumoral ortotópico EMT6. Se midieron las concentraciones de las quimiocinas CXCL13 (**Figura 31A**), CCL5 (**Figura 31B**) y CCL10 (**Figura 31C**) en lisados tumorales recolectados el día 13 posterior al inicio del tratamiento. Los tumores tratados con P1AG5459 tienden a tener una mayor cantidad de CXCL13, CCL5 y CXCL10. Los tumores que responden al tratamiento (□) tienden a mostrar una mayor concentración de quimiocinas.

En las **Figuras 32A a 32C** se muestra que la inhibición del crecimiento tumoral mediada por el anticuerpo sustituto murino biespecífico anti-FAP-LTBR (P1AG5459) en un modelo tumoral ortotópico EMT6 está mediada por linfocitos T, CD8, CD4 y linfocitos B. Las curvas de crecimiento tumoral (mediana) se representan en la **Figura 32A**. La comparación de los volúmenes tumorales en el día 15 se representa en la **Figura 32B** y muestra que, en ausencia de linfocitos T CD8, no hay diferencia en el volumen tumoral cuando se comparan los ratones tratados con vehículo y con P1AG5459. La comparación de los volúmenes tumorales en el día 20 se representa en la **Figura 32C** y muestra que en ausencia de linfocitos T CD4 o linfocitos B que expresan CD20⁺, no hay diferencia en el volumen tumoral cuando se comparan los ratones tratados con vehículo y con P1AG5459.

La **Figura 33** muestra imágenes representativas de inmunofluorescencia de tumores de cáncer colorrectal ortotópicos tratados con vehículo o con los anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP-LTBR (P1AG5459). El tumor se identifica mediante la tinción Ki67 para las células proliferativas y el borde del tumor se marca con una línea discontinua. CD31 marca los vasos sanguíneos, pNAD/Meca79 marca las vénulas del endotelio alto y CD8 marca los linfocitos T CD8. Las imágenes representativas muestran que P1AG5459 induce la diferenciación de HEV y la infiltración de CD8 en el tumor, pero no en el tejido de colon normal circundante.

La **Figura 34** muestra el desarrollo de una estructura linfática terciaria (TLS) en un ratón portador de CRC ortotópico tras el tratamiento con P1AG5459. La tinción Ki67 de

la sección completa guio la identificación del margen del tumor, marcado por una línea discontinua. La tinción B220 (linfocitos B) de la sección completa destaca un agregado de linfocitos B, que se amplía en las imágenes posteriores. Las imágenes ampliadas caracterizan con más detalle la composición celular de la TLS, que contiene vénulas del endotelio alto pNAD/Meca79⁺, células mieloides CD11c⁺, células proliferativas B220⁺ Ki67⁺, indicativas de un centro germinal, linfocitos T CD8 y CD4, algunas de las cuales expresan conjuntamente el marcador de activación PD1 y el marcador de troncalidad TCF1.

Las **Figuras 35A y 35B** comparan las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti FAP-LTBR que contienen diferentes dominios de unión a antígeno LTBR en su capacidad para regular por incremento ICAM en las células endoteliales de manera dependiente de FAP. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia de ICAM en HUVEC CD31⁺ cultivadas conjuntamente con células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP (**Figura 35A**) o células NIH-3T3 sin expresión de FAP (**Figura 35B**). Los datos están normalizados con respecto a la expresión de ICAM del control no tratado.

Las **Figuras 36A a 36C** comparan las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti FAP-LTBR que contienen diferentes dominios de unión a antígeno LTBR en su capacidad de unión a LTBR humano (**Figura 36A**), de cyno (**Figura 36B**) y murino (**Figura 36C**) en células CHO-K1 genomanipuladas para sobreexpresar LTBR humano, cyno o murino. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo secundario anti-Fc humano que detecta las moléculas biespecíficas anti FAP-LTBR unidas en células que sobreexpresan LTBR humano (**Figura 36A**), LTBR de mono cynomolgus (**Figura 36B**) o LTBR murino (**Figura 36C**). Los datos están normalizados con respecto al valor de referencia.

Las **Figuras 37A a 37E** muestran representaciones esquemáticas de un anticuerpo IgG anti-LTBR y anticuerpos biespecíficos anti-FAP-LTBR. La **Figura 37A** muestra una representación esquemática de un anticuerpo IgG1 PG LALA anti-LTBR humano monoespecífico (BHA10, P1AH0119). La **Figura 37B** muestra una representación esquemática de un anticuerpo biespecífico anti-LTBR/anti-FAP(4B9) 2+1 como IgG1 PG LALA humana con 2 brazos Fab N terminales específicos para LTBR (CBE11) y dominios VL y VH anti-FAP C terminales del clon 4B9 (P1AE1079). La **Figura 37C** muestra una representación esquemática de un anticuerpo biespecífico anti-LTBR (BHA10)/anti-FAP(4B9) (P1AH5884) 1+1 como anticuerpo cruzado IgG1 PG LALA humana con dominios VL/VH cruzados en el brazo Fab anti-LTBR y cargas en los

dominios CH1/Ck del brazo Fab anti-FAP. La **Figura 37D** muestra una representación esquemática de un anticuerpo biespecífico anti-LTBR (BHA10)/anti-FAP(4B9) (P1AH5885) 2+1 como anticuerpo cruzado IgG1 PG LALA humana con dominios V cruzados en ambos brazos Fab anti-LTBR y cargas en los dominios CH1/Ck del fragmento Fab anti-FAP que está fusionado al extremo C del dominio Fc (botón Fc-cadena). La **Figura 37E** muestra una representación esquemática del anticuerpo biespecífico 2+1 anti-LTBR (P1AE9459)/anti-FAP(212) (P1AH5886) como IgG1 PG LALA humano crossMab con dominios V cruzados en ambos brazos Fab anti-LTBR y cargas en los dominios CH1/Ck del fragmento Fab anti-FAP que está fusionado al extremo C del dominio Fc (cadena botón Fc).

Las **Figuras 38A a 38D** muestran los mapas de diferencias de deuteración entre el LTBR humano unido en comparación con el LTBR no complejo. El mapa de diferencias de deuteración muestra la secuencia principal del LTBR humano (P1AH2680), con la diferencia de deuteración entre el LTBR humano más el anticuerpo/ligando comparado con el LTBR sin el anticuerpo/ligando para los cinco tiempos de marcaje diferentes 15 segundos, 1, 10, 60 y 300 minutos. Las barras sobre la secuencia muestran los péptidos. Los recuadros indican los epítomos sugeridos para el respectivo anticuerpo/ligando. A continuación, los epítomos propuestos se mapean (regiones negras) en el modelo pliegue alfa AF-P36941-F1-model_v2 S28 a M227. Se muestran los epítomos propuestos en el LTBR humano para P1AE9459 (**Figura 38A**), P1AE1873 (**Figura 38B**); P1AH0119 (**Figura 38C**) y P1AE1235 (**Figura 38D**, ligando).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que en general se usa en la técnica a la que pertenece la presente invención. Para propósitos de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y siempre que sea apropiado, los términos que se usan en singular también incluirán el plural y viceversa.

Como se usa en el presente documento, los términos "**molécula de unión a antígeno**" o "**anticuerpo**" se usan de manera intercambiable y se refieren en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Ejemplos de moléculas de unión a antígeno son anticuerpos, anticuerpos bi o multiespecíficos, fragmentos de anticuerpo y proteínas de unión a antígeno de andamio. El término "**anticuerpo**" se usa en el presente documento en el sentido más

amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que exhiban la actividad de unión al antígeno deseada.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término **"dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente a un antígeno de la célula diana"** o "resto que puede unirse específicamente a una antígeno de la célula diana" se refiere a una molécula de polipéptido que se une específicamente a un determinante antigénico. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno puede activar la señalización a través de
- 10 su antígeno de la célula diana. En un aspecto particular, el dominio de unión a antígeno puede dirigir la entidad a la que se une (por ejemplo, el anticuerpo agonista anti-LTBR) a un sitio diana, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral o de estroma tumoral que porta el determinante antigénico. Los dominios de unión a antígeno que pueden unirse específicamente al antígeno de la célula diana incluyen
- 15 anticuerpos y fragmentos de los mismos como se define adicionalmente en el presente documento. Además, los dominios de unión a antígeno que pueden unirse específicamente a un antígeno de la célula diana incluyen proteínas de unión a antígeno de andamio como se define adicionalmente en el presente documento, por ejemplo dominios de unión basados en proteínas de repetición diseñadas o dominios
- 20 de repetición diseñados (véase, por ejemplo, el documento WO 2002/020565). En particular, el dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente a un antígeno de la célula diana es un dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP). En relación a un anticuerpo o fragmento del mismo, el término "dominio de unión a antígeno que puede
- 25 unirse específicamente a un antígeno de la célula diana" se refiere a la parte de la molécula que comprende el área a la que se une específicamente y es complementaria a una parte o a la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente al antígeno puede proporcionarse, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables del anticuerpo (también
- 30 denominados regiones variables del anticuerpo). En particular, un dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente al antígeno comprende una región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo y una región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo. En otro aspecto, el "dominio de unión al antígeno que puede unirse específicamente a un antígeno de la célula diana" también puede ser un
- 35 fragmento Fab o un fragmento Fab cruzado.

El término "**anticuerpo monoclonal**" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, a excepción de posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, dichas variantes generalmente se presentan en cantidades menores. Por el contrario de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno.

El término anticuerpo "**mono-específico**" como se usa en el presente documento indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítopo del mismo antígeno. El término "**biespecífica**" significa que la molécula de unión a antígeno puede unirse específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica puede unirse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, en particular dos determinantes antigénicos que se expresan en dos células distintas. Una molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento puede también formar parte de un anticuerpo multiespecífico.

El término "**valente**" como se usa dentro de la solicitud actual indica la presencia de un número específico de sitios de unión específicos para un determinante antigénico distinto en una molécula de unión a antígeno que son específicos para un determinante antigénico distinto. Como tales, los términos "bivalente", "tetraivalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión específicos para un determinante antigénico determinado, respectivamente, en una molécula de unión a antígeno. En aspectos particulares de la invención, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de acuerdo con la invención pueden ser monovalentes para un determinante antigénico determinado, lo que significa que solo tienen un sitio de unión para dicho determinante antigénico o pueden ser bivalentes o tetraivalentes para un determinante antigénico determinado, lo

que significa que tienen dos sitios de unión o cuatro sitios de unión, respectivamente, para dicho determinante antigénico.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural. Los "**anticuerpos naturales**" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variadas. Por ejemplo, los anticuerpos de clase IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 daltons, compuestos de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que están unidos por enlace disulfuro. Del extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también denominados región constante de la cadena pesada. De forma similar, del extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguido de un dominio constante de la cadena ligera (CL), también denominado región constante de la cadena ligera. La cadena pesada de un anticuerpo puede asignarse a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales pueden dividirse adicionalmente en subtipos, por ejemplo, $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3), $\gamma 4$ (IgG4), $\alpha 1$ (IgA1) y $\alpha 2$ (IgA2). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basado en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Un "**fragmento de anticuerpo**" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, fragmentos Fab cruzados, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpos, véase Hudson y col, Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore, ed., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5,571,894 y 5,587,458. Para un análisis de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos del epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen un incremento de semivida *in vivo*, véase la

patente de EE. UU. n.º 5,869,046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos, véase, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 1993/01161; Hudson y col, Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger y col, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson y col, Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6,248,516 B1). Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse mediante diversas técnicas, que incluyen, pero sin limitarse a, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, E. coli o fago), como se describe en el presente documento.

La digestión con papaína de anticuerpos intactos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab" que contienen cada uno, los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Como se usa en el presente documento, por tanto, el término "**fragmento Fab**" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de la cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio constante de la cadena ligera (CL), y un dominio VH y un primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los Fab'-SH son fragmentos Fab' en los que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) un grupo tiol libre. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación al antígeno (dos fragmentos Fab) y una parte de la región Fc. De acuerdo con la presente invención, el término "fragmento Fab" también incluye "fragmentos Fab cruzados" o "fragmentos Fab con entrecruzamiento" como se define a continuación.

El término "**fragmento Fab cruzado**" o "fragmento xFab" o "fragmento Fab con entrecruzamiento" se refiere a un fragmento Fab, en el que se intercambian las regiones variables o las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera. Son posibles dos composiciones de las cadenas diferentes de una molécula de Fab con

- entrecruzamiento y están comprendidas en los anticuerpos biespecíficos de la invención: Por una parte, las regiones variables de la cadena pesada y ligera del Fab se intercambian, es decir, la molécula Fab con entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada (CH1), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL). Esta molécula Fab con entrecruzamiento también se conoce como Fab cruzado (VLVH). Por otra parte, cuando se intercambian las regiones constantes de la cadena pesada y ligera del Fab, la molécula Fab con entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada (CH1). Esta molécula Fab con entrecruzamiento también se conoce como Fab cruzado (CLCH1).
- 15 Un “fragmento Fab monocatenario” o “**scFab**” es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) del anticuerpo, un dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo, un dominio constante de la cadena ligera (CL) del anticuerpo y un conector, en el que dichos dominios del anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes órdenes en el sentido N terminal a C terminal: a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1 o d) VL-CH1-conector-VH-CL; y en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios se estabilizan mediante el enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. Además, estas moléculas de Fab monocatenario pueden estabilizarse adicionalmente mediante la generación de enlaces disulfuro intercatenarios por medio de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, posición 44 en la cadena pesada variable y posición 100 en la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat).
- Un “fragmento Fab monocatenario con entrecruzamiento” o “**x-scFab**” es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo, un dominio constante 1 del anticuerpo (CH1), un dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo, un dominio constante de la cadena ligera (CL) del anticuerpo y un conector, en el que dichos dominios del anticuerpo y dicho conector tienen uno de los siguientes órdenes en el sentido N terminal a C terminal: a) VH-CL-conector-VL-CH1 y b) VL-CH1-conector-VH-CL; en el que VH y VL forman juntos un

sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno y en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos. Además, estas moléculas x-scFab pueden estabilizarse adicionalmente mediante la generación de enlaces disulfuro intercatenarios por medio de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, posición 44 en la cadena pesada variable y posición 100 en la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat).

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

Las “**proteínas de unión a antígeno de andamio**” son conocidas en la técnica, por ejemplo, la fibronectina y las proteínas de repeticiones de anquirina diseñadas (DARPin) se han usado como andamios alternativos para los dominios de unión a antígeno, véase, por ejemplo, Gebauer y Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) y Stumpp y col, *Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008). En un aspecto de la invención, una proteína de unión a antígeno de andamio se selecciona del grupo que consiste en CTLA-4 (Evicuerpo), lipocalinas (Anticalin), una molécula derivada de la proteína A tal como el dominio Z de la proteína A (Aficuerpo), un dominio A (Avimer/Maxibody), una transferrina sérica (trans-cuerpo); una proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio variable de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo (anticuerpo de dominio único, sdAb), un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo (nanocuerpo, aVH), fragmentos V_{NAR} , una fibronectina (AdNectin), un dominio de lectina de tipo C (Tetranectin) un dominio variable de un nuevo antígeno del receptor de

betalactamasas (fragmentos V_{NAR}), una gamma-cristalina humana o ubiquitina (moléculas afilinas); un dominio de tipo kunitz de inhibidores de proteasas humanas, microcuerpos tales como las proteínas de la familia knottin, aptámeros peptídicos y fibronectina (adnectina). El CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) es un receptor de la familia CD28 que se expresa principalmente en los linfocitos T CD4⁺. Su dominio extracelular tiene un dominio variable de tipo pliegue de Ig. Los bucles que corresponden a las CDR de los anticuerpos pueden sustituirse con una secuencia heteróloga para conferir diferentes propiedades de unión. Las moléculas de CTLA-4 genomanipuladas para que tengan diferentes especificidades de unión también son conocidas como evicuerpos (por ejemplo, documento US7166697B1). Los evicuerpos tienen aproximadamente el mismo tamaño que la región variable aislada de un anticuerpo (por ejemplo, un dominio de anticuerpo). Para detalles adicionales véase Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001). Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que transportan pequeñas moléculas hidrófobas tales como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Tienen una estructura secundaria rígida en forma de lámina beta con un número de bucles en el extremo abierto de la estructura cónica que pueden genomanipularse para unirse a diferentes antígenos diana. Las anticalinas tienen un tamaño entre 160-180 aminoácidos y se derivan de lipocalinas. Para detalles adicionales véase Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), documentos US7250297B1 y US20070224633. Un aficuerpo es un andamio derivado de la proteína A de Staphylococcus aureus que puede genomanipularse para unirse al antígeno. El dominio consiste en un haz de tres hélices de aproximadamente 58 aminoácidos. Se han generado colecciones mediante la aleatorización de los residuos de superficie. Para detalles adicionales véase Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17, 455-462 y el documento EP 1641818A1. Los avímeros son proteínas multidominio derivadas de la familia de la matriz del dominio A. Los dominios naturales de aproximadamente 35 aminoácidos adoptan una estructura definida de enlace disulfuro. La diversidad se genera mediante la mezcla de la variación natural que se exhibe por la familia de dominios A. Para detalles adicionales véase Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) y Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (Junio de 2007). La transferrina es una glicoproteína monomérica de transporte en suero. Las transferrinas pueden genomanipularse para unirse a diferentes antígenos diana mediante la inserción de secuencias peptídicas en un bucle superficial permisivo. Los ejemplos de andamios de transferrina genomanipulados incluyen el trans-cuerpo. Para detalles adicionales véase J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999). Las proteínas de

repetición de anquirina diseñadas (DARPin) se derivan de la anquirina, que es una familia de proteínas que median la unión de las proteínas integrales de membrana al citoesqueleto. Una repetición de anquirina simple es un motivo de 33 residuos que consiste en dos hélices alfa y un giro beta. Pueden genomanipularse para unir

5 diferentes antígenos diana mediante la aleatorización de los residuos de la primera hélice alfa y de un giro beta de cada repetición. Su interfase de unión puede incrementarse mediante el incremento del número de módulos (un procedimiento de maduración de la afinidad). Para detalles adicionales véase J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), el documento PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) y J. Mol. Biol. 369, 1015-1028

10 (2007) y el documento US20040132028A1. Un anticuerpo de dominio único es un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio único variable monomérico de un anticuerpo. Los primeros dominios únicos se derivaron del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de los camélidos (nanocuerpos o fragmentos V_HH). Además, el término anticuerpo de dominio único incluye un dominio variable de la

15 cadena pesada humana autónoma (aVH) o fragmentos V_{NAR} derivados de tiburones. La fibronectina es un andamio que puede genomanipularse para unirse a un antígeno. Las adnectinas consisten en una cadena principal de la secuencia natural de aminoácidos del 10mo dominio de las 15 unidades de repetición de la fibronectina humana de tipo III (FN3). Pueden genomanipularse tres bucles en un extremo del

20 sándwich beta para permitir que una adnectina reconozca específicamente una diana terapéutica de interés. Para detalles adicionales véase Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005), los documentos US20080139791, WO2005056764 y US6818418B1. Los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento combinatorio que consisten en una proteína de andamio constante, típicamente la tiorredoxina (TrxA) que contiene un

25 bucle peptídico variable restringido que se inserta en el sitio activo. Para detalles adicionales véase Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005). Los microcuerpos se derivan de microproteínas naturales de 25-50 aminoácidos de longitud que contienen 3-4 puentes de cisteína, los ejemplos de microproteínas incluyen KalataBI y conotoxina y knotinas. Las microproteínas tienen un bucle que puede

30 genomanipularse para incluir hasta 25 aminoácidos sin afectar el plegamiento general de la microproteína. Para detalles adicionales de los dominios de knotina genomanipulados, véase el documento WO2008098796.

Un “**anticuerpo que se une al mismo epítipo**” que una molécula de referencia se refiere a una molécula de unión a antígeno que bloquea la unión de la molécula de

35 referencia a su antígeno en un ensayo de competencia por un 50 % o más y por el

contrario, la molécula de referencia bloquea la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno en un ensayo de competencia por un 50 % o más. Un “**anticuerpo que no se une al mismo epítipo**” que una molécula de referencia se refiere a una molécula de unión a antígeno que no bloquea la unión de la molécula de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia por un 50 % o más y por el contrario, la molécula de referencia no bloquea la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno en un ensayo de competencia por un 50 % o más.

El término “**dominio de unión a antígeno**” o “sitio de unión a antígeno” se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área a la que se une específicamente y es complementaria a una parte o a la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo puede unirse a una parte en particular del antígeno, cuya parte se denomina epítipo. Un dominio de unión a antígeno puede proporcionarse, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables (también denominados regiones variables). Preferentemente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo y una región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término “**determinante antigénico**” es sinónimo de “antígeno” y “epítipo” y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional constituido por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula de polipéptido a la que se une un resto de unión al antígeno, lo que forma un complejo resto de unión a antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles pueden encontrarse, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células enfermas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas útiles como antígenos en el presente documento pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En un modo de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en el presente documento, el término engloba la proteína “de longitud completa” sin procesar, así como cualquier forma de la proteína que resulta del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

- Se entiende por “**unión específica**” que la unión es selectiva para el antígeno y puede diferenciarse de las interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de una molécula de unión a antígeno de unirse a un antígeno específico puede medirse ya sea a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (que se analiza en un instrumento de BIAcore) (Liljeblad y col, Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión de una molécula de unión al antígeno a una proteína no relacionada es menos de aproximadamente el 10 % de la unión de la molécula de unión al antígeno al antígeno como se mide, por ejemplo, mediante SPR. En determinados modos de realización, una molécula que se une al antígeno tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo 10^{-8} M o menos, por ejemplo de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo de 10^{-9} M a 10^{-13} M).
- 15 “**Afinidad**” o “afinidad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y se puede representar generalmente mediante la constante de disociación (Kd), que es la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación (koff y kon, respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre y cuando la proporción de las constantes de velocidad sea la misma. La afinidad se puede medir mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en el presente documento. Un procedimiento particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmones superficiales (SPR).
- 20 Un anticuerpo con “**maduración de la afinidad**” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dichas alteraciones dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno.
- Un “**antígeno de la célula diana**” como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico que se presenta en la superficie de una célula diana, en particular una célula diana en un tumor, tal como una célula cancerosa o una célula del

estroma tumoral. Por tanto, el antígeno de la célula diana es un antígeno asociado a tumor. En particular, el "**antígeno asociado a tumor**" o TAA es la proteína de activación de fibroblastos (FAP).

El término "**proteína de activación de fibroblastos (FAP)**", también conocida como

5 proil endopeptidasa FAP o Seprasa (EC 3.4.21), se refiere a cualquier FAP natural de cualquier fuente de vertebrado, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, monos cynomolgus) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba FAP sin procesar, de "longitud completa", así como cualquier forma

10 de la FAP que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la FAP, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno de la invención puede unirse específicamente a FAP humana, de ratón y/o de cynomolgus. La secuencia de aminoácidos de FAP humana se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el n.º de acceso Q12884 (versión 149, SEQ ID NO:2) o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2. El dominio extracelular (DEC) de FAP humana se extiende desde la posición del aminoácido 26 al 760. La secuencia de aminoácidos de una FAP humana etiquetada con Avi-His se muestra en SEQ ID NO:264. La secuencia de aminoácidos de FAP de ratón se muestra en UniProt con n.º de acceso P97321 (versión 126, SEQ

20 ID NO:282) o NCBI RefSeq NP_032012.1. El dominio extracelular (DEC) de FAP de ratón se extiende desde la posición del aminoácido 26 al 761. La SEQ ID NO:265 muestra el aminoácido de una FAP de ratón marcada con Avi-His. Preferentemente, una molécula de unión anti-FAP de la invención se une al dominio extracelular de FAP. El término "**región variable**" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que está implicado en la unión de la molécula de unión a antígeno con el antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen en general estructuras similares, en donde cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt y col,

30 Kuby Immunology, 6a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable del anticuerpo que son hipervariables en secuencia y que determinan la especificidad de unión al antígeno,

35 por ejemplo, las "**regiones determinantes de la complementariedad**" ("CDR").

En general, los anticuerpos comprenden seis CDR; tres en la VH (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres en la VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Las CDR ejemplares en el presente documento incluyen:

- (a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));
- (b) CDR que se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat y col, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); y
- (c) contactos con el antígeno que se producen en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum y col, *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

A menos que se indique de otro modo, las CDR se determinan de acuerdo con Kabat y col, más arriba. Un experto en la técnica entenderá que las designaciones de CDR también se pueden determinar de acuerdo con Chothia, más arriba, McCallum, más arriba, o cualquier otro sistema de nomenclatura aceptado científicamente.

El “**marco**” o “FR” se refiere a los residuos de dominio variable distintos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). El FR de un dominio variable, en general, consiste en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de CDR y FR, en general, aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2- CDR-H2(CDR-L2)-FR3- CDR-H3(CDR-L3)-FR4.

El término anticuerpo “**quimérico**” se refiere a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de fuentes o especies diferentes. La “**clase**” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

Un anticuerpo “**humanizado**” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanos. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado

comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas los FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado

5 opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante del anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "**forma humanizada**" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se sometió a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanizados" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado

10 adicionalmente a partir del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o la unión al receptor de Fc (FcR).

El término "**dominio CH1**" indica la parte de un polipéptido de la cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 118 a la posición

15 EU 215 (sistema de numeración EU de acuerdo con Kabat). En un aspecto, un dominio CH1 tiene la secuencia de aminoácidos de ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV (SEQ ID NO: 283). Normalmente, un segmento que tiene la secuencia de aminoácidos de EPKSC (SEQ ID NO:284)

20 persigue unir el dominio CH1 a la región bisagra, sin embargo, en el caso de un dominio CH1 con un extremo C terminal libre (tal como en un fragmento fab cruzado) este segmento también puede comprender la secuencia de aminoácidos de EPKSCD (SEQ ID NO:285) o EPKSCS (SEQ ID NO:286).

El término "**región bisagra**" indica la parte de un polipéptido de la cadena pesada de un anticuerpo que se une al dominio CH1 y al dominio CH2 de la cadena pesada de un anticuerpo natural, por ejemplo, de aproximadamente la posición 216 a aproximadamente la posición 230 de acuerdo con el sistema de numeración EU de Kabat, o de aproximadamente la posición 226 a aproximadamente la posición 230 de acuerdo con el sistema de numeración EU de Kabat. Las regiones bisagra de otras

30 subclases de IgG se pueden determinar mediante la alineación con los residuos de cisteína de la región bisagra de la secuencia de la subclase IgG1. La región bisagra es normalmente una molécula dimérica que consiste en dos polipéptidos con una secuencia de aminoácidos idéntica. La región bisagra comprende en general hasta 25 residuos de aminoácidos y es flexible, lo que permite que los sitios de unión a la diana

35 asociados se muevan independientemente. La región bisagra se puede subdividir en

tres dominios: el dominio bisagra superior, el medio y el inferior (véase por ejemplo Roux, y col, J. Immunol. 161 (1998) 4083). En un aspecto, la región bisagra tiene la secuencia de aminoácidos DKTHTCPXCP (SEQ ID NO:287), en la que X es S o P. En un aspecto, la región bisagra tiene la secuencia de aminoácidos HTCPXCP (SEQ ID NO:288), en la que X es S o P. En un aspecto, la región bisagra tiene la secuencia de aminoácidos CPXCP (SEQ ID NO:289), en la que X es S o P.

El término "dominio Fc" o "**región Fc**" se usa en el presente documento para definir una región C terminal de una cadena pesada del anticuerpo que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y variantes de regiones Fc. Una región Fc de IgG comprende un dominio CH2 de IgG y CH3 de IgG. El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 231 a un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 340. (sistema de numeración EU de acuerdo con Kabat). En un aspecto, el dominio CH2 tiene la secuencia de aminoácidos de APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQESTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAK (SEQ ID NO: 290). El dominio CH2 es único en cuanto a que no se empareja estrechamente con otro dominio. En su lugar, dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N se intercalan entre los dos dominios CH2 de una región Fc natural intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206. En un modo de realización, una cadena de carbohidrato se une al dominio CH2. El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia natural o una variante del dominio CH2. El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 341 a un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU de acuerdo con Kabat de una IgG). En un aspecto, el dominio CH3 tiene la secuencia de aminoácidos de GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO: 291). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia natural o una variante del dominio CH3 (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" ("botón") en una cadena del mismo y una "cavidad" ("ojal") correspondiente introducida en la otra cadena del mismo; véase la

patente de EE. UU. n.º 5,821,333, incorporada expresamente en el presente documento como referencia). Dichas variantes de dominios CH3 pueden usarse para promover la heterodimerización de dos cadenas pesadas no idénticas del anticuerpo como se describe en el presente documento. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

El término “**dominio Fc natural**” indica una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc que se encuentra en la naturaleza. Los dominios Fc humanos naturales incluyen una región Fc de IgG1 humana natural (alotipos A y no A); una región Fc de IgG2 humana natural; una región Fc de IgG3 humana natural; y una región Fc de IgG4 humana natural, así como las variantes naturales de las mismas. Las regiones Fc naturales se indican en SEQ ID NO:155 (IgG1, alotipo caucásico), SEQ ID NO:156 (IgG1, alotipo afroamericano), SEQ ID NO:157 (IgG2), SEQ ID NO:158 (IgG3) y SEQ ID NO:159 (IgG4). El término “**variante de dominio Fc (humano)**” indica una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos del dominio Fc “natural” (humano) en virtud de al menos una “mutación aminoacídica”. En un aspecto, la variante de región Fc tiene al menos una mutación aminoacídica en comparación con una región Fc natural, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez mutaciones aminoacídicas y en un aspecto de aproximadamente una a aproximadamente cinco mutaciones aminoacídicas en una región Fc natural. En un aspecto, la región Fc (variante) tiene al menos aproximadamente 95 % de homología con una región Fc natural.

La tecnología de “**botón en ojal**” se describe, por ejemplo, en los documentos US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway y col, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia (“botón”) en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente (“ojal”) en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se

construyen reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar con respecto a las protuberancias se crean en la interfase del segundo polipéptido reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La protuberancia y la cavidad se pueden elaborar al alterar el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis específica del sitio o síntesis de péptidos. En un modo de realización específico una modificación de botón comprende la sustitución aminoacídica T366W en una de las dos subunidades del dominio Fc, y la modificación de ojal comprende las sustituciones aminoacídicas T366S, L368A e Y407V en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. En otro modo de realización específico, la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación del botón comprende adicionalmente la sustitución aminoacídica S354C, y la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de ojal comprende adicionalmente la sustitución aminoacídica Y349C. La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades de la región Fc, por tanto estabiliza adicionalmente el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Una "región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina" pretende incluir variantes alélicas naturales en la región Fc de una inmunoglobulina así como variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar las funciones efectoras (tal como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden eliminarse del extremo N o del extremo C de la región Fc de una inmunoglobulina sin la pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes se pueden seleccionar de acuerdo con reglas generales conocidas en la técnica para tener un efecto mínimo sobre la actividad (véase, por ejemplo, Bowie, J. U. y col, Science 247:1306-10 (1990)).

El término "**función efectora**" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión al receptor de Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, absorción de antígenos mediada por el complejo inmunitario mediante células presentadoras de antígenos, regulación por

disminución de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Las funciones efectoras dependientes de la unión del receptor de Fc pueden ser mediadas por la interacción de la región Fc de un anticuerpo con los receptores de Fc (FcR), que son receptores especializados de la superficie celular de las células hematopoyéticas. Los receptores de Fc pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se ha demostrado que median tanto la eliminación de patógenos recubiertos de anticuerpos mediante fagocitosis de complejos inmunitarios, como la lisis de eritrocitos y diversas otras dianas celulares (por ejemplo, células tumorales) recubiertas con el anticuerpo correspondiente, por medio de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase, por ejemplo, Van de Winkel, J.G. y Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). Los FcR se definen por su especificidad para los isotipos de inmunoglobulina: Los receptores de Fc para anticuerpos IgG se denominan FcγR. La unión al receptor de Fc se describe, por ejemplo, en Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492, Capel, P.J., y col, *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M., y col, *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; y Gessner, J.E., y col, *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

La reticulación de receptores para la región Fc de anticuerpos IgG (FcγR) desencadena una amplia variedad de funciones efectoras que incluyen la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la liberación de mediadores inflamatorios, así como el aclaramiento de complejos inmunitarios y la regulación de la producción de anticuerpos. En humanos, se han caracterizado tres clases de FcγR, que son:

- El FcγRI (CD64) se une a la IgG monomérica con alta afinidad y se expresa en macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. La modificación en la región Fc de IgG al menos en uno de los residuos de aminoácido E233-G236, P238, D265, N297, A327 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) reduce la unión a FcγRI. Los residuos de IgG2 en las posiciones 233-236, sustituidos en IgG1 e IgG4, reducen la unión a FcγRI en 10^3 veces y eliminan la respuesta de los monocitos humanos a los glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos (Armour, K.L., y col, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624).

- El FcγRII (CD32) se une a los complejos de IgG con una afinidad de media a baja y se expresa ampliamente. Este receptor se puede dividir en dos subtipos, FcγRIIA y FcγRIIB. El FcγRIIA se encuentra en muchas células implicadas en la muerte (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos) y parece capaz de activar el proceso de

muerte. El FcγRIIB parece desempeñar un papel en los procesos inhibitorios y se encuentra en los linfocitos B, macrófagos y mastocitos y eosinófilos. En los linfocitos B parece funcionar para suprimir la producción de otras inmunoglobulinas y para el cambio de isotipo, por ejemplo, para la clase IgE. En los macrófagos, el FcγRIIB actúa para inhibir la fagocitosis como es mediada a través del FcγRIIA. En eosinófilos y mastocitos la forma B puede ayudar a suprimir la activación de estas células a través de uniones de IgE a su receptor separado. La reducción de la unión por FcγRIIA se encuentra, por ejemplo, en anticuerpos que comprenden una región Fc de IgG con mutaciones al menos en uno de los residuos de aminoácido E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 y K414 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

- El FcγRIII (CD16) se une a la IgG con una afinidad de media a baja y existen dos tipos. El FcγRIIIA se encuentra en células NK, macrófagos, eosinófilos y algunos monocitos y linfocitos T y media la ADCC. El FcγRIIIB se expresa altamente en los neutrófilos. La reducción de la unión a FcγRIIIA se encuentra, por ejemplo, en anticuerpos que comprenden una región Fc de IgG con mutaciones al menos en uno de los residuos de aminoácidos E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 y D376 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

El mapeo de los sitios de unión en la IgG1 humana para los receptores de Fc, los sitios de mutación mencionados anteriormente y los procedimientos para medir la unión a FcγRI y FcγRIIA se describen en Shields, R.L., y col J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604.

El término "**ADCC**" o "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" es una función mediada por la unión al receptor de Fc y se refiere a la lisis de células diana por un anticuerpo como se informa en el presente documento en presencia de células efectoras. La capacidad del anticuerpo de inducir las etapas iniciales mediadas por ADCC se investigan mediante la medición de su unión a células que expresan receptores Fcγ, tales como células que expresan recombinantemente FcγRI y/o FcγRIIA o linfocitos NK (que expresan esencialmente FcγRIIIA). En particular, se mide la unión al FcγR en los linfocitos NK.

Un "**receptor de Fc de activación**" es un receptor de Fc que seguido del acoplamiento mediante una región Fc de un anticuerpo provoca eventos de señalización que estimulan la célula que porta el receptor para que ejecute funciones efectoras. Los receptores de Fc de activación incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI

(CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89). Un receptor de Fc de activación particular es el FcγRIIIa humano (véase UniProt con el n.º de acceso P08637, versión 141).

El término "**LTBR**", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier receptor de linfotóxina beta (LTBR) natural de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba los LTBR sin procesar, de "longitud completa", así como cualquier forma de LTBR que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba las variantes naturales de LTBR, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un LTBR humano ejemplar se muestra en SEQ ID NO:1 (Uniprot No. P36941) y la secuencia de aminoácidos de un LTBR de ratón ejemplar se muestra en SEQ ID NO: 297 (Uniprot No. B2RRV3). El receptor se expresa en la superficie de las células del parénquima y el estroma de la mayoría de los órganos linfáticos, pero está ausente en los linfocitos T y B. LTBR también puede denominarse "miembro 3 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF3)". La señalización a través de LTBR por el heterotrímero LTα/β (LTα1β2) es importante durante el desarrollo linfático. También se conoce que LTBR se une al ligando LIGHT (TNFSF14). Mientras que LTα1β2 es específico para LTBR, LIGHT también se une y activa HVEM (TNFRSF14), un receptor expresado e implicado en la regulación de las células inmunitarias.

El término "**agonista de LTBR**", como se usa en el presente documento, incluye cualquier resto que agoneice la interacción de LTBR con su ligando. LTBR como se usa en este contexto se refiere preferentemente a LTBR humano, por tanto el agonista de LTBR es preferentemente un agonista de LTBR humano (SEQ ID NO:1). Típicamente, el resto será un anticuerpo o fragmento de anticuerpo agonista anti-LTBR.

Los términos "**anticuerpo anti-LTBR**", "anti-LTBR", "anticuerpo LTBR" y "un anticuerpo que se une específicamente a LTBR" se refieren a un anticuerpo que se une específicamente a LTBR con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a LTBR. En un aspecto, el grado de unión de un anticuerpo anti-LTBR a una proteína no relacionada con LTBR es menos de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a LTBR, medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA) o citometría de flujo (FACS). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a LTBR tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01$

nM o $\leq 0,001$ nM (por ejemplo, 10^{-6} M o menos, por ejemplo, de 10^{-68} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-10} M).

El término **“conector peptídico”** se refiere a un péptido que comprende uno o más aminoácidos, típicamente de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos en la técnica o se describen en el presente documento. Los péptidos conectores adecuados, no inmunogénicos son, por ejemplo, conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en el que “n” es en general un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4, en particular 2, es decir los péptidos seleccionados del grupo que consiste en GGGGS (SEQ ID NO:298), GGGSGGGGS (SEQ ID NO:299), SGGGSGGGG (SEQ ID NO:300) y GGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:301), pero también incluye las secuencias GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:302), $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:303), $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:304), GSGSGSGS (SEQ ID NO:305), GSGSGNGS (SEQ ID NO:306), GSGSGSG (SEQ ID NO:307), GSGSG (SEQ ID NO:308), GGSG (SEQ ID NO:309), GSGNGSG (SEQ ID NO:310), GGNGSGSG (SEQ ID NO:311) y GGNGSG (SEQ ID NO:312). Los conectores peptídicos de interés particular son (G_4S) (SEQ ID NO:298), $(G_4S)_2$ o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:299), $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:303) y $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:304).

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

Por **“fusionado”** o **“conectado”** se entiende que los componentes (por ejemplo, una cadena pesada de un anticuerpo y un fragmento Fab) están conectados mediante enlaces peptídicos, ya sea directamente o por medio de uno o más conectores peptídicos.

“Por ciento (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia polipeptídica (proteína) de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo por ciento de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como

parte de la identidad de secuencia para los propósitos de la alineación. La alineación para los propósitos de determinar el por ciento de identidad de secuencia de aminoácido se puede lograr de diversas maneras que se están dentro del experto en la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles para el público, tales como los programas informáticos BLAST, BLAST-2, Clustal W y Megalign (DNASTAR) o el paquete de programas FASTA. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualquiera de los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. De forma alternativa, los valores de por ciento de identidad se pueden generar usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado junto con la documentación del usuario en la Oficina de derecho de autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el n.º de registro de derecho de autor de EE. UU. TXU510087 y se describe en el documento WO 2001/007611. A menos que se indique de otro modo, para los propósitos del presente documento, se generan valores de por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa ggsearch del paquete FASTA, versión 36.3.8c o posterior, con una matriz de comparación BLOSUM50. El paquete de programas FASTA fue creado por W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227- 258; y Pearson y col, (1997) Genomics 46:24-36 y está disponible al público en www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml o www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta. De forma alternativa, se puede usar un servidor público al que se puede acceder en fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi para comparar las secuencias, usando el programa ggsearch (global protein:protein) y las opciones por defecto (BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup = 2) para garantizar que se realice una alineación global, más que local. El por ciento de identidad de aminoácidos se proporciona en el encabezado de alineación de salida.

En determinados modos de realización, se contemplan las **variantes de secuencias de aminoácidos** de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de las moléculas de unión a antígeno que contienen el ligando trimérico del TNF. Las variantes de las secuencias

- de aminoácidos de las moléculas de unión a antígeno que contienen el ligando trimérico del TNF se pueden preparar mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las moléculas o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de delecciones, inserciones y sustituciones para lograr la construcción final, siempre que la construcción final tenga las características deseadas, por ejemplo, unión al antígeno. Los sitios de interés para mutagénesis por sustitución incluyen las HVR y los marcos (FR). Se proporcionan sustituciones conservadoras en la Tabla B con el título “Sustituciones preferentes” y a continuación se describen otras con respecto a las clases de cadenas laterales de aminoácidos (1) a (6). Las sustituciones aminoacídicas pueden introducirse en la molécula de interés y los productos cribados para determinar la actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, disminución de la inmunogenicidad o mejora de ADCC o CDC.

TABLA A

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 5 (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

El término “**variantes de las secuencias de aminoácidos**” incluye variantes sustanciales en las que existen sustituciones aminoacídicas en uno o más residuos de la región hipervariable de una molécula de unión a antígeno original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para estudios adicionales tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, incremento de la afinidad, reducción de la inmunogenicidad) en relación con la molécula de unión a antígeno original y/o habrán retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas de la molécula de unión a antígeno original. Una variante de sustitución de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que se puede generar de manera conveniente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en expresión en fago, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, uno o más residuos de CDR mutan y las variantes de las moléculas de unión a antígeno se expresan en fago y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión). En determinados modos de realización, pueden ocurrir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad de la molécula de unión a antígeno de unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden producirse alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras que se proporcionan en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las CDR. Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puede ser diana de la mutagénesis se denomina “mutagénesis por barrido de alanina”, como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu)

se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se afecta. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que demuestran la sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa o adicionalmente, puede determinarse una estructura cristalina de un complejo de molécula de unión a antígeno-antígeno para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos contiguos pueden ser diana o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones del extremo amino y/o carboxilo terminal que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula incluyen la fusión del extremo N o C a un polipéptido que incrementa la semivida en suero de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas.

En determinadas aspectos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se proporcionan en el presente documento se alteran para incrementar o disminuir el grado al que el anticuerpo se glicosila. Las variantes de glicosilación de las moléculas se pueden obtener convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o se retiren uno o más sitios de glicosilación. Cuando la molécula de unión a antígeno que contiene el ligando trimérico del TNF comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado biantenarico que se une en general mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright y col, *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tronco" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización, se pueden producir modificaciones del oligosacárido en la molécula de unión a antígeno que contiene el ligando trimérico de la familia del TNF para crear variantes con determinadas propiedades mejoradas. En un aspecto, se proporcionan variantes de moléculas de unión a antígeno biespecíficas o anticuerpos

de la invención que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa que se une (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una mejor función de ADCC, véase, por ejemplo, la publicación de patentes de EE. UU. n.ºs 2003/0157108 (Presta, L.) o US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). En otro aspecto, las variantes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas o anticuerpos de la invención se proporcionan con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en las que el oligosacárido biantenarico que se une a la región Fc se bisecciona mediante GlcNAc. Dichas variantes pueden tener reducida la fucosilación y/o mejorada la función de ADCC, véase, por ejemplo, el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet y col); la patente de EE. UU. n.º 6,602,684 (Umana y col); y el documento US 2005/0123546 (Umana y col). También se proporcionan variantes con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido que se une a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener mejorada la función del CDC y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel y col), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

En determinados aspectos, puede ser conveniente crear variantes genomanipuladas con cisteína de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención, por ejemplo, "tioAcM", en los que uno o más residuos de la molécula se sustituyen con residuos de cisteína. En aspectos particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles de la molécula. Al sustituir aquellos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármacos o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado. En determinados aspectos, cualquiera de uno o más de los siguientes residuos se pueden sustituir con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Pueden generarse moléculas de unión a antígeno genomanipuladas con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7,521,541.

El término "ácido nucleico" o "**polinucleótido**" incluye cualquier compuesto y/o sustancia que comprende un polímero de nucleótidos. Cada nucleótido está compuesto de una base, específicamente, una base de purina o pirimidina (es decir, citosina (C), guanina (G), adenina (A), timina (T) o uracilo (U)), un azúcar (es decir, desoxirribosa o ribosa) y un grupo fosfato. A menudo, la molécula de ácido nucleico se describe mediante la secuencia de bases, con lo que dichas bases representan la estructura primaria (estructura lineal) de una molécula de ácido nucleico. La secuencia

de bases, típicamente, se representa de 5' a 3'. En la presente documento, el término molécula de ácido nucleico engloba ácido desoxirribonucleico (ADN) que incluye, por ejemplo, ADN complementario (ADNc) y ADN genómico, ácido ribonucleico (ARN), en particular, ARN mensajero (ARNm), formas sintéticas de ADN o ARN, y polímeros mixtos que comprenden dos o más de estas moléculas. La molécula de ácido nucleico puede ser lineal o circular. Además, el término molécula de ácido nucleico incluye tanto las hebras sentido como antisentido, así como formas monocatenarias y bicatenarias. Asimismo, la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede contener nucleótidos naturales o no naturales. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen bases de nucleótidos modificadas con azúcares derivatizados o ligandos de la cadena principal de fosfato o residuos modificados químicamente. Las moléculas de ácido nucleico también engloban moléculas de ADN y ARN que son adecuadas como vectores para la expresión directa de un anticuerpo de la invención in vitro y/o in vivo, por ejemplo, en un huésped o paciente. Dichos vectores de ADN (por ejemplo, ADNc) o ARN (por ejemplo, ARNm) pueden estar modificados o sin modificar. Por ejemplo, el ARNm se puede modificar químicamente para potenciar la estabilidad del vector de ARN y/o la expresión de la molécula que se codifica de modo que se puede inyectar ARNm en un sujeto para generar el anticuerpo in vivo (véase, por ejemplo, Stadler y col, Nature Medicine 2017, publicado en línea el 12 de junio de 2017, doi:10.1038/nm.4356 o EP 2 101 823 B1).

Un ácido nucleico **“aislado”** se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que, en general, contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de manera extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

El **“ácido nucleico aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica o anticuerpo”** se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera (o fragmentos de las mismas) de la molécula de unión a antígeno biespecífica o anticuerpo, que incluye dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados, y dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

Por ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es

idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se puede eliminar o sustituir con otro nucleótido, o una cantidad de nucleótidos hasta 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones de extremo, interpuestas individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Prácticamente, si cualquier secuencia de polinucleótidos particular es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede determinar de manera convencional usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados anteriormente para los polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

El término "**casete de expresión**" se refiere a un polinucleótido generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácidos nucleicos que se transcribirá y un promotor. En determinados modos de realización, el casete de expresión de la invención comprende secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

El término "**vector**" o "vector de expresión" es sinónimo de "construcción de expresión" y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia operativamente en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico de autorreplicación así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula diana, la molécula

de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce mediante la maquinaria de transcripción y/o traducción celular. En un modo de realización, el vector de expresión de la invención comprende un casete de expresión que comprende secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno

5 biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

Los términos "**célula huésped**", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y hacen referencia a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, que incluye la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la

10 célula transformada principal y la progenie derivada de esta, independientemente de la cantidad de pases. La progenie puede no ser idéntica por completo en el contenido de ácido nucleico con respecto a una célula original, sino que puede contener mutaciones. En el presente documento se incluyen progenies mutantes que pueden tener la misma función o actividad biológica que se identifica o selecciona en la célula

15 transformada originalmente. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que puede usarse para generar las moléculas biespecíficas de unión a antígeno de la presente invención. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células

20 PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células que están comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

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

25

Una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye,

30 retrasa, minimiza o evita efectos adversos de una enfermedad.

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

35 un ser humano.

El término “**composición farmacéutica**” o “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en esta sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la composición farmacéutica.

Un “**portador farmacéuticamente aceptable**” se refiere a un ingrediente en una composición o formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

El término “**prospecto**” se usa para hacer referencia a instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, el tratamiento conjunto, las contraindicaciones y/o las advertencias que se refieren al uso de dichos productos terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, “**tratamiento**” (y las variaciones gramaticales del mismo tales como “tratar” o “que trata”) se refiere a una intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se trata y puede ejecutarse ya sea para profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos convenientes del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, a evitar la aparición o recaída de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o prognosis mejorada. En algunas modalidades, las moléculas de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término “**cáncer**” como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioloalveolares, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la

glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores de médula espinal, glioma de tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma hipofisario y sarcoma de Ewings, que incluyen las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

- 5 El término "**agente quimioterápico**" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. En un aspecto, el agente quimioterápico es un antimetabolito. En un aspecto, el antimetabolito se selecciona del grupo que consiste en aminopterina, metotrexato, pemetrexed, raltitrexed, cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina, capecitabina, citarabina, fluorouracilo, floxuridina y gemcitabina. En un aspecto particular, el antimetabolito es capecitabina o gemcitabina. En otro aspecto, el antimetabolito es fluorouracilo. En un aspecto, el agente quimioterápico es un agente que afecta la formación de microtúbulos. En un aspecto, el agente que afecta la formación de microtúbulos se selecciona del grupo que consiste en: paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, taxotere, etopósido y tenipósido. En otro aspecto, el agente quimioterápico es un agente alquilante tal como ciclofosfamida. En un aspecto, el agente quimioterápico es un antibiótico citotóxico tal como un inhibidor de la topoisomerasa II. En un aspecto, el inhibidor de la topoisomerasa II es doxorubicina.

Anticuerpos agonistas anti-LTBR ejemplares

- 25 Se proporcionan en el presente documento novedosos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al receptor de linfotoxina beta (LTBR). Se proporcionan novedosos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Por tanto, estos anticuerpos se unen específicamente al LTBR humano. Son anticuerpos agonistas anti-LTBR hu.

Estos anticuerpos son capaces de unirse al LTBR humano y al LTBR de cynomolgus con una diferencia de afinidad de menos de 2 veces. Algunos de los nuevos anticuerpos agonistas anti-LTBR hu son incluso capaces de unirse a LTBR humano, LTBR de cynomolgus y LTBR murino.

En el presente documento se divulgan anticuerpos agonistas anti-LTBR, que se unen al dominio extracelular de LTBR humano (DEC de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 359) con una CE_{50} de menos de 4 nM según se mide por ELISA (véase el Ejemplo 1.5). En un aspecto, los anticuerpos agonistas anti-LTBR se unen al DEC de

5 LTBR humano con una CE_{50} de menos de 1 nM medida por ELISA. En un aspecto particular, los anticuerpos agonistas anti-LTBR se unen al DEC de LTBR humano con una CE_{50} de menos de 0,15 nM medida por ELISA.

Los anticuerpos agonistas anti-LTBR según se divulga en el presente documento se unen al dominio extracelular de LTBR de cynomolgus (DEC de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 361) con una CE_{50} de menos de 5 nM según se mide por

10 ELISA (véase el Ejemplo 1.5). En un aspecto, los anticuerpos agonistas anti-LTBR se unen al DEC de LTBR de cynomolgus con una CE_{50} de menos de 0,5 nM medida por ELISA. En un aspecto particular, los anticuerpos agonistas anti-LTBR se unen al DEC de LTBR de cynomolgus con una CE_{50} de menos de 0,1 nM medida por ELISA.

15 Los anticuerpos agonistas anti-LTBR como se describen en el presente documento requieren la reticulación para que su actividad agonista active el LTBR humano, lo que significa que sólo pueden estimular el LTBR por medio de un mecanismo dependiente de la reticulación. Un "mecanismo dependiente de la reticulación" podría ser, por ejemplo, un mecanismo dependiente de la reticulación de Fc en el que el anticuerpo

20 tiene que unirse tanto a LTBR como a un receptor de Fc para estimular LTBR. Como tal, el anticuerpo tiene que ser capaz de unirse tanto a LTBR como a un receptor de Fc. Si el anticuerpo fuera independiente de la reticulación, podría estimular a LTBR en ausencia de la unión a un receptor de Fc. Esto podría conducir a una activación generalizada de los LTBR en el cuerpo humano y a graves problemas de seguridad

25 asociados a ella.

Los anticuerpos agonistas anti-LTBR como se describe en el presente documento también requieren reticulación para que su actividad agonista induzca la regulación por incremento de ICAM en células endoteliales de la vena umbilical humana o fibroblastos asociados al cáncer, como se muestra en el presente documento en el

30 Ejemplo 5.2.

Los anticuerpos agonistas anti-LTBR como se describe en el presente documento también son capaces de inhibir la interacción entre LTBR humano y sus ligandos humanos linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ y LIGHT. Esto se ha demostrado en los experimentos de competencia de ligandos por ELISA como se describe en el Ejemplo 1.6.

Se ha demostrado, que los anticuerpos agonistas anti-LTBR como se describe en el presente documento compiten por la unión a LTBR hu con LIGHT humano, es decir, un ligando natural de LTBR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:358.

- 5 En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo agonista anti-LTBR (o un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR), en el que dicho anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, o una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
25 aminoácidos de SEQ ID NO:40, o una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la
30 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que
35 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que

- comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-LTBR (o un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR), en el que dicho anticuerpo comprende

- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66,
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74,
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o

- 5 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

- 10 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-LTBR (o un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR), en el que dicho anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o

- 15 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

- 20 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o

- 25 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66,

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74,

- 30 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

- 35 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

En un aspecto particular, los anticuerpos agonistas anti-LTBR descritos en el presente documento son anticuerpos agonistas anti-LTBR que se unen específicamente a LTBR humano, LTBR de cynomolgus y LTBR murino. En el presente documento se divulgan anticuerpos agonistas anti-LTBR, que se unen al dominio extracelular de LTBR murino (DEC de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 360) con una CE_{50} de menos de 1 nM según se mide por ELISA (véase el Ejemplo 1.5). En un aspecto, los anticuerpos agonistas anti-LTBR se unen al DEC de LTBR murino con una CE_{50} de menos de 0,15 nM medida por ELISA.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-LTBR (o un dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR humano, LTBR de cynomolgus y LTBR murino que comprende

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.

En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR (o un dominio de unión a antígeno) que se une específicamente a LTBR humano, LTBR de cynomolgus y LTBR murino comprende

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

En un aspecto particular, un anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento se une a la región epitópica de SEQ ID NO:351 en LTBR humano. En un aspecto, un anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento se une a un epítipo que se solapa con el epítipo al que se une la

linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ humana en LTBR humano. En un aspecto, un anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento se une a una región epitópica diferente en LTBR humano que los anticuerpos de referencia BHA10 y CBE11. Esto se ha demostrado mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX) como se describe en el Ejemplo 6.4.

En un aspecto, dicho anticuerpo agonista anti-LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32. En un aspecto, comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34 (anticuerpo P1AE9459).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista anti-LTBR (o un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR) que se origina a partir de la inmunización en conejos transgénicos. En un aspecto, este anticuerpo (o dominio de unión a antígeno) comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 y una CDR-H3 que

- comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, o
- 5 (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la
- 10 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que
- 15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
- 20 aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que
- 25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o
- 30 (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la
- 35 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:71 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.

En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR (o dominio de unión a antígeno) derivado de la inmunización de un conejo transgénico es un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que presenta reactividad cruzada que se une específicamente a LTBR humano, de cynomolgus y de ratón. En un aspecto, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, o una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48. En un aspecto, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-LTBR humano que se origina a partir de la inmunización de ratas. En particular, este anticuerpo o dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que presenta reactividad cruzada que se une específicamente a LTBR humano, de cynomolgus y de ratón. En un aspecto, el anticuerpo o dominio de unión a

antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una

5 región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80. En un aspecto, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena

10 pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82.

Aún en otro aspecto, se proporciona un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-LTBR humano que se genera a partir de una colección de presentación en fagos. En particular, este anticuerpo o dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o dominio

15 de unión a antígeno que presenta reactividad cruzada que se une específicamente a LTBR humano, de cynomolgus y de ratón. En un aspecto, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

20 NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87 y una CDR-L3 que

25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88. En un aspecto, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:91, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:92 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de

30 aminoácidos de SEQ ID NO:93, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:94, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:95 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:96. En un aspecto, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende una región variable

35 de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90. En otro aspecto, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

En un aspecto, el anticuerpo que se une específicamente a LTBR es un anticuerpo de longitud completa, en particular de subclase IgG1 humana. En un aspecto particular, comprende las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto particular, el anticuerpo comprende

- (i) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:227 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:228, o
- 15 (ii) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:229 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:230, o
- (iii) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:231 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:232, o
- 20 (iv) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:233 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:234, o
- (v) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:235 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:236, o
- 25 (vi) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:237 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:238, o
- 30 (vii) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:239 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:240, o
- (viii) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:241 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:242, o
- 35

(ix) dos cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:243 y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:244.

Anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR

- 5 También se proporcionan en el presente documento nuevas moléculas de unión a antígeno biespecíficas que pueden unirse específicamente al receptor de linfotoxina beta (LTBR) y a un antígeno asociado a tumor tal como la proteína de activación de fibroblastos (FAP), que combinan un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP con al menos un dominio de unión a antígeno que puede
- 10 unirse de manera agonista a LTBR, en el que la activación a través del LTBR se proporciona por reticulación a través de la unión a FAP expresada en las células del estroma tumoral. Los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR descritos en el presente documento poseen propiedades en particular ventajosas tales como producibilidad, estabilidad, afinidad de unión, actividad biológica, eficacia del
- 15 direccionamiento, reducción de la internalización, propiedades farmacocinéticas (PK) aceptables, reducción de la toxicidad, intervalo de dosificación extendido que se puede administrar a un paciente y de este modo una posible potenciación de la eficacia.

Anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR ejemplares

- En un aspecto, se proporcionan anticuerpos agonistas anti-LTBR que son anticuerpos
- 20 multiespecíficos que comprenden el anticuerpo agonista anti-LTBR como se describe en el presente documento. En un aspecto, se proporcionan anticuerpos agonistas anti-LTBR que son anticuerpos biespecíficos. El anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende preferentemente un dominio Fc de origen humano, en particular de la subclase IgG humana, más en particular de la subclase IgG1 humana. En un
- 25 aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende un dominio Fc de la subclase IgG1 humana que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora. En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende un dominio Fc de la subclase IgG1 humana con las mutaciones
- 30 aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

- En un aspecto, el anticuerpo agonista anti-LTBR es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a LTBR y a un antígeno asociado a tumor (TAA). En particular, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR es un agonista de LTBR que se dirige
- 35 contra FAP. En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende

una región Fc compuesta por una primera y una segunda subunidad que comprende mutaciones que reducen la función efectora. El uso de una región Fc que comprende mutaciones que reducen o eliminan la función efectora evitará el agonismo inespecífico mediante reticulación por medio de los receptores Fc y evitará la ADCC de las células que expresan LTBR. Los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR descritos en el presente documento poseen la ventaja sobre los anticuerpos convencionales de que inducen selectivamente la respuesta inmunitaria en las células diana, que están típicamente en el estroma tumoral, es decir, en la proximidad del tumor.

- 5 Por tanto, los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR están caracterizados por la unión agonista a LTBR dirigida por FAP. En presencia de células que expresan FAP, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas son capaces de activar los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) (Ejemplo 5.2.1), activar las células endoteliales (Ejemplo 5.2.2) y modular el endotelio humano para regular por incremento las moléculas de adhesión y los quimioatrayentes, que son fundamentales para la cascada de infiltración inmunitaria. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento son capaces de inducir la adhesión de linfocitos T (Ejemplo 5.2.3).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende

- (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP),
- (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), y
- (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.

Los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR poseen un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que comprenden una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora. La reticulación mediada por el receptor de Fc queda de este modo anulada y la activación específica de tumor se logra mediante la reticulación a través de la unión del dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP a través de la unión a su diana asociada al tumor.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende

- (a) un primer fragmento Fab que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP),
 - 5 (b) un segundo fragmento Fab que se une específicamente al receptor de linfotoxina beta (LTBR), y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.
- 10 En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP) que comprende
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que
 - 15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de
 - 20 aminoácidos de SEQ ID NO:6, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, o
 - (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, una CDR-H2 que
 - 25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
 - 30 aminoácidos de SEQ ID NO:24, o
 - (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, y una región variable de la
 - 35 cadena ligera (V_L FAP) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:14, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende

- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24.

En un aspecto particular, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende (i) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena

- pesada (V_HFAP) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que
- 5 comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24. En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una
- 10 CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14, una CDR-L2 que comprende la secuencia de
- 15 aminoácidos de SEQ ID NO:15, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.
- En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y una
- 20 región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En otro aspecto, comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y
- 25 CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26. Aún en otro aspecto, comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18.
- 30 En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
- 35 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, o

comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

5 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, o comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

10 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18.

En un aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o comprende

15 una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 o comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la

20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En un aspecto particular, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En un aspecto,

25 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26. En otro aspecto, comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y una región variable de la cadena

30 ligera (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En particular, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En particular,

el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP es un fragmento Fab.

En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento comprende un segundo dominio de unión a antígeno que se une

5 específicamente a LTBR que comprende

- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que

10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de

15 aminoácidos de SEQ ID NO:32; o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la

20 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la

25 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80; o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una

30 CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región

35

variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88; o

- 5 (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, o
- 10 (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- 15 (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o
- 20 (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de
- 25
- 30

aminoácidos de SEQ ID NO:71, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.

En un aspecto particular, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la

5 cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante

10 de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32. En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la

15 cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

20 NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40. En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2

25 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de

30 aminoácidos de SEQ ID NO:48. En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de

35 aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR

5 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de

10 aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64. En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia

15 de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y

20 una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72. Aún en otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-

25 H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80. En otro aspecto, el segundo dominio de

30 unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera

35 (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.

En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR puede comprender una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:101, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:106. En un aspecto particular, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:100 (CBE11).

En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR puede comprender una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:343, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:344, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:345, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:346, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:347, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:348. En un aspecto particular, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:349 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:350 (BHA10).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR que comprende

- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
 5 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera
 (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
 10 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera
 (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
 15 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera
 (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
 20 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera
 (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
 25 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera
 (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98,
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
 30 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera
 (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
 aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42,
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
 35 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la

- secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 5 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, o
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una
- 10 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.
- En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que
- 15 comprende un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR que comprende
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- 20 (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 25 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia
- 30 de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98, o
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o

- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66,
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.
- 10 En un aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la
- 15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50. En un aspecto
- 20 particular, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34. En otro aspecto particular, el segundo dominio de unión a antígeno que se une
- 25 específicamente a LTBR comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42. Aún en otro aspecto particular, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende una región variable de la
- 30 cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.
- En otro aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR también puede unirse específicamente a LTBR murino y comprende

- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que
- 5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
- 10 aminoácidos de SEQ ID NO:32, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la
- 15 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que
- 20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de
- 25 aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80, o
- una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 y una CDR-H3 que
- 30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.

En un aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR también puede unirse específicamente a LTBR murino y comprende

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

5 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o

10 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o

15 una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

En un aspecto, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR también puede unirse específicamente a LTBR murino y comprende una región

20 variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un tercer dominio de unión a antígeno que

25 se une específicamente a LTBR, lo que significa una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende

(a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP),

30 (b) un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.

En un aspecto particular, el tercer dominio de unión a antígeno que se une

35 específicamente a LTBR es idéntico al segundo dominio de unión a antígeno que se

une específicamente a LTBR, lo que significa que el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR) son el mismo. En un aspecto, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR son fragmentos Fab que se unen específicamente a LTBR. En un aspecto, los fragmentos Fab que se unen específicamente a LTBR son fragmentos fab cruzados. En otro aspecto, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP es un fragmento Fab.

En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento comprende un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR que comprenden

(i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48; o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80; o

- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que
 5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la
 10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88; o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la
 15 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, o
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que
 20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
 25 aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que
 30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o

(viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la

5 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72.

En un aspecto particular, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno son

10 idénticos.

En un aspecto, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ

15 ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que

20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32. En un aspecto, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

25 NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39, y una CDR-L3 que

30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40. En un aspecto, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44,

35 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una

región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48. En otro aspecto, el

5 segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una

10 región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56. En un aspecto, el

15 segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una

20 región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64. En un aspecto, el

25 segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una

30 región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72. Aún en otro aspecto, el

35 segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76,

- y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que
- 5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80. En otro aspecto, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84,
- 10 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.
- 15 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR que comprenden
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 30 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 35 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera

- (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98,
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42,
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, o
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la
- 25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.
- En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen
- 30 específicamente a LTBR que comprenden
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o

- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
 - (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
 - (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
 - (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98, o
 - (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o
 - (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
 - (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66,
 - (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74.
- En un aspecto, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50. En un aspecto particular, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen

específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34. En otro aspecto particular, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42. Aún en otro aspecto particular, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR, que comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:101, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:106. En un aspecto particular, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:100 (CBE11).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR, que comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO:343, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 344, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:345, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:346, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:347, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:348. En un aspecto particular, el segundo y el tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que

10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:349 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:350 (BHA10).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen

15 específicamente a LTBR humano y es capaz de unirse también específicamente a LTBR murino, que comprenden cada uno

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que

20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de

25 aminoácidos de SEQ ID NO:31, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44, y una CDR-H3 que

30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la

5 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80, o

una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que

10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 o SEQ ID NO:92, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la

15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.

En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR humano y es capaz de unirse también específicamente a LTBR murino, que comprenden cada

20 uno

- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- 30 (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)

35 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

En un aspecto particular, el anticuerpo LTBR agonista biespecífico comprende un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente a LTBR humano y también se unen específicamente a LTBR murino, que comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la
 5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.

Anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR que se unen a FAP y LTBR

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende

- 10 (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP, que comprende
 una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, o
 15 una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, o
 una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que
 20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18,
- (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), que comprende
 - (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
 25 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
 - (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
 - (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
 30 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
 - (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o

- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98,
 - (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42,
 - (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
 - (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, o
 - (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, y
 - (c) un dominio F_c compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de F_c y/o la función efectora.
- En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que
- (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP, que comprende
 - una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, o
 - una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, o
 - una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18,
 - (b) un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente al receptor de linfotoxina beta (LTBR), que comprenden cada uno

- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
 - (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
 - (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
 - (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
 - (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98,
 - (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42,
 - (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
 - (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, o
 - (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, y
 - (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.
- En un aspecto particular, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende (i) un primer dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente a FAP, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:10, y (ii) un segundo y tercer dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente a LTBR, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende (i) un primer dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente a FAP, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y (ii) un segundo y tercer dominio de unión a antígeno que puede unirse específicamente a LTBR, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y/o una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:100.

Anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR monovalentes (formato 1+1)

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP), un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotoxina beta (LTBR), y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora, en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende

- (i) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a FAP, y
- (ii) una segunda cadena ligera (modificada) y una segunda cadena pesada (modificada) de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a LTBR, en el que los dominios variables V_L y V_H se reemplazan entre sí, y/o en el que los dominios constantes CL y $CH1$ se reemplazan entre sí.

El primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP es un fragmento Fab y el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR es un fragmento Fab cruzado.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la

proteína de activación de fibroblastos (FAP), un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotoxina beta (LTBR), y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora, en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende

- (i) una primera cadena ligera (modificada) y una primera cadena pesada (modificada) de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a LTBR, en el que los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y/o en el que los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí, y
- (ii) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a LTBR.

El primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP es un fragmento Fab cruzado y el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR es un fragmento Fab.

En un aspecto particular, se proporcionan

- a) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:109, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:108, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:110, o
- b) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:111, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:113, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:112, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:114, o
- c) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:115, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:117, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:116, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:118, o

- d) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:119, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:121, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:120 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:122, o
- e) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:123, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:125, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:124, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:126, o
- f) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:127, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:128, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:130, o
- g) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:131, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:133, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:134, o
- h) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:135, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:137, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:136, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:138, o
- i) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:139, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:141, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:140, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:142, o

5 j) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:143, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:145, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:144, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:146, o

10 k) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:147, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:149, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:148, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:150, o

15 l) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:151, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:153, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:152, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:154, o

20 m) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:155, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:157, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:156, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:158, o

25 n) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:159, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:161, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:160, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:162, u

30 o) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:163, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

35

NO:165, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:164, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:166, o

- (q) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera
 5 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:215, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:217, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:216, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:218.
- 10 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:329, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:330, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:331, y una segunda cadena
 15 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:332.

Anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR bivalentes para la unión a LTBR y monovalentes para la unión a FAP (formato 2+1)

- En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la
 20 proteína de activación de fibroblastos (FAP), un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora, en el que la
 25 molécula de unión a antígeno biespecífica comprende

- (i) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a LTBR, y
 (ii) un fragmento Fab o un fragmento Fab cruzado que se une específicamente a FAP está conectado por medio de un conector peptídico a uno de los extremos C de
 30 las dos cadenas pesadas.

- En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica, que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP), un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), y un dominio Fc
 35 compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más

sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora, en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende

- (i) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a FAP, y
- (ii) una segunda cadena ligera (modificada) y una segunda cadena pesada (modificada) de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a LTBR, en el que un fragmento Fab o un fragmento Fab cruzado que se une específicamente a LTBR está conectado por medio de un conector peptídico al extremo C de la segunda cadena pesada.

Por tanto, se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica se une de modo bivalente a LTBR y de modo monovalente a FAP.

En un aspecto particular, se proporcionan:

- (a) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:167, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:169, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:168, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:170, o
- (b) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:171, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:173, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:172, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:174, o
- (c) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:175, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:177, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:176, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:178, o
- (d) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:179, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO:181, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:180, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:182, o

5 (e) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:183, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:185, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:184, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186, o

10 (f) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:187, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:189, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:188, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:190, o

15 (g) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:191, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:193, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:192, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:194, o

20 (h) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:195, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:197, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:196, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:198, o

25 (i) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:199, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:201, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:200, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:202, o

30 (j) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:203, y

una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:205, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:204, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:206, o

- 5 (k) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:207, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:209, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:208, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
10 de SEQ ID NO:210, o
- (l) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:211, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:213, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos
15 de SEQ ID NO:212 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:214.

Además, se proporcionan

- (m) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:326, y
20 una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:328, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:327, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:329, o
- (n) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera
25 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:333, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:334, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:335, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:336, u
- 30 (o) un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:337, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:338, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:339, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
35 de SEQ ID NO:340.

En un aspecto particular, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:195, y una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:197, dos cadenas ligeras que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:196, una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:198.

Anticuerpos agonistas sustitutos murinos anti-LTBR

En el presente documento se proporcionan también moléculas sustitutas murinas. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende

(a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP, que comprende

una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18,

(b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.

En un aspecto particular, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:219, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:221, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:220 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:222 (formato 1+1).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende

(a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP, que comprende

una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18,

(b) un segundo y un tercer dominio de unión a antígeno que se unen específicamente al receptor de linfotoxina beta (LTBR), que comprenden cada uno una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:223, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:225, dos cadenas ligeras, que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:224, una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:226.

En un aspecto particular, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:318, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:320, dos cadenas ligeras, que comprenden cada una la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:319, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:321.

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

Los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR descritos en el presente documento comprenden además un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora. Por tanto, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento y, de esta manera, generar una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

El dominio Fc les confiere propiedades farmacocinéticas favorables a los anticuerpos biespecíficos de la invención, que incluyen una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una proporción favorable de distribución tejido-sangre. Al mismo tiempo, puede, sin embargo, conducir a un direccionamiento no conveniente de los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR a células que expresan receptores de Fc en lugar de a las células portadoras de antígeno preferidas. En consecuencia, en aspectos particulares, el dominio Fc de los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR presenta una afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG natural, en particular un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. Más en particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1.

En uno de dichos aspectos, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que comprende dicho dominio Fc) presenta menos de 50 %, preferentemente menos de 20 %, con mayor preferencia menos de 10 % y con la máxima preferencia menos de 5 % de la afinidad de unión a un receptor de FC, en comparación con un dominio Fc de IgG1 natural (o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que comprende un dominio Fc de IgG1 natural) y/o menos de 50 %, preferentemente menos de 20 %, con mayor preferencia menos de 10 % y con la máxima preferencia menos de 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG1 natural (o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que comprende un dominio Fc de IgG1 natural). En un aspecto, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce una función efectora. En un aspecto particular, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En un aspecto, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En un aspecto, el receptor de Fc es un receptor de Fc de activación. En un aspecto específico, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ humano de activación, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, con la máxima especificidad FcγRIIIa humano. En un aspecto, el receptor de Fc es un receptor de Fc de inhibición. En un aspecto específico, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ humano de inhibición, más específicamente FcγRIIB humano. En un aspecto, la función efectora es una o más de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En un aspecto particular, la función efectora es ADCC. En un aspecto, el dominio Fc presenta una afinidad de unión sustancialmente similar con el receptor de Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio Fc de IgG1 natural. Una unión sustancialmente similar con FcRn se logra cuando el dominio Fc (o

la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente 70 %, en particular más de aproximadamente 80 %, más en particular aproximadamente 90 % de la afinidad de unión de un dominio Fc de IgG1 natural (o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que comprende un dominio Fc de IgG1 natural) con FcRn.

En un aspecto particular, el dominio Fc se genomanipula para tener una afinidad de unión reducida con un receptor de Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. En un aspecto particular, el dominio Fc del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del dominio Fc con un receptor de Fc y/o la función efectora. Típicamente, la misma una o más mutaciones aminoacídicas están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En un aspecto, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc con un receptor de Fc. En otro aspecto, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc con un receptor de Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende un dominio Fc genomanipulado presenta menos de 20 %, en particular menos de 10 %, más en particular menos de 5 % de la afinidad de unión con un receptor de Fc en comparación con los anticuerpos biespecíficos de la invención que comprenden un dominio Fc no genomanipulado. En un aspecto particular, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En otros aspectos, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En un aspecto, el receptor de Fc es un receptor de Fc de inhibición. En un aspecto específico, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano de inhibición, más específicamente Fc γ RIIB humano. En algunos aspectos, el receptor de Fc es un receptor de Fc de activación. En un aspecto específico, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano de activación, más específicamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa humano, con la máxima especificidad Fc γ RIIIa humano. Preferentemente, la unión a cada uno de estos receptores está reducida. En algunos aspectos, la afinidad de unión con un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión con C1q, también está reducida. En un aspecto, la afinidad de unión con el receptor de Fc neonatal (FcRn) no está reducida. Una unión a FcRn sustancialmente similar, es decir, conservación de la afinidad de unión del dominio Fc con dicho receptor, se logra cuando el dominio Fc (o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente 70 % de la afinidad de unión de una forma no genomanipulada del dominio Fc (o el anticuerpo agonista biespecífico

anti-LTBR que comprende dicha forma no genomanipulada del dominio Fc) con FcRn. El dominio Fc, o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende dicho dominio Fc, puede presentar más de aproximadamente 80 % e incluso más de aproximadamente 90 % de dicha afinidad. En determinados aspectos, el dominio Fc

5 del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR se genomanipula para tener una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular

10 dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, absorción de antígenos mediada por el complejo inmunitario por parte de células presentadoras de antígenos reducida, unión reducida a células NK, unión reducida a macrófagos, unión reducida a monocitos, unión reducida a células polimorfonucleares, señalización directa que induce la apoptosis reducida, maduración de células

15 dendríticas reducida o sensibilización de linfocitos T reducida.

Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6,737,056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270,

20 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7,332,581). Se describen determinadas variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida. (por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 6,737,056; documento WO 2004/056312, y Shields, R.L. y col, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

25 En un aspecto, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición de E233, L234, L235, N297, P331 y P329. En algunos aspectos, el dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A y L235A ("LALA"). En uno de dichos aspectos, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1, en particular un dominio Fc de IgG1 humana. En un aspecto, el dominio Fc comprende una sustitución

30 aminoacídica en la posición P329. En un aspecto más específico, la sustitución aminoacídica es P329A o P329G, en particular P329G. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329 y una sustitución aminoacídica adicional seleccionada del grupo que consiste en E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En aspectos más particulares, el

35 dominio Fc comprende las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G

LALA”). La combinación “P329G LALA” de las sustituciones aminoacídicas suprime casi completamente la unión al receptor de Fcγ de un dominio Fc de IgG1 humana, como se describe en la solicitud de patente PCT núm. WO 2012/130831 A1. Dicho documento describe además los procedimientos para preparar dichos dominios Fc mutantes y los procedimientos para determinar sus propiedades, tales como la unión al receptor de Fc o las funciones efectoras. Dicho anticuerpo es una IgG1 con las mutaciones L234A y L235A o con las mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat y col, Kabat y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD, 1991).

En un aspecto, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 humana. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende una sustitución aminoacídica en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular la sustitución aminoacídica S228P. En un modo de realización más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende las sustituciones aminoacídicas L235E y S228P y P329G. Esta sustitución aminoacídica reduce el intercambio de brazo Fab *in vivo* de anticuerpos IgG4 (ver Stubenrauch y col, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)).

Los anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L. y col, J. Immunol. 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K. y col, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), se describen en el documento núm. US 2005/0014934. Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7,371,826). Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; los documentos núms. US 5,648,260; US 5,624,821; y WO 94/29351 referidos a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

La unión a los receptores Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA, o mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando la instrumentación estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. En el presente documento se describe un ensayo de unión adecuado.

De forma alternativa, puede evaluarse la afinidad de unión de los dominios Fc o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un dominio Fc por receptores de Fc usando líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como los linfocitos NK humanos que expresan el receptor de FCyIIIa. Se puede medir la función efectora de un dominio Fc, o de anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR que comprenden un dominio Fc, mediante procedimientos conocidos en la técnica. En el presente documento se describe un ensayo adecuado para medir la ADCC. Se describen otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente de EE. UU. n.º 5,500,362; Hellstrom y col, Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom y col, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); la patente de EE. UU. n.º 5,821,337; Bruggemann y col, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, pueden emplearse procedimientos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes y col, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En la siguiente sección se describen aspectos preferidos del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR descrito en el presente documento que comprende modificaciones del dominio Fc que reducen la unión al receptor de Fc y/o la función efectora. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP), (b) un segundo (y opcionalmente un tercer) dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR) y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, en el que el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del anticuerpo a un receptor de Fc, en particular hacia el receptor Fcγ. En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP), (b) un segundo (y opcionalmente un tercer) dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR) y (c) un dominio Fc compuesto

por una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de forma estable, en el que el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la función efectora. En un aspecto particular, el dominio Fc es de las subclases de IgG1 humana con las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones del dominio Fc que promueven la heterodimerización

Los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR descritos en el presente documento comprenden diferentes sitios de unión al antígeno, fusionados a una u otra de las dos subunidades del dominio Fc, por tanto las dos subunidades del dominio Fc pueden estar comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización da lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR en la producción recombinante, será por tanto ventajoso introducir en el dominio Fc de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno de la invención una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, en aspectos particulares, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP), (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR) y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que comprenden una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora, en el que el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más amplia entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana está en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, en un aspecto, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un aspecto específico, dicha modificación es una modificación denominada “botón en ojal”, que comprende una modificación de “botón” en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de “ojal” en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. Por tanto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) al menos un dominio de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a LTBR, (b) al menos un dominio de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno de la célula diana, y (c) un dominio Fc

compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de forma estable, en el que la primera subunidad del dominio Fc comprende botones y la segunda subunidad del dominio Fc comprende ojales de acuerdo con el procedimiento de botones en ojales. En un aspecto particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W (numeración EU) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en el documento US 5,731,168; documento US 7,695,936; Ridgway y col, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar con respecto a las protuberancias se crean en la interfase del segundo polipéptido reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en un aspecto, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno de la invención un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de la cadena lateral más grande, lo que genera de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que puede situarse en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de la cadena lateral más pequeño, lo que genera de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la cual puede situarse la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad. La protuberancia y la cavidad se pueden elaborar al alterar el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis específica del sitio o síntesis de péptidos. En un aspecto específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda

subunidad del dominio Fc el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un residuo de valina (Y407V). En un aspecto, en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza con un residuo de alanina (L368A).

Aún en otro aspecto, en la primera subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc, de manera adicional, el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza con un residuo de valina (Y349C). La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, lo cual estabiliza aún más el dímero (Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15). En un aspecto particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas S354C y T366W (numeración EU) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas Y349C, T366S e Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media los efectos de direccionamiento electrostático, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades del dominio Fc con residuos de aminoácidos con carga de modo que la formación de homodímeros se vuelva electrostáticamente desfavorable, pero que la heterodimerización se vuelva electrostáticamente favorable.

El extremo C de la cadena pesada del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se informa en el presente documento puede ser un extremo C completo que termina con los residuos de aminoácidos PGK. El extremo C de la cadena pesada puede ser un extremo C acortado en el que se eliminaron uno o dos de los residuos de aminoácidos del extremo C. En un aspecto particular, el extremo C de la cadena pesada es un extremo C acortado que termina en PG. En un aspecto particular, el extremo C de la cadena pesada es un extremo C acortado que termina en P. En un aspecto de todos los aspectos según se informa en el presente documento, un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 C-terminal según se especifica en el presente documento, comprende el dipéptido de glicina-lisina C-terminal (G446 y K447, numeración de acuerdo con el

índice EU de Kabat). En un aspecto de todos los aspectos según se informa en el presente documento, un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 C terminal, como se especifica en el presente documento, comprende un residuo de glicina C terminal (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones en los dominios Fab

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer fragmento Fab capaz de unirse específicamente a FAP, (b) un segundo fragmento Fab capaz de unirse específicamente a LTBR, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad, en el que en uno de los fragmentos Fab se intercambian los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL. Los anticuerpos biespecíficos se preparan de acuerdo con la tecnología Crossmab.

Los anticuerpos multiespecíficos con un reemplazo/cambio de dominio en un brazo de unión (CrossMabVH-VL o CrossMabCH-CL) se describen en detalle en el documento WO2009/080252 y Schaefer, W. y col, PNAS, 108 (2011) 11187-1191. Reducen claramente los subproductos provocados por el emparejamiento erróneo de una cadena ligera contra el primer antígeno con la cadena pesada incorrecta contra el segundo antígeno (en comparación con los enfoques sin dicho intercambio de dominio).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer fragmento Fab capaz de unirse específicamente a FAP, (b) un segundo fragmento Fab capaz de unirse específicamente a LTBR, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de forma estable, en el que en uno de los fragmentos Fab los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí de modo que el dominio VH forma parte de la cadena ligera y el dominio VL forma parte de la cadena pesada. Más en particular, en el segundo fragmento Fab capaz de unirse específicamente a LTBR, los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí de modo que el dominio VH forma parte de la cadena ligera y el dominio VL forma parte de la cadena pesada.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer fragmento Fab capaz de unirse específicamente a FAP, en el que los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí de manera que el dominio CH1 forma parte de la cadena ligera y el dominio CL forma parte de la cadena

pesada, y (b) un segundo fragmento Fab capaz de unirse específicamente a LTBR. Dicha molécula proporciona una unión monovalente tanto a LTBR como a FAP.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer fragmento Fab que se une específicamente a la proteína de
 5 activación de fibroblastos (FAP), (b) un segundo y un tercer fragmento Fab que se unen específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR) y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor Fc y/o la función efectora, en el que en el segundo y tercer
 10 fragmento Fab que se unen específicamente a LTBR, los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí de modo que el dominio VH forma parte de la cadena ligera y el dominio VL forma parte de la cadena pesada.

En otro aspecto, y para mejorar aún más el emparejamiento correcto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR que comprende (a) un primer fragmento Fab capaz de
 15 unirse específicamente a LTBR, (b) un segundo fragmento Fab capaz de unirse específicamente a FAP, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de forma estable, puede contener diferentes sustituciones aminoacídicas cargadas (los llamados "residuos cargados"). Estas modificaciones se introducen en los dominios CH1 y CL cruzados y no cruzados. En
 20 un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno biespecífica, en la que en uno de los dominios CL el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y/o en la que el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K) y en la que en uno de los dominios CH1 los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y/o en la posición
 25 213 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E).

Polinucleótidos

Se proporcionan además polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento o un fragmento del mismo.

30 Los polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR pueden expresarse como un único polinucleótido que codifica toda la molécula de unión al antígeno o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se expresan conjuntamente. Los polipéptidos codificados por los polinucleótidos que se expresan conjuntamente pueden asociarse
 35 a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula

de unión a antígeno funcional. Por ejemplo, la porción de la cadena ligera de una inmunoglobulina puede estar codificada por un polinucleótido separado de la porción de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Cuando se expresan conjuntamente, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena ligera para formar la inmunoglobulina.

En algunos aspectos, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en el anticuerpo agonista anti-LTBR o en el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, que comprende (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP), (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotoxina beta (LTBR) y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoácidas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor Fc y/o la función efectora.

En determinados aspectos, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros modos de realización, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN como se describe en el presente documento puede ser monocatenario o bicatenario.

Procedimientos recombinantes

Los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR descritos en el presente documento pueden obtenerse, por ejemplo, mediante producción recombinante. Para la producción recombinante se proporcionan uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo. El uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR se aíslan y se insertan en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales. En un aspecto, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Se puede usar métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan la secuencia de codificación del anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR (fragmento) junto con las

señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis y col, MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel y col, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido o virus o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo (es decir, la región codificante) en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o la traducción. Como se usa en el presente documento, "una región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de parada" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, si está presente, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión al ribosoma, finalizadores transcripcionales, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una sola construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector o en construcciones de polinucleótidos separados, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan de manera posterior a la traducción o en conjunto con esta en las proteínas finales por medio de escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico como se describe en el presente documento puede codificar regiones codificantes heterólogas, ya sean fusionadas o no fusionadas a un polinucleótido que codifica el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo o variantes o derivados del mismo. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señal secretora o un dominio funcional heterólogo. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras a fin de colocar la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la(s) secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de

polipéptido y un promotor asociado con esta) están "asociados operativamente" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interfiere con la capacidad de transcripción del molde de ADN. Por tanto, una región promotora estaría asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fue capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de células que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de finalización de la transcripción, pueden asociarse operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de células.

En el presente documento se divulgan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitarse a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, junto con intrón-A), el virus del simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y los retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrado, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovino y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Otras regiones de control de la transcripción adecuadas incluyen potenciadores y promotores específicos de tejidos, así como promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclinas inducibles por promotores). De forma similar, los expertos en la técnica conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión al ribosoma, codones de inicio y finalización de la traducción, y elementos derivados de sistemas virales (en particular un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión puede incluir también otros rasgos característicos tales como un origen de replicación, y/o elementos de integración de cromosomas tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovirales, o repeticiones terminales invertidas (ITR) virales adenoasociadas (AAV).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos descritas en el presente documento pueden estar asociadas con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido descrito en el presente documento. Por ejemplo, si se desea la secreción del anticuerpo agonista anti-LTBR o del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo, el ADN que codifica una secuencia señal puede colocarse corriente arriba del ácido nucleico que codifica el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo. De acuerdo con la hipótesis de señales, las proteínas secretadas por las células de mamífero tienen un péptido señal o una secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez iniciada la exportación de la cadena proteica en crecimiento a lo largo del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la técnica son conscientes de que los polipéptidos secretados por las células de vertebrado tienen en general un péptido señal fusionado con el extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinados modos de realización, se usa el péptido de señal natural, por ejemplo, un péptido de señal de la cadena pesada o la cadena ligera de inmunoglobulina o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está asociado operativamente con aquel. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder natural puede sustituirse con la secuencia líder de activador de plasminógeno tisular (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón.

El ADN que codifica una secuencia proteica corta que podría utilizarse para facilitar la purificación posterior (por ejemplo, una etiqueta de histidina) o ayudar a etiquetar la proteína de fusión puede incluirse dentro o en los extremos del polinucleótido que codifica el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo.

En otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos descritos en el presente documento. En determinados aspectos, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores descritos en el presente documento. Los polinucleótidos y los vectores pueden incorporar cualquiera de los rasgos característicos, por separado o en combinación, descritos en el presente documento en relación con los polinucleótidos y los vectores, respectivamente. En un aspecto, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o

transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) un anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se divulga en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que puede

5 genomanipularse para generar las proteínas de fusión de la invención o fragmentos de las mismas. Se conocen en la técnica las células huésped adecuadas para replicar y apoyar la expresión de las moléculas de unión a antígeno. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según sea adecuado con el vector de expresión particular y pueden cultivarse grandes cantidades de células que contienen el vector para la

10 siembra de fermentadores a gran escala a fin de obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse en bacterias, en

15 particular cuando no se necesita glicosilación. Después de la expresión, el polipéptido se puede aislar de la pasta de célula bacteriana en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, que incluyen cepas de hongos y

20 levadura cuyas vías de glicosilación se "humanizaron", lo que dio como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Véase, Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004), y Li y col, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glicosilados)

25 también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que se pueden usar en conjunto con células de insectos, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células vegetales también se pueden utilizar como

30 huéspedes. Véase, por ejemplo, las patente de EE. UU. n.º 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 y 6,417,429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de

35 líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono

transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describen, por ejemplo, en Graham y col, J Gen Virol 36, 59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK); células de sertoli de ratón (linfocitos TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980));

5 células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor de mama de ratón (MMT 060562); linfocitos TRI (como se describen, por ejemplo, en Mather y col, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas

10 de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO dhfr- (Urlaub y col, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero que son adecuadas

15 para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas

20 dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En un modo de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). Se conocen en la técnica tecnologías estándar para expresar genes

25 exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende ya sea la cadena pesada o la cadena ligera de una inmunoglobulina pueden genomanipularse para también expresar la otra de las cadenas de la inmunoglobulina, de modo que el producto expresado sea una inmunoglobulina que tenga tanto una cadena pesada como una cadena ligera.

30 En un aspecto, se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende polinucleótidos que codifican el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo,

35 como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la

expresión del anticuerpo agonista anti-LTBR o del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo, y recuperar el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos polipeptídicos del mismo de la célula huésped (o del medio de cultivo de la célula huésped).

- 5 Los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR preparados como se describe en el presente documento pueden purificarse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como la cromatografía de líquidos de alto rendimiento, la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis en gel, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de exclusión por tamaño, y similares. Las
- 10 condiciones reales utilizadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, la hidrofobia, la hidrofilia, etc., y resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación por cromatografía de afinidad se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR. Por
- 15 ejemplo, para la purificación mediante cromatografía de afinidad de los anticuerpos, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Pueden usarse la cromatografía de afinidad con proteína A o G y la cromatografía de exclusión por tamaño
- 20 secuenciales para aislar una molécula de unión a antígeno esencialmente como se describe en los ejemplos. La pureza del anticuerpo agonista anti-LTBR o del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o fragmentos del mismo puede determinarse mediante cualquiera de una variedad de procedimientos analíticos bien conocidos, incluyendo la electroforesis en gel, la cromatografía de líquidos de alta presión y similares. Por ejemplo, los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos
- 25 agonistas biespecíficos anti-LTBR expresados como se describe en los Ejemplos mostraron estar intactos y apropiadamente ensamblados como se demostró mediante SDS-PAGE reductor y no reductor.

Ensayos

- Los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos agonistas anti-LTBR biespecíficos proporcionados en el presente documento pueden caracterizarse por sus
- 30 propiedades de unión y/o actividad biológica mediante diversos ensayos conocidos en la técnica. En particular, se caracterizan por los ensayos descritos con más detalle en los ejemplos.

i. Ensayo de unión

- La unión de los anticuerpos agonistas anti-LTBR o de los anticuerpos agonistas
- 35 biespecíficos anti-LTBR proporcionados en el presente documento a las

correspondientes células que expresan la diana puede evaluarse, por ejemplo, usando una línea celular de fibroblastos murinos que expresan la proteína de activación de fibroblastos (FAP) humana y un análisis de citometría de flujo (FACS). La unión de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento a LTBR puede determinarse usando células CHO-K1 genomanipuladas para sobreexpresar LTBR humano, de cynomolgus o murino como se describe en el Ejemplo 5.1.

ii. Ensayos de actividad

Los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR como se describen en el presente documento se someten a prueba para determinar su actividad biológica. La actividad biológica puede incluir la eficacia y la especificidad de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas. La eficacia y la especificidad se demuestran mediante ensayos que miden su capacidad para regular por incremento ICAM en células endoteliales humanas y fibroblastos asociados al cáncer (CAF) *in vitro* (Ejemplo 4). La activación de los LTBR puede medirse además por la regulación por incremento de genes inflamatorios y de desarrollo tales como las moléculas de adhesión (ICAM y VCAM) y los quimioatrayentes (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) por parte de las células estromales (Ejemplo 5.2).

Composiciones farmacéuticas, formulaciones y vías de administración

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-LTBR o anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos indicados a continuación. En un aspecto, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-LTBR o anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR proporcionados en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-LTBR o anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Las composiciones farmacéuticas como se divulgan en el presente documento comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos agonistas anti-LTBR o anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR disueltos o dispersados en un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y

composiciones moleculares que son en general no tóxicas para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica o inadecuada en algún otro sentido cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según corresponda. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un anticuerpo agonista anti-LTBR o un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado en el presente documento como referencia. En particular, las composiciones son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, sales, estabilizadores y combinaciones de los mismos, como conocerá un experto en la técnica.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para su administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para la inyección, los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos agonistas anti-LTBR biespecíficos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con diversos de los otros ingredientes enumerados a continuación, según sea necesario. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de suspensiones, emulsiones o soluciones inyectables estériles, los

procedimientos preferentes de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido filtrado anteriormente de manera estéril del mismo. El medio líquido debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el

5 diluyente líquido debe primero volverse isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. La composición debe ser estable en las condiciones de elaboración y almacenamiento, y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se observará que la contaminación de endotoxinas debe mantenerse como mínimo a un nivel seguro, por ejemplo, menos

10 de 0,5 ng/mg de proteína. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; parabenos de alquilo, tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol;

15 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos,

20 disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensoactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener

25 compuestos que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones

30 de los compuestos activos como suspensiones para inyección oleosas adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Los ingredientes activos pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por

35 ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por

ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli-
 (metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración del
 fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones,
 nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan
 5 en Remington's Pharmaceutical Sciences (18va Ed. Mack Printing Company, 1990).
 Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados
 de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de
 polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, cuyas matrices están en
 forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En modos de
 10 realización particulares, se puede lograr la absorción prolongada de una composición
 inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la
 absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina y
 combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas anteriormente, las moléculas de unión a
 15 antígeno también pueden formularse como una preparación de liberación lenta. Dichas
 formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por
 ejemplo, de manera subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular.
 Así, por ejemplo, las proteínas de fusión pueden formularse con materiales poliméricos
 o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o
 20 resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una
 sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos agonistas anti-
 LTBR o los anticuerpos agonistas anti-LTBR biespecíficos divulgados en el presente
 documento pueden fabricarse por procesos convencionales de mezclado, disolución,
 25 emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones
 farmacéuticas pueden formularse de manera convencional usando uno o más
 portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares aceptables fisiológicamente aceptables
 que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se pueden usar
 farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración
 30 elegida.

Los anticuerpos agonistas anti-LTBR o los anticuerpos agonistas biespecíficos LTBR
 pueden formularse en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o sal.
 Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que retienen sustancialmente la
 actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de
 35 ácidos, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición

proteínica o las que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. También se pueden derivar sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

Las composiciones en el presente documento también pueden contener más de un ingrediente activo, según sea necesario, para la indicación particular que se trata, preferentemente, aquellas que tienen actividades complementarias que no se perjudican de manera adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

En general, las formulaciones para su uso en la administración *in vivo* son estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Procedimientos y composiciones terapéuticas

Cualquiera de los anticuerpos agonistas anti-LTBR o anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR proporcionados en el presente documento, en particular los anticuerpos agonistas anti-LTBR biespecíficos, se pueden usar en procedimientos terapéuticos. Para su uso en procedimientos terapéuticos, los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR pueden formularse, dosificarse y administrarse de forma consecuente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular en tratamiento, el mamífero particular en tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de administración y otros factores conocidos por los profesionales de la salud.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos agonistas anti-LTBR o anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR para su uso como medicamento.

En otros aspectos, se proporcionan anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR como se describen en el presente documento para su uso en la inducción de la estimulación inmunitaria mediante la activación de los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) o las células endoteliales. Además, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas como se describen en el presente documento para (i) el tratamiento del cáncer, (ii) el retraso de la progresión del cáncer y (iii) la prolongación

de la supervivencia de un paciente que padece cáncer, en particular en presencia de células que expresan PAF. En un aspecto particular, se proporcionan anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR para su uso en el tratamiento de una enfermedad, en particular para su uso en el tratamiento del cáncer.

- 5 En determinados aspectos, se proporcionan anticuerpos agonistas anti-LTBR o anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR como se describen en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo
- 10 que lo necesita. En determinados aspectos, se proporciona un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR. En determinados aspectos, la enfermedad a tratar es el cáncer. El sujeto, paciente o
- 15 “individuo” que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

- En un aspecto, se proporciona un procedimiento para i) inducir la estimulación inmunitaria por parte de las células presentadoras de antígenos (APC) CD40+, (ii) estimular la respuesta de los linfocitos T específicos del tumor, (iii) provocar la
- 20 apoptosis de las células tumorales, (iv) tratar el cáncer, (v) retrasar la progresión del cáncer, (vi) prolongar la supervivencia de un paciente que padece cáncer, o (vii) tratar las infecciones, en el que el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR divulgado en el presente documento a un individuo que lo necesita.

- 25 En otro aspecto, se proporciona el uso del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR descrito en el presente documento en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesita. En un aspecto, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad una
- 30 cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinados aspectos, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo, en particular cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de
- 35 esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer gástrico, cáncer

de próstata, cáncer hematológico, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de hueso y cáncer de riñón. Otros ejemplos de cáncer incluyen carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Otros trastornos de proliferación celular que pueden tratarse mediante el uso

5 de la molécula de unión a antígeno biespecífica o el anticuerpo de la invención incluyen, pero no se limitan a, neoplasias ubicadas en: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenales, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, región

10 torácica y sistema genitourinario. También se incluyen lesiones o afecciones precancerosas y metástasis de cáncer. En determinados modos de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello. Un experto en la técnica reconoce fácilmente que en muchos casos el

15 anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR puede no proporcionar una cura pero puede proporcionar un beneficio. En algunos aspectos, un cambio fisiológico que tenga algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por tanto, en algunos aspectos, una cantidad del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR o del anticuerpo agonista anti-LTBR que proporciona un cambio fisiológico se considera

20 una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz".

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada de un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR descrito en el presente documento (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la vía de administración, el

25 peso corporal del paciente, la molécula específica, la gravedad y el curso de la enfermedad, si la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, las intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, la anamnesis del paciente y la respuesta a la molécula de unión a antígeno biespecífica, y el criterio del médico especialista. El profesional

30 responsable de la administración determinará, en cualquier acontecimiento, la concentración del(de los) ingrediente(s) activo(s) en una composición y dosis adecuada(s) para el sujeto individual. En el presente documento se contemplan diversas pautas de administración de las dosis, que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones simples o múltiples durante diversos puntos temporales,

35 administración por bolo e infusión de pulso.

El anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR se administra adecuadamente al paciente de una sola vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg – 10 mg/kg) de la molécula de unión a antígeno biespecífica puede ser una

5 dosis candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En el caso de administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la

10 afección, el tratamiento se sostendría por lo general hasta que se produzca una inhibición deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ilustrativa de la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención estaría en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal,

15 aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso

20 corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo comprendido en estos. En

25 los ejemplos de un intervalo derivable de las cantidades enumeradas en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal a aproximadamente de 1 mg/kg de peso corporal, etc., basado en las cantidades descritas anteriormente. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una

30 o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de manera intermitente, por ejemplo, una vez a la semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). En un aspecto particular, el

35 anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR se administrará cada tres semanas. En un

aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR se administrará cada dos semanas. Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se monitorea fácilmente con técnicas y ensayos convencionales.

El anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR se utilizará en general en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. Para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR, o las composiciones farmacéuticas del mismo, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Los expertos en la técnica tienen la capacidad para determinar una cantidad terapéuticamente eficaz, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento. Para la administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, tales como los ensayos de cultivo celular. Se puede formular a continuación una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación que incluya la CI_{50} determinada en el cultivo celular. Se puede usar dicha información para determinar con exactitud dosis útiles en seres humanos. Las dosificaciones iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas conocidas en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basado en los datos en animales.

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones para pacientes habituales para su administración mediante inyección varían de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,1 a 1 mg/kg/día. Se pueden lograr niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces al administrar múltiples dosis cada día. Los niveles plasmáticos pueden medirse, por ejemplo, mediante HPLC. En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Un experto en la técnica será capaz de optimizar dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación excesiva.

Una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR descrito en el presente documento proporcionará generalmente un beneficio

terapéutico sin provocar una toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una proteína de fusión pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales experimentales. Se pueden usar ensayos de cultivo celular y estudios en animales para determinar la DL_{50} (la dosis letal para 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de una población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la proporción DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR que presentan grandes índices terapéuticos. En un aspecto, el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR presenta un alto índice terapéutico. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificaciones adecuado para su uso en seres humanos. La dosis se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma farmacéutica empleada, la vía de administración utilizada, la condición del sujeto y similares. El médico del individuo puede seleccionar la formulación exacta, la vía de administración y la dosificación en vista de la condición del paciente (véase, por ejemplo, Fingl y col, 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Cap. 1, p. 1, incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad).

El médico especialista que atiende a los pacientes tratados con anticuerpos agonistas anti-LTBR sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad, la disfunción de los órganos y similares. Por el contrario, el médico especialista también sabría ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuese adecuada (mientras no haya toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el manejo del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección a tratar, con la vía de administración y similares. Por ejemplo, la gravedad de la afección puede evaluarse parcialmente mediante procedimientos estándar de evaluación pronóstica. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis variarán también de acuerdo con la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

El anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR se puede administrar en combinación con uno o más otros agentes en el tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo agonista anti-LTBR o el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR pueden administrarse

- conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. El término "agente terapéutico" engloba cualquier agente que se pueda administrar para tratar un síntoma o una enfermedad en un individuo que necesite dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquiera de los ingredientes activos
- 5 adecuados para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. En determinados aspectos, un agente terapéutico adicional es otro agente antineoplásico, por ejemplo, un disruptor de microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa, un agente intercalante de ADN, un agente alquilante, un tratamiento
- 10 hormonal, un inhibidor de cinasas, un antagonista de receptor, un activador de la apoptosis de células tumorales o un agente antiangiogénico. En determinados aspectos, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico o citostático, un activador de la apoptosis celular o un agente que incrementa la sensibilidad de las
- 15 células a inductores de la apoptosis.
- Por tanto, se proporcionan anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR o composiciones farmacéuticas que los comprenden para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica se administra en combinación con un agente quimioterápico, radiación y/u otros agentes para su uso en
- 20 la inmunoterapia del cáncer.
- Dichos otros agentes están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR usado, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Los anticuerpos
- 25 agonistas biespecíficos anti-LTBR se usan en general en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describen en el presente documento, o aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.
- 30 Dichas politerapias indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma composición o en composiciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica o anticuerpo de la invención se puede producir antes, al mismo tiempo y/o después de la administración
- 35 del agente y/o adyuvante terapéutico adicional.

En otro aspecto, se proporciona el anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR descrito en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica se administra en combinación con otro inmunomodulador.

- 5 El término “inmunomodulador” se refiere a cualquier sustancia que incluye un anticuerpo monoclonal que afecta al sistema inmunitario. Las moléculas divulgadas en el presente documento pueden considerarse inmunomoduladores. Los inmunomoduladores pueden usarse como agentes antineoplásicos para el tratamiento del cáncer. En un aspecto, los inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a
- 10 anticuerpos anti-CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab), anticuerpos anti-PD1 (por ejemplo, nivolumab o pembrolizumab), anticuerpos anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab, avelumab o durvalumab), anticuerpos anti-OX-40, anticuerpos anti-4-1BB y anticuerpos anti-GITR. En otro aspecto, se proporciona la molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica se administra en combinación con un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1. En un aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD1. Más particularmente, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, en particular un
- 15 anticuerpo anti-PD-L1 seleccionado del grupo que consiste en atezolizumab, durvalumab, pembrolizumab y nivolumab. En un aspecto específico, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es atezolizumab (MPDL3280A, RG7446). En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PDL-1) de SEQ ID NO:313 y un dominio variable de la cadena ligera VL(PDL-1) de SEQ ID NO:314. En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PD-L1) de SEQ ID NO:315 y un dominio variable de la cadena ligera VL(PD-L1) de SEQ ID NO:316. En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo
- 20 anti-PD1, en particular un anticuerpo anti-PD1 seleccionado de pembrolizumab o nivolumab. Dichos otros agentes están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR usado, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente.
- 25 Los anticuerpos agonistas biespecíficos anti-LTBR descritos en el presente documento
- 30
- 35

se usan en general en las mismas dosificaciones y con las vías de administración descritas en el presente documento, o aproximadamente de 1 a 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.

- 5 Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma composición o en composiciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR puede producirse antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o
10 adyuvante adicional.

Artículos de fabricación

- En otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o
15 prospecto en el recipiente o asociado con este. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz, por sí misma o en combinación con otra composición, para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un
20 puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR divulgado en el presente documento.

- La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección
25 determinada. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo agonista biespecífico anti-LTBR; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en
30 este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular.

- De forma alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI),
35 solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa.

Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Tabla B (Secuencias):

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
1	LTBR hu	UniProt n.º P36941 MLLPWATSAP GLAWGPLVLG LFGLLAASQP QAVPPYASEN QTCRDQEKEY YEPQHRICCS RCPPGTYVSA KCSRIRDTV C ATCAENSYNE HWNYLTICQL CRPCDPVMGL EEIAPCTSKR KTQCRCQPGM FCAAWALECT HCELLSDCPP GTEAELKDEV GKGNNHCVPC KAGHFQNTSS PSARCQPHTR CENQGLVEAA PGTAQSDTTC KNPLEPLPPE MSGTMLMLAV LLPLAFFLLL ATVFSCIWKS HPSLCRKLGS LLKRRPQGEG PNPVAGSWEP PKAHPYFPDL VQPLLPISGD VSPVSTGLPA APVLEAGVPQ QQSPDLTRE PQLEPGEQSQ VAHGTNGIHV TGGSMITIGN IYIYNGPVLG GPPGPGDLPA TPEPPYPIPE EGDPGPPGLS TPHQEDGKAW HLAETEHCGA TPSNRGPRNQ FITHD
2	FAP hu	UniProt n.º Q12884, versión 168 MKTWVKIVFG VATSAVLALL VMCIVLRPSR VHNSEENTMR ALTLKDILNG TFSYKTFFPN WISGQEYLHQ SADNNIVLYN IETGQSYTIL SNRTMKSVNA SNYGLSPDRQ FVYLESYSK LWRYSYTATY YIYDLSNGEF VRGNELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRPQDPP FQITFNGREN KIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPNGKF LAYAEFNDTD IPVIAYSYYG DEQYPTINI PYPKAGAKNP VVRIFIIDTT YPAYVGPQEV PVPAMIASSD YYFSWLTWVT DERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWQTW DCPKTQEHIE ESRTGWAGGF FVSTPVFSYD AISYYKIFSD KDGYKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAINI FRVTQDSLFI SSNEFEEYPG RRNIYRISIG SYPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFSDYAK YYALVCYGPG IPISTLHDGR TDQEIKILEE NKELENALKN IQLPKKEEIKK LEVDEITLWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV YGGPCSQSVR SVFAVNWISY LASKEGMVIA LVDGRGTAFQ GDKLLYAVYR KLGVEVEDQ ITAVRKFIEM GFIDEKRIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGIAVAPV SSWEYYASVY TERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMARAEYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA QVDFQAMWYS DQNHGLSGLS TNHLYTHMTH FLKQCFSLSLSD
3	CDR-H1 FAP(4B9)	SYAMS
4	CDR-H2 FAP(4B9)	AIIGSGASTYYADSVKG
5	CDR-H3 FAP(4B9)	GWFGGFNY

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
6	CDR-L1 FAP(4B9)	RASQSVTSSYLA
7	CDR-L2 FAP(4B9)	VGSRRAT
8	CDR-L3 FAP(4B9)	QQGIMLPPT
9	VH FAP(4B9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSS
10	VL FAP(4B9)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA YQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
11	CDR-H1 FAP (28H1)	SHAMS
12	CDR-H2 FAP (28H1)	AIWASGEQYYADSVKG
13	CDR-H3 FAP (28H1)	GWLGNFYD
14	CDR-L1 FAP (28H1)	RASQSVSRSYLA
15	CDR-L2 FAP (28H1)	GASTRAT
16	CDR-L3 FAP (28H1)	QQGQVIPPT
17	VH FAP(28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSW VRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYDYGQ GTLVTVSS
18	VL FAP(28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLA YQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK
19	CDR-H1 FAP (1G1a)	DYNMD
20	CDR-H2 FAP (1G1a)	DIYPNTGGTIYNQKFKG
21	CDR-H3 FAP (1G1a)	FRGIHYAMDY
22	CDR-L1 FAP (1G1a)	RASESVDNYGLSFIN
23	CDR-L2 FAP (1G1a)	GTSNRGS
24	CDR-L3 FAP (1G1a)	QQSNEVPYT
25	VH FAP (1G1a)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYNMDW VRQAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTI DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDY WGQGTITVTVSS
26	VL FAP (1G1a)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGLSF INWFQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGSGSG TDFTLTISLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTKV EIK
27	CDR-H1 LTBR	SYTMN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	(9459)	
28	CDR-H2 LTBR (9459)	GVAPSGDRITYYTDVSKG
29	CDR-H3 LTBR (9459)	GFAFTN
30	CDR-L1 LTBR (9459)	RASQGISSALA
31	CDR-L2 LTBR (9459)	DASSLDS
32	CDR-L3 LTBR (9459)	QQYNNYPLT
33	VH LTBR (9459)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRITYYTDVSKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSS
34	VL LTBR (9459)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSPRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKEVEMK
35	CDR-H1 LTBR (9452)	SYPMY
36	CDR-H2 LTBR (9452)	LISPSGATTYYADSVKG
37	CDR-H3 LTBR (9452)	NHYPDDVVIKNNYFYGVDF
38	CDR-L1 LTBR (9452)	RASQDISNYLN
39	CDR-L2 LTBR (9452)	AASSLQS
40	CDR-L3 LTBR (9452)	QQTHTIPYS
41	VH LTBR (9452)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTW VRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVKGRFTISR DTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDDVVIK NNYFYGVDFVWGQGTITVTVSS
42	VL LTBR (9452)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFANYCQQTHTIPYSFGQGTNLEIK
43	CDR-H1 LTBR (0080)	YYAMT
44	CDR-H2 LTBR (0080)	VINSGGGTYITDVKG
45	CDR-H3 LTBR (0080)	ASTADV
46	CDR-L1 LTBR (0080)	QASQGISNYLS
47	CDR-L2 LTBR (0080)	AASSLES
48	CDR-L3 LTBR (0080)	QQYNSYSLT
49	VH LTBR (0080)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTW

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		VRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYTDSVKGRFTMSRD NSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSS
50	VL LTBR (0080)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGGTKLEIK
51	CDR-H1 LTBR (9450)	SYVMK
52	CDR-H2 LTBR (9450)	SISGSGGRPFYADSVKG
53	CDR-H3 LTBR (9450)	DMDV
54	CDR-L1 LTBR (9450)	RASQDISSFLK
55	CDR-L2 LTBR (9450)	AASALQS
56	CDR-L3 LTBR (9450)	QQYNTYPLT
57	VH LTBR (9450)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSYVMKW FRQAPGKGLEWVSSISGSGGRPFYADSVKGRFTISR DNSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCANDMDVWGQGT TVTVSS
58	VL LTBR (9450)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSFLKWY QQKPGKAPTLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTKVDIK
59	CDR-H1 LTBR (0079)	SYAMS
60	CDR-H2 LTBR (0079)	VITGSSSSIDYADSVKG
61	CDR-H3 LTBR (0079)	GGSGVWSISTDFDY
62	CDR-L1 LTBR (0079)	QASQDISNYLN
63	CDR-L2 LTBR (0079)	AASSLHS
64	CDR-L3 LTBR (0079)	QQSHSTPPT
65	VH LTBR (0079)	EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSVITGSSSSIDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGSGVWSIST DFDYWGQGTLVTVSS
66	VL LTBR (0079)	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWY QQKPGKAPKHLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGAYFT LTITSLQPEDFATYYCQQSHSTPPTFGPGTKVDIK
67	CDR-H1 LTBR (9457)	NYAMT
68	CDR-H2 LTBR (9457)	EISGSGGSTYYADSVKG
69	CDR-H3 LTBR (9457)	DDDGA YGTMDV

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
70	CDR-L1 LTBR (9457)	RASQDISNYLN
71	CDR-L2 LTBR (9457)	AASALQS
72	CDR-L3 LTBR (9457)	QHYKSYPT
73	VH LTBR (9457)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTW VRQAPGKGLEWVSEISGSGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDDGAYGDTM DVWGQGTTVTVSS
74	VL LTBR (9457)	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASALQSGVPSRFGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQHYKSYPTFGQGTKVEIR
75	CDR-H1 LTBR (0064)	NTYIH
76	CDR-H2 LTBR (0064)	RIDPTNGNTICTEKFN
77	CDR-H3 LTBR (0064)	TTLTTPDSFAY
78	CDR-L1 LTBR (0064)	KASQNIYKYLN
79	CDR-L2 LTBR (0064)	STNILQT
80	CDR-L3 LTBR (0064)	QKYYSGFT
81	VH LTBR (0064)	EVQLQQYGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNIGNTYIHW VIQRPGKGLEWIGRIDPTNGNTICTEKFNKATLTA DLSSNTAYMQLSQLKSDDTAIYFCAPTTLTTPDSFA YWGQGTTLTVSS
82	VL LTBR (0064)	DIQMTQSPSLSASVGDRTLCKASQNIYKYLWY QQKLGEAPRLIYSTNILQTGIPSRFGSGSGTDYT LTISSLQPEDAATYFCQKYYSGFTFGSGTKLEMK
83	CDR-H1 LTBR (5929)	SYAIS
84	CDR-H2 LTBR (5929)	GIIPIFGTANYAQKFQG
85	CDR-H3 LTBR (5929)	PSYYLDGWLDY
86	CDR-L1 LTBR (5929)	KSSQSVLYSSNNKNYLA
87	CDR-L2 LTBR (5929)	WASTRES
88	CDR-L3 LTBR (5929)	SQYYTTHYT
89	VH LTBR (5929)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIW VRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGTTLTVSS
90	VL LTBR (5929)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIK
91	CDR-H1 LTBR (7213)	SYAIS
92	CDR-H2 LTBR (7213)	GIIPIHGTANYAQKFQG
93	CDR-H3 LTBR (7213)	PSYYLDGWLDY
94	CDR-L1 LTBR (7213)	KSSQSVLYSSNNKNYLA
95	CDR-L2 LTBR (7213)	WASTRES
96	CDR-L3 LTBR (7213)	SQYYTTHYT
97	VH LTBR (7213)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPIHGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGTFTVTVSS
98	VL LTBR (7213)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIK
99	VH LTBR (CBE11)	EVQLVESGGGLVLPKPGSLRLSCAASGFTFSDYYMYW FRQAPGKGLEWVATISDGGSYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMSSLRAEDVAVYYCAREENGNFYYFD YWGQGTFTVTVSS
100	VL LTBR (CBE11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAGQDIKSYLSWY QQKPGKAPKLLIYYATRLADGVPSRFSGSGSGTDYT LTISLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGGGTKLEIK
101	CDR-H1 LTBR (CBE11)	DYYMY
102	CDR-H2 LTBR (CBE11)	TISDGGSYTYYPDSVKG
103	CDR-H3 LTBR (CBE11)	EENGNFYYFDY
104	CDR-L1 LTBR (CBE11)	KAGQDIKSYLS
105	CDR-L2 LTBR (CBE11)	YATRLAD
106	CDR-L3 LTBR (CBE11)	LQHGESPWT
107	P1AF0532 botón HC LTBR cruzado	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSP
108	P1AF0532 LC LTBR cruzado	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
109	P1AF0532 ojal HC FAP con cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKAALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
110	P1AF0532 LC FAP con cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
111	P1AF9728 botón HC LTBR	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPIHGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSP
112	P1AF9728 LC LTBR	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
113	P1AF9728 ojal HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	FAP cruzado	VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
114	P1AF9728 LC FAP cruzado	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
115	P1AG7504 botón HC LTBR	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPIHGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
116	P1AG7504 LC LTBR	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFN RGEC
117	P1AG7504 ojal HC FAP cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
118	P1AG7504 LC FAP cruzado	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
119	P1AF0535 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSFLKWY QQKPGKAPTLIIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTKVDIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPGPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
120	P1AF0535 LC LTBR cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMKW FRQAPGKGLEWVSSISGSGRPFYADSVKGRFTISR DNSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCANDMDVWGQGT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
121	P1AF0535 ojal HC FAP con cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKTHTCPGPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
122	P1AF0535 LC FAP con cargas	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
123	P1AG7506 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSFLKWY QQKPGKAPTLIIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTKVDIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
124	P1AG7506 LC LTBR cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMKW FRQAPGKGLEWVSSISGSGRPFYADSVKGRFTISR DNSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCANDMDVWGQGT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
125	P1AG7506 ojal HC FAP cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP VLDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
126	P1AG7506 LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
127	P1AF0534 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFANYCQQTHTIPYSFGQGTNLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
128	P1AF0534 LC LTBR cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTW VRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVKGRFTISR DTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDDVIK NYYFYGVVDVWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNREGC
129	P1AF0534 ojal HC FAP con cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
130	P1AF0534 LC FAP con cargas	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
131	P1AG7505 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFANYCQQTHITIPYSFGQGTNLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
132	P1AG7505 LC LTBR cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTW VRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVKGRFTISR DTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDVVIK NYYFYGVVDVWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNREGC
133	P1AG7505 ojal HC FAP cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
134	P1AG7505 LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
135	P1AF5257 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQHYKSYPTFGQGTKVEIRS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTIVLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
136	P1AF5257 LC LTBR cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTW VRQAPGKGLEWVSEISGSGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDDGAYGDTM DVWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYSLSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
137	P1AF5257 ojal HC FAP cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVSVLTIVLHQLDNLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
138	P1AF5257 LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
139	P1AF0537 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVIGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSPRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKEVEMKS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKS LSLSP
140	P1AF0537 LC LTBR cruzado	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
141	P1AF0537 ojal HC FAP con cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGFSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEAL HNHYTQKSLSLSP
142	P1AF0537 LC FAP con cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
143	P1AG7507 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKVEMKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKS LSLSPG
144	P1AG7507 LC LTBR cruzado	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFATNWXGG TMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
145	P1AG7507 ojal HC FAP cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDEKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKAALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSFGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
146	P1AG7507 LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
147	P1AG0694 botón HC LTBR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNIGNTYIHW VRQAPGKGLEWMGRIDPTNGNTIYAQKFQGRVTSTR DTSISTAYMELSRRLSDDTVVYYCAPTTLTTPDSFA YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP
148	P1AG0694 LC LTBR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIYKYLWY QQKPGKAPKLLIYSTNQLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYFCQKYYSGFTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
149	P1AG0694 ojal HC FAP cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSP
150	P1AG0694 LC FAP cruzado	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
151	P1AF9727 botón HC LTBR	EVQLQQYGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNIGNTYIHW VIQRPKGLEWIGRIDPTNGNTISTEKFKNKATLTA DLSSNTAYMQLSQLKSDDTAIYFCAPTTLTTPDSFA YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSP
152	P1AF9727 LC LTBR	DIQMTQSPSQLSASVGDRVTLSCKASQNIYKYLNWY QQKLGEAPRLLIYSTNILQTGIPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDAATYFCQKYYSGFTFGSGTKLEMKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
153	P1AF9727 ojal HC FAP cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSP
154	P1AF9727 LC FAP cruzado	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
155	P1AF5260 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWY QQKPGKAPKHLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGAYFT

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		LTITSLQPEDFATYYCQQSHSTPPTFGPGTKVDIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
156	P1AF5260 LC LTBR cruzado	EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSVITGSSSSIDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGSGVWSIST DFDYWGQGTLLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
157	P1AF5260 ojal HC FAP cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
158	P1AF5260 LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
159	P1AF5261 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGKLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
160	P1AF5261 LC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTW

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	LTBR cruzado	VRQAPGKGLEWIGVINSGGGTTYTDSVKGRFTMSRD NSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
161	P1AF5261 ojal HC FAP cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDEKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
162	P1AF5261 LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
163	P1AG7508 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDF LTISSSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
164	P1AG7508 LC LTBR cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTW VRQAPGKGLEWIGVINSGGGTTYTDSVKGRFTMSRD NSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
165	P1AG7508 ojal HC FAP cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDEKVE

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
166	P1AG7508 LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
167	P1AG5684(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
168	P1AG5684(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIHGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPSYYLDGWLDYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
169	P1AG5684(2 +1) ojal HC LTBR cruzado	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
170	P1AG5684(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
171	P1AG7576(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQL LESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVED YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC D
172	P1AG7576(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIPIHGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
173	P1AG7576(2 +1) ojal HC LTBR cruzado	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
174	P1AG7576(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
175	P1AG7509(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGGGGVEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
176	P1AG7509(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPHTGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
177	P1AG7509(2 +1) ojal HC LTBR cruzado	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
178	P1AG7509(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
179	P1AF0544(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISFLKWY QQKPGKAPTLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDF TITSSSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTKV DIKS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLES LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
180	P1AF0544(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMKW FRQAPGKGLEWVSSISGSGRPFYADSVKGRFTISR DNSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCANDMDVWGQGT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
181	P1AF0544(2 +1) ojal HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISFLKWY QQKPGKAPTLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTQVDIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
182	P1AF0544(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
183	P1AG7511(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISFLKWY QQKPGKAPTLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTQVDIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG
184	P1AG7511(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMKWFRQAPGKGLEWVSSISGSGRPFYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCANDMDVWGQGT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
185	P1AG7511(2 +1) ojal HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISFLKWYQKPGKAPITLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTKVDIKSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKS LSLSPG
186	P1AG7511(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
187	P1AF9729(2+1) botón HC LTBR (2x)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDDVIKNYYFYGVVDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATYYADSVKGRFTISR

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		DTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDDV I I K NYYFYGVDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
188	P1AF9729(2 +1) LC LTBR (2x)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFANYCQQHTTIPYSFGQGTNLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
189	P1AF9729(2 +1) ojal HC FAP cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGT LVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPISR ELTKNQVSLTSCAVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
190	P1AF9729(2 +1) LC FAP cruzado	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTD TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
191	P1AG7510(2+1) botón HC LTBR (2x)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTW VRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVKGRFTISR DTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDDV I I K NYYFYGVDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSG GGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFT FSSYPMTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSV KGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNH YPDDV I I K NYYFYGVDVWGQGT TVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
192	P1AG7510(2 +1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	LC LTBR (2x)	QQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFANYCQQTHTIPYSFGQGTNLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
193	P1AG7510(2 +1) ojal HC FAP cruzado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
194	P1AG7510(2 +1) LC FAP cruzado	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
195	P1AF0546(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKVEMKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
196	P1AF0546(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
197	P1AF0546(2 +1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	oial HC LTBR cruzado	QQKPGKAPKRLIFDASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEMKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCA VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKS LSLSP
198	P1AF0546(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGGQTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTL TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
199	P1AG7512(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEMKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGEVQLLES GGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
200	P1AG7512(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
201	P1AG7512(2 +1) oial HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEMKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
202	P1AG7512(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNFPYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
203	P1AG7513(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGLL VQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
204	P1AG7513(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMTW VRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYYTDSVKGRFTMSRD NSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
205	P1AG7513(2 +1) ojal HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
206	P1AG7513(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
207	P1AG5683(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGGGEVQLLES LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
208	P1AG5683(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTW VRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYTDSVKGRFTMSRD NSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
209	P1AG5683(2 +1) ojal HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
210	P1AG5683(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
211	P1AG7575(2+1) botón HC LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDFT LTISSSLQPEDFATYYCQQYNYSYSLTFGGGKLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES LVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGL WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYWGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
212	P1AG7575(2 +1) LC LTBR (2x)cruzado	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMTW VRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYYTDSVKGRFTMSRD NSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
213	P1AG7575(2 +1) ojal HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDFT LTISSSLQPEDFATYYCQQYNYSYSLTFGGGKLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKS LSLSPG
214	P1AG7575(2 +1) LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
215	P1AG1326 botón HC LTBR cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAGQDIKSYLSWY QQKPGKAPKLLIYYATRLADGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGGGKLEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHLEALHNHYTQKS LSLSP
216	P1AG1326 LC LTBR cruzado	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMYW FRQAPGKGLEWVATISDGGSYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCAREENGNFYYFD YWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
217	P1AG1326 ojal HC FAP cargas	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVEDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVE PKSCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHLEA LNHYTQKSLSLSP
218	P1AG1326 LC FAP cargas	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
219	P1AF4664 HC KK+ LTBR cargas (sustituto 1+1 murino)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTW VRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYYTDSVKGRFTMSRD NSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVE GYFPEPVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTC VVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIE KTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKKQMAKDKVSLTCMI TNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYF VYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSL SHSPG
220	P1AF4664 LC LTBR cargas (sustituto 1+1 murino)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLESQVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNYSYSLTFGGGTKLEIKR ADAAPTVSIFPPSSRKLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
221	P1AF4664 HC DD-FAP cargas (sustituto 1+1 murino)	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPFTFGQGTKVEIKSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDVS LTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG
222	P1AF4664 LC LTBR cruzado (sustituto 1+1 murino)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQGT LVTVSSRADAAPTVSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS TYSMSSTLTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
223	P1AF4674 HC KK+ LTBR cargas – FAP cruzado (sustituto 2+1 murino)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTWVRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYTDSVKGRFTMSRDN SKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKKQMAKDVS LTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGGGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQGT LVTVSSRADAAPTVSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS TYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
224	P1AF4674 LC LTBR cargas (sustituto 2+1 murino)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWYQQKPGKAPKRLIFAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGKTKLEIKRADAAPT VSIFFPSSRKLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS TYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
225	P1AF4674 HC DD-LTBR cargas (sustituto 2+1 murino)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTWVRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYTDSVKGRFTMSRDN SKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		SVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVTC VVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIE KTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMI TNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYF VYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSL SHSPG
226	P1AF4674 LC LTBR cruzado (sustituto 2+1 murino)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA YQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV PSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC
227	P1AE5929 HC (IgG1 hu PG LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAI VRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSP
228	P1AE5929 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
229	P1AF7213 HC (IgG1 hu PG LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAI VRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPSYYLDGWLD YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSP
230	P1AF7213 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
231	P1AE9452 HC (IgG1 hu PG LALA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTW VRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVKGRFTISR DTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDDV I I K NYYFYGVDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
232	P1AE9452 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFANYYCQQTHTIPYSFGQGTNLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
233	P1AE9450 HC (IgG1 hu PG LALA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMKW FRQAPGKGLEWVSSISGSGRPFYADSVKGRFTISR DNSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCANDMDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLEFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSP
234	P1AE9450 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSFLKWY QQKPGKAPTLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTKVDIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
235	P1AE9459 HC (IgG1 hu PG LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLEFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP
236	P1AE9459 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLD SGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKEVEMKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
237	P1AF0080 HC (IgG1 hu PG LALA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTW VRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYTDSVKGRFTMSRD NSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
238	P1AF0080 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWY QQKPGKAPKRLIFAASSLES GVP SRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKELEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
239	P1AF0064 HC (IgG1 hu PG LALA)	EVQLQQYGAELGKPGT SVKL SCKVSGYNIGNTYIHW VIQRPGKGLEWIGRIDPTNGNTICTEKFKNKATLTA DLSSNTAYMQLSQLKSDDTAIFYCAPTTLTTPDSFA YWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKLGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP
240	P1AF0064 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSQLSASVGDRVTLSCKASQNIYKYLWY QQKLGEAPRLLIYSTNILQTGIPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDAATYFCQKYYSGFTFGSGTKLEMKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
241	P1AF0079 HC (IgG1 hu PG LALA)	EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSVITGSSSIDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGSGVWSIST DFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP
242	P1AF0079 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCQASQDISNYLNWY QQKPGKAPKHLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGAYFT LTITSLQPEDFATYYCQQSHSTPPTFGPGTKVDIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
243	P1AE9457 HC (IgG1 hu PG LALA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMTW VRQAPGKGLEWVSEISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDDGAYGDTM DVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
244	P1AE9457 LC (IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQHYKSYPTFGGQTKVEIRR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
245	P1AE1873 (CBE11) HC (IgG1 hu PG LALA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMYW FRQAPGKGLEWVATISDGGSYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCAREENGNFYYFD YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSP
246	P1AE1873 (CBE11) LC (IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAGQDIKSYLSWY QQKPGKAPKLLIYYATRLADGVPSRFSGSGSGTDYT LTISLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGGGKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
247	agotador Fc kh NC avi B (P1AA0981) (cadena botón)	GLNDIFEAQKIEWHEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
248	agotador Fc kh NC avi B P1AA0981) (cadena ojal)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
249	linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ humana monocatenaria avi his (P1AE1235)	KPAAHLIGDPSKQNSLLWRANTDRAFLQDGFSLSN SLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYSPKATSSPLYLAH EVQLFSSQYPFHVPLLSQKMYVPGLEPWLHSMYH GAAFQLTQGDQLSTHTDGIPHLVLSPTVFFGAFAL GGSGLPAAHLIGAPLKGQGLGWETTKEQAFLTSGTQ FSDAEGALPQDGLYYLYCLVGYRGRAPPGGGDPQG RSVTLRSSLYRAGGAYGPGTPELLEGAETVTPVLD PARRQGYGPLWYTSVGFGGLVQLRRGERVYVNISHP DMVDFARGKTFFGAVMVGSGLPAAHLIGAPLKGQG LGWETTKEQAFLTSGTQFSDAEGALPQDGLYYLYC LVGYRGRAPPGGGDPQGRSVTLRSSLYRAGGAYGPG TPELLEGAETVTPVLDPARRQGYGPLWYTSVGFGG LVQLRRGERVYVNISHPDMVDFARGKTFFGAVMVG SGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHH
250	linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ murina monocatenaria avi his (P1AE1236)	KPAAHLVGYPYPSKQNSLLWRASTDRAFLRHGFSLSNN SLLIPTSGLYFVYSQVVFSGESCSRAIPTPIYLAH EVQLFSSQYPFHVPLLSAQKSVYPGLQGPWVRSMYQ GAVFLLSKGDQLSTHTDGISHLHFSPSSVFFGAFAL GGSGLPAAHLIGAWMSGQGLSWEASQEEAFLRSGAQ FSPTHGLALPQDGVYYLYCHVGYRGRTPPAGRSRAR SLTLRSALYRAGGAYGRGSPPELLLEGAETVTPVVD IGYGSLWYTSVGFGGLAQLRSGERVYVNISHPDMVD YRRGKTFFGAVMVGSGLPAAHLIGAWMSGQGLSWE ASQEEAFLRSGAQFSPTHGLALPQDGVYYLYCHVGY RGRTPPAGRSRARSLTLRSALYRAGGAYGRGSPPELL LEGAETVTPVVDPIGYGSLWYTSVGFGGLAQLRSGE RVYVNISHPDMVDYRRGKTFFGAVMVGSGGLNDIFE AQKIEWHEGGHHHHHH
251	fusión Fc DEC LTBRhu monomérico (S28- M227) avi biotinilado (P1AE2835) (cadena botón)	SQPQAVPPYASENQTCRDQEKEYYEPQHRICCSRCP PGTYVSAKCSRIRDTCATCAENSYNEHWNLYLTICQ LCRPCDPVMGLEEIIAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAW ALECTHCELLSDCPPGTEAELKDEVGKGNHCVPCCK AGHFQNTSSPSARCQPHTRCENQGLVEAAPGTAQSD TTCKNPLEPLPPEMSGTMLMASGSDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS GGLNDIFEAQKIEWHE
252	fusión Fc DEC LTBRhu monomérico (S28- M227) avi biotinilado (P1AE2835) (cadena ojal)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
253	fusión Fc DEC LTBRmu monomérico (S28- L223) avi biotinilado (P1AE4410) (cadena botón)	SQPQLVPPYRIENQTCWDDQKEYYEPMDHVCCSRCP PGEFVFAVCSRSQDTCVCKTCPHNSYNEHWNHLSTCQ LCRPCDIVLGFEVAPCTSDRKAECRCQPGMSCVYL DNECVHCEEERLVLCPGTEAEVTDEIMDTDVNCVP CKPGHFQNTSSPRARCQPHTRCEIQGLVEAAPGTSY SDTICKNPPEPGAMLLASGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
254	fusión Fc DEC LTBRmu monomérico (S28- L223) avi biotinilado (P1AE4410) (cadena ojal)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
255	fusión Fc ectodominio LTBRcyno monomérico (S28- M227) avi biotinilado (P1AE4411) (cadena botón)	SQPQVPPYGSSENQTCRDQKEYYEPHRRICCSRCP PGTYVSAKCSRSRDTVCATCAENSYNEHWNLYLTICQ LCRPCDPVMGLEEIAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAW ALECTHCELLSDCPPGTEAELKDEVGKGNHCVPC AGHFQNTSSPSARCQPHTRCEDQGLVEAAPGTAQSD TTCRNPSESLPPEMSGTMLMASGSDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS GGLNDIFEAQKIEWHE
256	fusión Fc ectodominio LTBRcyno monomérico (S28- M227) avi	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	biotinilado (P1AE4411) (cadena ojal)	DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
257	fusión Fc LTbR humano N-terminal monomérico (DEC longitud completa) IgG1 hu kih HRYF avi (P1AE1217)(cadena a botón)	QTCRDQEKEYYEPQHRICCSRCPPGTIVSAKCSRIRD DTVCATCAENSYNEHWNLYLTICQLCRPCDPVMGLEE IAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAWALECTHCELLSDC PPGTEAELKDEVGKGNNHCVPCAGHFQNTSSPSAR CQPHTRCENQGLVEAAPGTAQSDTTCKASGSDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
258	fusión Fc LTbR humano N-terminal monomérico (DEC longitud completa) IgG1 hu kih HRYF avi (P1AE1217)(cadena a ojal)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
259	Etiqueta Avi	GLNDIFEAQKIEWHE
260	fusión Fc DEC LTBR humano (S28-M227) extendido N y C terminal - natural HRYF - Avi - His biotinilado 261(P1AE7979)(cadena botón)	SQPQAVPPYASENQTCRDQEKEYYEPQHRICCSRC PGTYVSAKCSRIRDTCATCAENSYNEHWNLYLTICQ LCRPCDPVMGLEEIAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAW ALECTHCELLSDCPPGTEAELKDEVGKGNNHCVPC AGHFQNTSSPSARCQPHTRCENQGLVEAAPGTAQSD TTCKNPLEPLPPEMSGTMLMASGSDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS GGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHH
261	fusión Fc DEC LTBR humano (S28-M227) extendido N y C terminal - natural HRYF - Avi - His biotinilado (P1AE7979)(cadena a ojal)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
262	fusión Fc LTbR cyno N-terminal monomérico (DEC longitud completa) IgG1 hu kih HRYF	QTCRDQEKEYYEPHRRICCSRCPPGTIVSAKCSR DTVCATCAENSYNEHWNLYLTICQLCRPCDPVMGLEE IAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAWALECTHCELLSDC PPGTEAELKDEVGKGNNHCVPCAGHFQNTSSPSAR CQPHTRCEDQGLVEAAPGTAQSDTTCRASGSDKTHT

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	avi (P1AE2656)(caden a botón)	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
263	fusión Fc LTbR cyno N-terminal monomérico (DEC longitud completa) IgG1 hu kih HRYF avi (P1AE2656)(caden a ojal)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
264	FAP humana – Avi – His biotinilado (P1AA5347)	RPSRVHNSEENTMRALTCLKDILNGTFSYKTFNPNWI SGQEYLHQSDANNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSV NASNYGLSPDRQFVYLESDYSLKWRYSYTATYYIYD LSNGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNI YLKQRPDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEML ATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDE QYPRTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTPAYVGPQ EVPVPAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQN VSVLSICDFREDWQWDCPKTQEHIEESRTGWAGGF FVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGKHIHYIKDTVEN AIQITSGKWEAINIFRVTQDSLIFYSSNEFEEYPGRR NIYRISIGSYPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDY AKYYALVCYGPPISTLHDGRDQEI KILEENKEL ENALKNIQLPKKEIKKLEVDEITLWKMIPLPPQFDR SKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEG MVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQIT AVRKFIEMGFIDEKRIAIWGSYGGYVSSLALASGT GLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNL EHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNS AQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYT HMTFLKQCFSLSVDEQLYFQGGSGGLNDIFEAQKIE WHEARAHHHHHH
265	FAP murina – Avi – His biotinilado (P1AD9907)	RPSRVYKPEGNTKRALTLCLKDILNGTFSYKTYFPNWI SEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSV NATDYGLSPDRQFVYLESDYSLKWRYSYTATYYIYD LQNGEFVRGYELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNI YLKQRPDPPFQITYTGRENRIFNGIPDWVYEEEML ATKYALWWSPDGKFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDG QYPRTINIPYPKAGAKNPVVRVFI VDTTPHHVGP EVPVPEMIASSDYYFSWLTWVSSERVCLQWLKRVQN VSVLSICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTGWAGGF FVSTPAFSQDATSYKIFSDKDGKHIHYIKDTVEN AIQITSGKWEAIYIFRVTQDSLIFYSSNEFEGYPGRR NIYRISIGNSPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFYSYK AKYYALVCYGPGLPISTLHDGRDQEI QVLEENKEL ENSLRNIQLPKVEIKKLDGGLTFWYKMIPLPPQFDR

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		SKKYPLLIQVYGGPCSQSVKSVFAVNWITYLASKEG IVIALVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQLT AVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLALASGT GLFKCGIAVAPVSSWEYYASIYSERFMGLPTKDDNL EHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFNQNS AQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGILSGRSQNHLY THMTHFLKQCFSLSDVDEQLYFQGGSGLNDIFEAQK IEWHEARAHHHHHH
266	parche CDR-H2 LTBR (5929)	IPIFG
267	HUJH5.HFc-DO3	CTT GGG CCC TTG GTA CTT GCT GAG GAG ACG GTG ACC AGG G
268	HUJH6.HFc-Do3	CTT GGG CCC TTG GTA CTT GCT GAG GAG ACG GTG ACC GTG G
269	BcPCR_FHLC_líde r.fw (TG)	ACA GAG GAA GCT TGC CGC CAC CAT GGA CAT GAG GGT CCC CGC
270	HuCK.Do.2AA	TGA AGA CAG ATG GTG CAG CCA CAG
271	WTRat.VH.FW11	SAR GTV MAG CTG VWG SAG TCW GGR SS
272	WTRat.VH.FW12	SAG GTG MAG CTS SWG SAR WCW GGR SS
273	WTRat.VH.FW13	SAR GTK MAR CTG SWG SAG TCW GGR SS
274	WTRat.VH.FW14	SMG GTG MAG CTK SWK SAG TCW GGR SS
275	WTRat.VH.FW15	AGG TKM MKC TGA WRS ART CWG GMS ST
276	WTRat.VH.FW16	SAG GTR MAG CTG VWR SAG TCW GGR SV
277	WTRat.VH.FW17	AGG TGC AGC TDV WRS AGW CWG GRS SW
278	682.rev do	GGGAAGATGAAGACAGATG
279	WTRat.VK.FW1	GRYRTYSWGWTGACMCARDCTCCDB
280	WTRat.VK.FW2	GMTRTTGKMTSAMNCARDCWCCAB
281	WTRat.CKappa.Do 2	gacgggtgaggatgatgtcttatgaacaa
282	FAP de ratón	UniProt no. P97321
283	Dominio CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
284	Extremo C terminal conector CH1	EPKSC
285	Variante D extremo C terminal conector CH1	EPKSCD
286	Variante S extremo C terminal conector CH1	EPKSCS
287	Bisagra completa	DKTHTCPXCP donde X es S o P
288	Bisagra media	HTCPXCP donde X es S o P
289	Bisagra corta	CPXCP donde X es S o P
290	Dominio CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQESTYRWSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
291	Dominio CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
292	Fc IgG1, alotipo caucásico	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
293	Fc IgG1, alotipo afroamericano	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
294	Fc IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
295	Fc IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTT HTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHE ALHNRFQKSLSLSPGK
296	Fc IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPS CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL LGK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
297	LTBR ratón Mus musculus	Núm. Acceso UniProt B2RRV3 MRLPRASSPC GLAWGPLLLG LSGLLVASQP QLVPPYRIEN QTCWDQDKEY YEPMHDVCCS RCPPGEFVFA VCSRSQDTVC KTCPHNSYNE HWNHLSTCQL CRPCDIVLGF EEVAPCTSDR KAECRCQPGM SCVYLDNECV HCEEERLVLC QPGTEAEVTD EIMDTDVNCV PCKPGHFQNT SSPRARCQPH TRCEIQGLVE AAPGTSYSDT ICKNPPEPGA MLLAILLSL VLFLFLTTLV ACAWMRHPSL CRKLGTLTKR HPEGEESPPC PAPRADPHFP DLAEPLLPMS GDLSPSPAGP PTAPSLEEVV LQQQSPLVQA RELEAEPGEH GQVAHGANGI HVTGGSVTVT GNIYIYNGPV LGGTRGPGDP PAPPEPPYPT PEEGAPGPSE LSTPYQEDGK AWHLAETETL GCQDL
298	Conector peptídico (G4S)	GGGGS
299	Conector peptídico (G4S) ₂	GGGGS GGGGS
300	Conector peptídico (SG4) ₂	SGGGGS GGGGS
301	Conector peptídico G4(SG4) ₂	GGGGS GGGGS GGGGS
302	Conector peptídico	GSPGSSSSGS
303	Conector peptídico (G4S) ₃	GGGGS GGGGS GGGGS
304	Conector peptídico (G4S) ₄	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
305	Conector peptídico	GSGSGSGS
306	Conector peptídico	GSGSGNGS
307	Conector peptídico	GSGSGSG
308	Conector peptídico	GSGSG
309	Conector peptídico	GGSG
310	Conector peptídico	GGSGNGSG
311	Conector peptídico	GGNGSGSG
312	Conector peptídico	GGNGSG
313	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYW GQGTLVTVSS
314	VL (PD-L1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK
315	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAF DYWGQGTTLVTVSS
316	VL (PD-L1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSFPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
317	rbHC.up	AAG CTT GCC ACC ATG GAG ACT GGG CTG CGC TGG CTT C
318	P1AG5459 HC KK+ LTBR con cargas – FAP cruzado (sustituto 2+1 murino)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV EGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVPSSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQI NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAPGI EKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCM ITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIPKTDGSGY FVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKS LSHSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLE WVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQGLTVTVSSRA DAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN VKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT TKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC
319	P1AG5459 LC LTBR con cargas (sustituto 2+1 murino)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSPRFGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKEVEMKR ADAAPTVSIFPPSSRKLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC
320	P1AG5459 HC DD- LTBR con cargas (sustituto 2+1 murino)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV EGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVPSSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQI NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFAPGI EKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCM ITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIPKTDGSGY FVYSDLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKS LSHSPG
321	P1AG5459 LC LTBR cruzado (sustituto 2+1 murino)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAW YQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKEIK SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV PSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC
322	P1AG5461 HC KK+ LTBR con cargas – DP47 cruzado (sustituto 2+1 murino no	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV EGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	dirigido)	SSVTVPSSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQI NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPI EKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCM ITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIPKTDGSI FVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKS LSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLES LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSGGFDYWGQGTLLTVSSRAD AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINV KWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
323	P1AG5461 LC LTBR con cargas (sustituto 2+1 murino no dirigido)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSPRFGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGKTKVEMKR ADAAPTVSIFPPSSRKLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
324	P1AG5461 HC DD- LTBR con cargas (sustituto 2+1 murino no dirigido)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRITYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQG TMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV EGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTSL SSVTVPSSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRD CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQI NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPI EKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCM ITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSI FVYSDLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKS LSHSPG
325	P1AG5461 LC DP47 cruzado (sustituto 2+1 murino no dirigido)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGKTKVEIK SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTSLSSSVTV PSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDC
326	P1AE1079(2+1) botón HC LTBR (CBE11) – VH FAP	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMYW FRQAPGKGLEWVATISDGGSYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCAREENGNYFYFD YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKLGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLLVTVSS
327	P1AG1079(2 +1) LC LTBR (CBE11) 2x	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAGQDIKSYLSWY QQKPGKAPKLLIYYATRLADGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGGGTKEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
328	P1AG1079(2+1) ojal HC LTBR (CBE11) – VL FAP	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMYW FRQAPGKGLEWVATISDGSYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCAREENGNYFYFD YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKLGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKEIK
329	P1AH5884(1+1) botón HC LTBR (BHA10) cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWY QQKPGKAPKSLISSASYRSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKEIKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
330	P1AH5884(1 +1) ojal HC FAP con cargas	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWG QGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
331	P1AH5884(1 +1) LC LTBR (BHA10) cruzado	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFYPYWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
332	P1AH5884(1 +1) LC FAP con cargas	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
333	P1AH5885(2+1) botón HC LTBR (BHA10) cruzado, FAP con cargas	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
334	P1AH5885(2+1) ojal HC LTBR (BHA10) cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPAEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
335	P1AH5885(2+1) LC LTBR (BHA10)(2x)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFYPYWGQ

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	cruzado	GTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
336	P1AH5885(2+1) LC FAP con cargas	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAW YQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
337	P1AH5886(2+1) botón HC LTBR (9459) cruzado, FAP (212) con cargas	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSPRFGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKEVEMKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPGPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGGQVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCASGYTLTDYNMDWVRQAPGQGLEW IGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDTSTSTVYME SSLRSEDVAVYYCTRFRIHYAMDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD
338	P1AH5886(2+1) ojal HC LTBR (9459) cruzado	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWF QQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSPRFGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKEVEMKS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPGPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKS LSLSPG
339	P1AH5886(2+1) LC LTBR (9459)(2x) cruzado	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNW VRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSVKGRFTISR DNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWQGG TMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
340	P1AH5886(2+1) LC FAP (212) con	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDNYGLSF INWFQQKPGQAPRLLIYGTSNRRGSGIPARFSGSGSG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	cargas	TDFTLTISSELEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
341	P1AH0119 HC (LTBR BHA10 IgG1 hu PG LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
342	P1AH0119 LC (LTBR BHA10 IgG1 hu PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
343	CDR-H1 LTBR (BHA10)	TYYLH
344	CDR-H2 LTBR (BHA10)	WIYPGNVHAQYNEKFKG
345	CDR-H3 LTBR (BHA10)	SWEGFPY
346	CDR-L1 LTBR (BHA10)	KASQNVGINVA
347	CDR-L2 LTBR (BHA10)	SASYRYS
348	CDR-L3 LTBR (BHA10)	QQYDTPFT
349	VH LTBR (BHA10)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGQ GTTVTVSS
350	VL LTBR (BHA10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIK
351	Región epitópica (P1AE9459)	QCRCQPGMFCAAWALEC
352	Región del epítipo (P1AH0119)	AWALECTHCELL
353	Región epitópica 1 (P1AE1873)	QTCRDQEKEYYEPQHR
354	Región epitópica 2	SRIRDTC

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	(P1AE1873)	
355	Región epitópica 1 (P1AE1235)	SYNEHWNLYLTICQL
356	Región epitópica 2 (P1AE1235)	WALECTHCELLSDCPPGT
357	Ligera humana (Núm. Acceso UniProt O43557)	MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVA RVGLGLLLLLLMGAGLAVQGWFLQLHWR LGEMVTRL PDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGANSSLTGS GGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVT KAGYYYIY SKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELL VSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKVV VRVLDERLVR LRDGTRSYFGAFMV
358	Ligera humana (74-240)	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGANSSLTGS GPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVT KAGYYYIYS KVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLV SQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKVV RVLDERLVR LRDGTRSYFGAFMV
359	DEC LTBR humano (S28-M227)	SQPQAVPPYASENQTCRDQEKEYYEPQHRICCSRCF PGTYVSAKCSRI RD TVCATCAENSYNEHWNLYLTICQ LCRPCDPVMGLEE IAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAW ALECTHCELLSDCPPGTAEAL KDEVGKGNHCV PCK AGHFQNTSSPSARCQPHTRCENQGLVEAAPGTAQSD TTCKNPLEPLPEMSGTMLM
360	DEC LTBR murino (S28-L223)	SQPQLVPPYRIENQTCWDQDQEKEYYEPMDHVCCSRCF PGEFVFAVCSRSQD TVCKTCPHNSYNEHWNHLSTCQ LCRPCDIVLGFE EVAPCTSDRKAECRCQPGMSCVYL DNECVHCEEERLVLCQPGTEAEVTDEIMDTDVNCVP CKPGHFQNTSSPRARCQPHTRCEIQGLVEAAPGTSY SDTICKNPPEPGAMLL
361	DEC LTBR cynomolgus (S28-M227)	SQPQVPPYGSSENQTCRDQEKEYYEP RHRICCSRCF PGTYVSAKCSRSRDTVCATCAENSYNEHWNLYLTICQ LCRPCDPVMGLEE IAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAW ALECTHCELLSDCPPGTAEAL KDEVGKGNHCV PCK AGHFQNTSSPSARCQPHTRCEDQGLVEAAPGTAQSD TTCRNPSESLPEMSGTMLM

Los siguientes párrafos numerados (párr) son aspectos de la invención:

1. Una molécula de unión a antígeno biespecífica, que comprende
 - (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la proteína de activación de fibroblastos (FAP),
 - (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente al receptor de linfotóxina beta (LTBR), y
 - (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoácidas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.

2. La molécula de unión a antígeno biespecífica del párrafo 1, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica activa LTBR al unirse a FAP.
3. La molécula de unión a antígeno biespecífica de los párrafos 1 o 2, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un tercer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR.
4. La molécula de unión a antígeno biespecífica del párrafo 3, en la que el tercer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR es idéntico al segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR.
5. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 4, en la que el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP es un fragmento Fab.
6. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 5, en la que el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende
 - (i) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, o
 - (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24.
7. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 6, en la que el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende

- una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, o comprende una región variable de la
- 5 cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25, y una región variable de la cadena ligera (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
- 10 8. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 7, en la que el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP comprende una región variable de cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 o comprende
- 15 una región variable de cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25 y una región variable de cadena ligera (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
9. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 8, en la que el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a
- 20 LTBR comprende
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y una CDR-H3 que
- 25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de
- 30 aminoácidos de SEQ ID NO:32, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la
- 35 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, o

- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o
- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72, o

- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la
- 5 cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-
- 10 H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de
- 15 aminoácidos de SEQ ID NO:87 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.
10. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 9, en la que el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende
- 20 (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 25 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia
- 30 de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66,

- (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74,
- (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
- (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
- (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.
11. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 10, en la que el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR comprende
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50.
12. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 11, que comprende
- (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a FAP, que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de la cadena ligera (V_L FAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y
- (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a LTBR que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.

13. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 12, en la que el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad es un dominio Fc de IgG, en particular un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4 y en la que el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del anticuerpo a un receptor Fc y/o la función efectora.
14. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 13, en la que la región Fc es de la subclase de IgG1 humana con las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
15. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 14, que comprende
- (a) un primer fragmento Fab que se une específicamente a FAP,
 - (b) un segundo fragmento Fab que se une específicamente a LTBR, y
 - (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora.
16. La molécula de unión a antígeno biespecífica del párrafo 15, en la que el segundo fragmento Fab que se une específicamente a LTBR es un fragmento Fab cruzado.
17. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 14, que comprende
- (a) un primer fragmento Fab que se une específicamente a FAP,
 - (b) un segundo y un tercer fragmento Fab que se unen específicamente a LTBR, y
 - (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y que comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión a antígeno a un receptor de Fc y/o la función efectora, en la que el primer fragmento Fab que se une específicamente a FAP está fusionado en su extremo N al extremo C de una de las subunidades del dominio Fc y el segundo y un tercer fragmento Fab que se unen específicamente a LTBR están fusionados cada uno en su extremo C al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc.
18. Un anticuerpo que se une específicamente a LTBR, en el que dicho anticuerpo comprende
- (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, una CDR-H2 que

- comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40, o
- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:45, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o
- (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56, o
- (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, y una región variable de la

cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, o

- 5 (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72, o
- 10 (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80, o
- 15 (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84 y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85, y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:86, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87 y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88.

19. El anticuerpo del párrafo 18, en el que dicho anticuerpo comprende

- 30 (i) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, o
- (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR)
- 35 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42, o

- (iii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, o
 - (iv) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, o
 - (v) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66,
 - (vi) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:73 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74,
 - (vii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:82, o
 - (viii) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:89 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, o
 - (ix) una región variable de la cadena pesada (V_H LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97 y una región variable de la cadena ligera (V_L LTBR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:98.
20. Uno o más polinucleótidos aislados que codifican la molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17 o el anticuerpo de los párrafos 18 o 19.
21. Un vector de expresión que comprende el uno o más polinucleótidos aislados del párrafo 20.
22. Una célula huésped procariota o eucariota que comprende el uno o más polinucleótidos aislados del párrafo 20 o el vector de expresión del párrafo 21.
23. Un procedimiento para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped procariota o eucariota del párrafo 22 en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica y b) opcionalmente recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica.

24. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17 o el anticuerpo de los párrafos 18 o 19 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
25. La composición farmacéutica del párrafo 24, que comprende además un agente terapéutico adicional.
26. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17, o la composición farmacéutica del párrafo 24, para su uso como un medicamento.
27. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17, o la composición farmacéutica del párrafo 24, para su uso en (a) inducir la regulación por incremento de ICAM en células endoteliales o fibroblastos asociados al cáncer, o (b) potenciar la adhesión de linfocitos T.
28. La molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17 o la composición farmacéutica de la reivindicación 24, para su uso en el tratamiento del cáncer.
29. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 17 o la composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 24 para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica o la composición farmacéutica es para su administración en combinación con un agente quimioterápico, radiación y/ u otros agentes para su uso en la inmunoterapia contra el cáncer.
30. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 17 o la composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 24 para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica es para su administración en combinación con un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1.
31. Uso de la molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17 o la composición farmacéutica del párrafo 24, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
32. Un procedimiento para tratar un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17 o la composición farmacéutica del párrafo 24.

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que otros diversos modos de realización pueden ponerse en práctica, en función de la descripción general proporcionada anteriormente.

Técnicas de ADN recombinante

- 5 Se usaron procedimientos estándares para manipular el ADN como se describe en Sambrook y col, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos de biología molecular se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Información general relacionada con las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesadas y
- 10 ligeras de las inmunoglobulinas humanas se proporciona en: Kabat, E.A. y col, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Ed., publicación de NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria.

15 Síntesis génica

- Los segmentos génicos deseados se generaron mediante PCR usando moldes adecuados o se sintetizaron a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automatizada. En los casos en los que no había disponible una secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores de oligonucleótidos basado en
- 20 secuencias de los homólogos más cercanos y los genes se aislaron mediante RT-PCR a partir de ARN originado del tejido adecuado. Los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singular se clonaron en vectores de clonación/secuenciación estándar. El ADN de plásmido se purificó a partir de bacterias transformadas y la concentración se determinó mediante espectroscopía UV.
- 25 La secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmó mediante secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los vectores de expresión respectivos. Todas las construcciones se diseñaron con una secuencia de ADN en el extremo 5' que codifica un péptido líder que actúa sobre las proteínas para su secreción en
- 30 células eucariotas.

Purificación de proteínas

- Las proteínas se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo celular filtrados en referencia a los protocolos estándares. En resumen, los anticuerpos se aplicaron a una columna de sefarosa de proteína A (MabSelect™ SuRe™, Cytiva) y se lavaron
- 35 con PBS. La elución de anticuerpos se logró a pH 2,8 seguido de la inmediata

neutralización de la muestra. La proteína agregada se separó de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (HiLoad® 16/600 Superdex® S200, Cytiva) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM pH 6,0. Las fracciones de anticuerpos monoméricos se combinaron, se concentraron (en caso de ser necesario) usando, por ejemplo, un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (MWCO 30), se congelaron y se almacenaron a -20 °C o -80 °C. Parte de las muestras se proporcionaron para su análisis proteico posterior y caracterización analítica, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, CE-SDS, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o espectrometría de masas.

10 **SDS-PAGE**

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

CE-SDS

La pureza, la integridad del anticuerpo y el peso molecular de los anticuerpos biespecífico y de control se analizaron mediante CE-SDS usando tecnología microfluida Labchip® (Caliper Life Science, Estados Unidos). Se prepararon 5 µl de solución proteica para el análisis de CE-SDS usando el kit de reactivos HT Protein Express de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se analizaron en un sistema de caracterización de proteínas LabChip® GXII Touch™ usando un Chip HT Protein Express. Los datos se analizaron usando el programa informático LabChip® GX versión 3.0.618.0.

25 **Cromatografía analítica de exclusión por tamaño**

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y el estado oligomérico de los anticuerpos se realizó mediante cromatografía HPLC. En resumen, se aplicaron anticuerpos purificados con proteína A a una columna Tosoh (por ejemplo, TSKgel® G3000 SW_{XL}) en NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema de HPLC Dionex. La proteína eluida se cuantificó mediante absorbancia UV e integración de las áreas de pico. El estándar de filtración en gel BioRad 151-1901 sirvió como un estándar.

Ejemplo 1

35 **Generación de anticuerpos anti-LTBR**

1.1 Proteínas utilizadas para la presentación en fagos y la inmunización para generar anticuerpos anti-LTBR

Para la generación de anticuerpos anti-LTBR mediante presentación en fagos e inmunización, se generaron receptores de linfotoxina β y linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ de diferentes especies, así como proteínas herramienta, como proteínas recombinantes solubles. Estas se biotinilaron y se usaron como antígenos receptores de linfotoxina β biotinilados y etiquetados con Fc en la presentación en fagos e inmunógenos para inmunizaciones, se usó un fragmento de Fc biotinilado (agotador de Fc) como agente de preaclaramiento para evitar los aglutinantes de Fc en la presentación en fagos, y se usaron ligandos de linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ monocatenarios biotinilados y etiquetados con his para la competencia durante la presentación en fagos y la caracterización posterior. La **Tabla 1** proporciona una visión general sobre estas proteínas y sus respectivos identificadores, sus estructuras se muestran esquemáticamente en las **Figuras 1A a 1G**.

Tabla 1: Receptores solubles recombinantes, ligandos y proteínas herramientas usados para la presentación en fagos y la inmunización

Identificador	SEQ ID NO.	Proteína soluble recombinante
P1AA0981	247, 248 (Cadena botón y ojal)	Agotador de Fc kh NC avi biotinilado
P1AE1235	249	Linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ monocatenaria humana avi his
P1AE1236	250	Linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ monocatenaria murina avi his
P1AE2835	251, 252 (Cadena botón y ojal)	fusión Fc DEC LTBRhu monomérico (S28-M227) avi biotinilado
P1AE4410	253, 254 (Cadena botón y ojal)	fusión Fc DEC LTBR murino monomérico (S28-L223) avi biotinilado
P1AE4411	255, 256 (Cadena botón y ojal)	fusión Fc DEC LTBR cynomolgus monomérico (S28-M227) avi biotinilado
P1AE1217	257, 258 (Cadena botón y ojal)	fusión Fc LTBR N-terminal monomérico (DEC longitud completa) IgG1 hu kih HRYF avi

Todas las proteínas solubles recombinantes enumeradas en la **Tabla 1** se prepararon mediante evitria usando su sistema de vectores patentado con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y usando células CHO K1 adaptadas en suspensión (recibidas originalmente de ATCC y adaptadas al crecimiento libre de

- suero en cultivo en suspensión en evitria). Para la producción, evitria usó sus medios patentados, libres de componentes animales y libres de suero (eviGrow y eviMake2) y su reactivo de transfección patentado (eviFect). Para la biotinilación *in vivo*, se fusionó una etiqueta avi (GLNDIFEAQKIEWHE, SEQ ID NO:259) a los extremos C de estas
- 5 construcciones (en el caso de P1AA0981 también al extremo N de la cadena pesada de botón) que permitió la biotinilación específica tras la expresión conjunta con la biotina ligasa BirA. Los sobrenadantes se cosecharon mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm) y las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante cosechado mediante procedimientos estándares.
- 10 Las proteínas etiquetadas con Fc se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A (Proteína A MabSelect™ SuRe™, Cytiva) y cromatografía preparativa de exclusión por tamaño (SEC) (HiLoad® 16/600 Superdex® S200, Cytiva), mientras que las proteínas etiquetadas con his se purificaron mediante cromatografía de afinidad con etiqueta his cOmplete seguida de cromatografía de exclusión por tamaño
- 15 (SEC) preparativa (HiLoad® 26/60 S200), todo ello de acuerdo con los procedimientos estándar y las instrucciones del fabricante. La pureza de las proteínas purificadas se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (por ejemplo, TSKgel® G3000 SW_{XL}) y CE-SDS (por ejemplo, Caliper LabChip® GXII).

1.2 Proteínas adicionales usadas para el cribado y la caracterización de los anticuerpos IgG anti-LTBR y los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

- 20 Para el cribado y la caracterización de los anticuerpos generados por presentación en fagos e inmunización, se han expresado y purificado, o se han adquirido comercialmente, otros receptores solubles de linfotoxina beta, ligandos (LIGHT humano) y dianas del estroma tumoral (FAP humana y murina). Además, se han
- 25 adquirido receptores de linfotoxina β comerciales y se biotinilaron *in vitro*. La **Tabla 2** y las **Figuras 2A a 2F** proporcionan una visión general sobre estas proteínas y sus respectivos identificadores.

Tabla 2: Receptores solubles recombinantes adicionales, ligandos y dianas del estroma tumoral

Identificador	SEQ ID NO:	Proteína soluble recombinante
P1AE2401	-	LTBR dimérico humano -Fc biotinilado (comprado a R&D Systems (7538-LR) y posteriormente biotinilado)
P1AE7979	260, 261	DEC LTBR humano (S28-M227) Extendido con N y C terminales wt kih HRYF - Avi - His biotinilado
P1AE2656	262, 263	fusión Fc LTbR cynomolgus monomérico N terminal

		(DEC de longitud completa) IgG1 humana kih HRYP avi biotinilado
P1AE2655	-	Homodímero LTBR-Fc dimérico murino conectado por enlace disulfuro biotinilado (comprado a R&D Systems (1008-LR) y posteriormente biotinilado)
-	-	LIGHT humano (comprado a R&D Systems (664-Li))
P1AA5347	264	FAP humana – Avi – His biotinilado
P1AD9907	265	FAP murina – Avi – His biotinilado

1.3 Generación de Fab anti-LTBR (fragmento de unión a antígeno) mediante presentación en fagos

1.3.1 Selección y cribado de Fab anti-LTBR

- 5 Los Fab anti-LTBR se seleccionaron mediante presentación en fagos a partir de colecciones de Fab sintéticos basado en marcos totalmente humanos con diversidad de secuencias en las CDR3 de los dominios VL (3 longitudes diferentes) y VH (6 longitudes diferentes).
- Las rondas de selección (ciclos de selección por afinidad) se realizaron en solución de acuerdo con el siguiente protocolo: 1. preaclaramiento de $\sim 10^{12}$ partículas de fagémidos por conjunto de colecciones en placas de 96 pocillos recubiertas con neutravidina y recubiertas con 500 nM de un fragmento Fc humano no biotinilado, 2. incubación de las partículas de fagémidos que se unen al fragmento Fc no humano en el sobrenadante con el ligando de linfotoxina y el receptor LTBR biotinilado (véase la
- 10 **Tabla 3**) durante 0,5 h en un volumen total de 0,8 ml, 3. captura del receptor LTBR biotinilado y específicamente el fago de unión mediante la adición de 80 μ l de partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina durante 20 min, 4. lavado de las respectivas partículas magnéticas 5-10x con 0,8 ml de PBS/Tween 20 y 5-10x con 0,8 ml de PBS usando un separador de partículas magnéticas, 5. elución de las partículas
- 20 de fago mediante la adición de 0,8 ml de glicina 10 mM pH 2 durante 5 min, seguido de 0,8 ml de trietilamina (TEA) 100 mM durante 5 min y posterior neutralización mediante la adición de un volumen 1/2 de Tris/HCl 1 M pH 7,4, 6. reinfeksi3n de células de E. coli TG1 en fase logarítmica con las partículas de fago eluidas, infección con el fago auxiliar VCSM13, incubación en un agitador a 30 °C durante la noche y
- 25 posterior precipitación con PEG/NaCl de las partículas de fagémidos que se van a usar en la siguiente ronda de selección.

Las selecciones se llevaron a cabo en 4 rondas usando concentraciones decrecientes de antígeno. Los ligandos y receptores de linfotoxinas humanas y murinas se

alternaron entre las rondas de selección para obtener anticuerpos humanos y de ratón LTBR con reactividad cruzada que no compitan con los ligandos naturales. Debido a la alta homología de secuencia entre los ectodominios de LTBR humanos y de cynomolgus, se asumió que también se generarían anticuerpos anti-LTBR humanos y de cynomolgus con reactividad cruzada. La **Tabla 3** resume qué proteínas se han usado para el preaclaramiento, la competencia de ligando y la selección durante la campaña de selección por presentación en fagos para LTBR para obtener anticuerpos específicos de LTBR humanos y murinos que no compiten con el ligando.

Tabla 3: Campaña de selección mediante presentación en fagos para la selección de anticuerpos específicos de LTBR humanos y murinos que no compiten con el ligando

ronda de selección	proteína de preaclaramiento	ligando de linfotóxina para la competencia	receptor LTBR para la selección
ronda 1	500 nM de agotador de Fc humano biotinilado kh NC avi B (P1AA0981)	300 nM de linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ humana monocatenaria avi his (P1AE1235)	100 nM de fusión Fc DEC de LTBR humano monomérico (S28-M227) avi biotinilado (P1AE2835)
ronda 2	500 nM de agotador de Fc humano biotinilado kh NC avi B (P1AA0981)	300 nM de linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ murina monocatenaria avi his (P1AE1236)	50 nM de fusión Fc DEC de LTBR murino monomérico (S28-L223) avi biotinilado (P1AE4410)
ronda 3	500 nM de agotador de Fc humano biotinilado kh NC avi B (P1AA0981)	300 nM de linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ humana monocatenaria avi his (P1AE1235)	25 nM de fusión Fc DEC de LTBR humano monomérico (S28-M227) avi biotinilado (P1AE2835)
ronda 4	500 nM de agotador de Fc humano biotinilado kh NC avi B (P1AA0981)	300 nM de linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ murina monocatenaria avi his (P1AE1236)	10 nM de fusión Fc DEC de LTBR murino monomérico (S28-L223) avi biotinilado (P1AE4410)

1.3.2 ELISA de tipo sandwich para identificar los Fab con reactividad cruzada de LTBR humanos y de ratón obtenidos mediante presentación en fagos

Los clones individuales se expresaron bacteriológicamente como cultivos de 1 ml en formato de 96 pocillos y los sobrenadantes se sometieron a cribado por ELISA. Los aglutinantes específicos se definieron como aquellos que tenían señales mayores a 5 veces la señal de fondo para fusión Fc DEC de LTBRhu monomérico (S28-M227) avi biotinilado (P1AE2835) así como para fusión Fc DEC de LTBRmu (S28-L223) avi

biotinilado (P1AE4410) y ninguna señal significativa para el agotador de Fc kh NC avi B (P1AA0981).

De manera más precisa, las placas de 96 pocillos en tiras con neutravidina (Thermo Fisher) se recubrieron con 100 nM de proteínas biotiniladas a 37 °C durante 30 min, seguido de bloqueo de la placa con MPBS (solución salina tamponada con fosfato y leche en polvo) al 2 % (200 µl/pocillo) durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBS, a continuación se añadieron sobrenadantes bacterianos que contenían Fab y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de otras 3 etapas de lavado con PBS, se añadió el anticuerpo secundario anti-FLAG-HRP (1:4000) (Sigma) y se incubó la placa en un agitador durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBS y se reveló mediante la adición de BM Blue POD (Roche) a 100 µl/pocillo. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M a 50 µl/pocillo. La DO se leyó a 450 nm (referencia a 900 nm) para una lectura final de OD₄₅₀₋₉₀₀. Los aglutinantes específicos de ELISA se sometieron a la conversión a formato IgG para su posterior caracterización por SPR, como se describe a continuación.

El clon Fab seleccionado FAPltbr.P218.076 cumplía los criterios de unión específica a LTBR humano y murino (**Figura 3**). Posteriormente se convirtió en un formato de IgG1 humana para su posterior caracterización (P1AE5929 después de la conversión a IgG). A pesar de la estrategia de selección, compite con los ligandos naturales linfotóxina α1β2 y LIGHT (véase **Tabla 5** y **Figuras 4 y 5**, respectivamente). Debido a su alta afinidad de 2 nM puede ser posible que este anticuerpo desplazara al ligando durante la selección.

1.4 Generación de anticuerpos mediante la inmunización de conejos y ratas con proteína

Para la inmunización, se utilizaron ratas CD obtenidas de Charles River Laboratories International, Inc. así como conejos transgénicos patentados por Roche que comprendían un locus de inmunoglobulina humana, tal como se informa en los documentos WO 2000/46251, WO 2002/12437, WO 2005/007696, WO 2006/047367, US 2007/0033661 y WO 2008/027986. Los animales se alojaron de acuerdo con el apéndice A “Directrices para el alojamiento y cuidado de los animales” en una instalación para animales acreditada por la AAALAC. Todos los protocolos y experimentos de inmunización en animales se aprobaron por el Gobierno de Alta Bavaria (número de permiso 55.2-1-54- 2531-66-16 y 55.2-1-54-2532-90-14) y se

realizaron de acuerdo con la German Animal Welfare Act y la Directiva 2010/63 del Parlamento y el Consejo europeos.

Se usó fusión Fc LTBR N-terminal monomérico (DEC de longitud completa) IgG1 hu kih HRYF avi (P1AE1217) para la inmunización de 3 conejos transgénicos. Cada
 5 conejo se inmunizó inicialmente por vía intradérmica con 400 µg de la proteína, seguido de inyecciones alternas intramusculares y subcutáneas de 200 µg de la proteína en los días 7, 14, 42, 70 y 98. Se usó una mezcla de agonistas de TLR como adyuvante para cada inmunización. Se tomaron muestras de sangre después de la
 10 tercera, cuarta, quinta y sexta inmunización (a los 5-7 días después de la inmunización) y se usaron como fuente de linfocitos B específicos del antígeno. Los títulos específicos del antígeno se monitorearon durante el periodo de inmunización mediante el análisis ELISA de las muestras de suero.

Las ratas CD (n=4) se inmunizaron con el mismo inmunógeno, es decir, fusión Fc LTBR humano monomérico recombinante N-terminal (ECD de longitud completa) IgG1
 15 hu kih HRYF avi (P1AE1217). Para la inmunización inicial, se emulsionaron 40 µg del inmunógeno con adyuvante de Freund incompleto (IFA) y un agonista de TLR y se inyectó una mitad de la mezcla por vía subcutánea (distribuida en varios puntos de inyección), mientras que la otra mitad se administró por vía intraperitoneal. Después de seis semanas, se administró una inmunización de refuerzo de la misma manera,
 20 excepto por el uso de IFA, que se sustituyó por PBS. Cuatro días después de la segunda inmunización, se extrajo sangre y se usó como fuente de linfocitos B específicos del antígeno.

25 1.4.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

La sangre total con EDTA se diluyó dos veces con PBS 1x (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) antes de la centrifugación por densidad usando Lympholyte de mamífero (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canadá) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las PBMC se lavaron dos veces con PBS 1x.

30 1.4.2 Procedimiento de clonación de linfocitos B de conejo

Disminución de células: Se usaron placas estériles de 6 pocillos (de grado de cultivo celular) cubiertas con una monocapa confluyente de células CHO o sin cubrir, para agotar los linfocitos de unión inespecífica, así como los macrófagos/monocitos a través de adhesión inespecífica al plástico. Cada pocillo se llenó al máximo con 4 ml de
 35 medio y hasta 6×10^6 PBMC y se dejó que se unieran durante 1 h a 37 °C en la

incubadora. Las células del sobrenadante (linfocitos de sangre periférica (PBL)) se usaron para la etapa de ciclos de selección de antígenos.

Enriquecimiento de linfocitos B en LTBR humano y de cynomolgus: Se sembraron placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos cubiertas con una monocapa de células CHO
 5 positivas para LTBR humano o de cynomolgus o recubiertas con la proteína de fusión Fc-LTBR humano recombinante con hasta 6×10^6 PBL por 4 ml de medio y se dejaron unirse durante 1 h a 37 °C en la incubadora. Las células no adherentes se eliminaron lavando cuidadosamente los pocillos 1-2 veces con 1x PBS. Las células adherentes restantes se separaron con tripsina durante 10 min a 37 °C en la incubadora. La
 10 tripsinación se detuvo con medio EL-4 B5. Las células se mantuvieron en hielo hasta la tinción por inmunofluorescencia.

Tinción por inmunofluorescencia y citometría de flujo: Se usó anti-IgG FITC (Abcam, Cambridge, Reino Unido) para la separación de células individuales. Para la tinción de la superficie, las células de la etapa de disminución y enriquecimiento se incubaron
 15 con el anticuerpo anti-IgG FITC en PBS y se incubaron durante 45 min en la oscuridad a 4 °C. Después de la tinción, las PBMC se lavaron dos veces con PBS helada. Por último, las PBMC se resuspendieron en PBS helada y se sometieron de inmediato a los análisis FACS. Se añadió yoduro de propidio en una concentración de 5 µg/mL (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) antes de los análisis FACS para discriminar
 20 entre células vivas y muertas. Se utilizó un FACS Aria de Becton Dickinson equipado con un ordenador y el programa informático FACSDiva (BD Biosciences, EE. UU.) para la separación de células individuales.

Cultivo de linfocitos B: El cultivo de los linfocitos B se preparó mediante un procedimiento similar al descrito por Lightwood y col (J Immunol Methods, 2006, 316:
 25 133-143). En resumen, se incubaron linfocitos B de conejo separados individualmente en placas de 96 pocillos con 200 µl/pocillo de medio EL-4 B5 que contenía células de Pansorbin (1:100 000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), una mezcla de citoquinas (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) combinada con PMA (Sigma, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con el documento WO/2018/122147 y células de
 30 timoma murino EL-4-B5 irradiadas con rayos gamma (5×10^4 /pocillo) durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ en la incubadora. Los sobrenadantes del cultivo de linfocitos B se retiraron para el cribado y las células restantes se cosecharon de inmediato y se congelaron a -80 °C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

El medio EL-4 B5 consiste en RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) complementado con FCS al 10 %, HEPES 10 mM (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania), glutamina 2 mM, solución de penicilina/estreptomicina al 1 % (PAA, Pasching, Austria), piruvato de sodio 2 mM y β -mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Paisley, Escocia).

Amplificación por PCR de los dominios V de conejo: El ARN total se preparó a partir de lisado de linfocitos B (resuspendido en tampón RLT - Qiagen - Cat. N° 79216) usando el kit de ARN NucleoSpin 8/96 (Macherey&Nagel; 740709.4, 740698) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN se eluyó con 60 μ l de agua libre de ARNasa. Se utilizaron 6 μ l de ARN para generar ADNc mediante una reacción de retrotranscriptasa usando la supermezcla Superscript III First-Strand Synthesis (Invitrogen 18080-400) y un cebador de oligo-dT de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las etapas se realizaron en un sistema Hamilton ML Star. Se utilizaron 4 μ l de ADNc para amplificar las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (VH y VL) con la supermezcla AccuPrime (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 μ l usando los cebadores rbHC.up (SEQ ID NO:317), HUJH5.HFc-DO3 (SEQ ID NO:267) y HUJH6.HFc-DO3 (SEQ ID NO:268) para la cadena pesada y BcPCR_FHLC_líder.fw (TG) (SEQ ID NO:269) y HuCK.Do.2 AA (SEQ ID NO: para la cadena ligera de linfocitos B de conejo transgénicos. Todos los cebadores directos eran específicos para el péptido señal (de VH y VL, respectivamente) mientras que los cebadores inversos eran específicos para las regiones marco o constantes (de VH y VL, respectivamente). Las condiciones de PCR para la VH y VL fueron como sigue: Arranque en caliente a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 70 °C, 45 s a 68 °C y una extensión final a 68 °C durante 7 min. Se cargaron 8 μ l de 50 μ l de solución de PCR en un 48 E-Gel 2 % (Invitrogen G8008-02). Las reacciones de PCR positivas se limpiaron usando el kit NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se eluyeron con 75 μ l de tampón de elución. Todas las etapas de limpieza se realizaron en un sistema Hamilton ML Starlet.

30 1.4.3 Procedimiento de clonación de linfocitos B de rata

Disminución de células: En una primera etapa, se utilizaron placas estériles de 6 pocillos (de grado de cultivo celular) para agotar los linfocitos de unión inespecífica, así como los macrófagos/monocitos por adhesión inespecífica al plástico. Cada pocillo se llenó al máximo con 4 ml de medio y hasta 6×10^6 PBMC y se dejó que se unieran durante 1 h a 37 °C en la incubadora. Las células del sobrenadante (linfocitos de

sangre periférica (PBL)) se usaron para una segunda etapa de disminución. Para ello, se utilizaron placas de 6 pocillos cubiertas con anti-CD4 de rata (BD Biosciences, San José, EE. UU.) y anti-IgM de rata (Biorad, Hércules, EE. UU.) para agotar las células adheridas como se describió anteriormente.

- 5 Tinción por inmunofluorescencia y citometría de flujo: Para la tinción de superficie, las células procedentes de las etapas de disminución se incubaron con los anticuerpos anti-IgG1 de rata, anti-IgG2a de rata, anti-IgG2b de rata (todos FITC), anti-cadena ligera kappa (PE) y anti-CD8a de rata (Alexa Fluor 647) (todos de BD Bioscience, San José, EE.UU.) en PBS y se incubaron durante 45 min en la oscuridad a 4 °C.
- 10 Posteriormente, las PBMC se lavaron dos veces con PBS fría. Por último, las PBMC se resuspendieron en PBS helada y se sometieron de inmediato a los análisis FACS. Se añadió yoduro de propidio en una concentración de 5 µg/mL (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) antes de los análisis FACS para discriminar entre células vivas y muertas. Después de la separación negativa de las células CD8a⁺, las células
- 15 doblemente positivas para IgG y cadena ligera kappa se separaron como células individuales. Se utilizó un FACS Aria de Becton Dickinson equipado con un ordenador y el programa informático FACSDiva (BD Biosciences, EE.UU.) para la separación.

- Cultivo de linfocitos B: El cultivo de los linfocitos B se preparó mediante un procedimiento similar al descrito por Lightwood y col (J Immunol Methods, 2006, 316:
- 20 133-143). En resumen, se incubaron linfocitos B de rata separados individualmente en placas de 96 pocillos con 200 µl/pocillo de medio EL-4 B5 que contenía células de Pansorbin (1:100 000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), una mezcla de citoquinas combinada con PMA de acuerdo con el documento WO2018/122147 en concentraciones adaptadas y células de timoma murino EL-4-B5 irradiadas con rayos
 - 25 gamma (5×10^4 /pocillo) durante 12 días a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ en la incubadora. Los sobrenadantes del cultivo de linfocitos B se retiraron para el cribado y las células restantes se cosecharon de inmediato y se congelaron a -80 °C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

- Amplificación por PCR de los dominios V de rata: El ARN total se preparó a partir de
- 30 lisado de linfocitos B (resuspendido en tampón RLT - Qiagen - Cat. N° 79216) usando el kit de ARN NucleoSpin 8/96 (Macherey&Nagel; 740709.4, 740698) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN se eluyó con 60 µl de agua libre de ARNasa. Se utilizaron 6 µl de ARN para generar ADNc mediante una reacción de retrotranscriptasa usando la supermezcla Superscript III First-Strand Synthesis (Invitrogen 18080-400) y
 - 35 un cebador de oligo-dT de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las

etapas se realizaron en un sistema Hamilton ML Star. Se utilizaron 4 µl de ADNc para amplificar las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (VH y VL) con la supermezcla AccuPrime (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 µl usando una mezcla de cebadores directos consistentes en

5 WTRat.VH.FW11 a WTRat.VH. FW17 (SEQ ID NO:271 a 277) con 682.rev do (SEQ ID NO:278) como cebador inverso para amplificar los dominios VH y WTRat.VK.FW1 (SEQ ID NO:279) y WTRat.VK.FW2 (SEQ ID NO:280) con WTRat.CKappa.Do2 (SEQ ID NO:281) como cebador inverso para amplificar los dominios VL. Las condiciones de PCR para la amplificación de los dominios VH fueron como sigue: Arranque en

10 caliente a 94 °C durante 4 min; 35 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 57 °C, 45 s a 68 °C y una extensión final a 68 °C durante 5 min. Las condiciones de PCR para la amplificación de los dominios VL fueron como sigue: Arranque en caliente a 94 °C durante 4 min; 35 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 56 °C, 45 s a 68 °C y una extensión final a 68 °C durante 5 min. Las reacciones de PCR positivas se limpiaron usando el kit

15 NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se eluyeron con 75 µl de tampón de elución.

1.4.4 Expresión de anticuerpos monoclonales anti-LTBR

Generación de vectores recombinantes para la expresión de anticuerpos monoclonales:

20 monoclonales: Para la expresión recombinante de anticuerpos monoclonales bivalentes de conejo, los productos de la PCR que codifican la VH o la VL se clonaron como ADNc en vectores de expresión mediante el procedimiento de clonación en saliente (RS Haun y col, Biotechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li y col, Nature Methods (2007) 4, 251-256). Los vectores de expresión contenían un casete de

25 expresión que consiste en un promotor CMV 5' que incluye el intrón A, y una secuencia de poliadenilación BGH 3'. Además del casete de expresión, los plásmidos contenían un origen de replicación derivado de pUC18 y un gen de betalactamasa que confería resistencia a la ampicilina para la amplificación del plásmido en *E. coli*. Se utilizaron tres variantes del plásmido básico: Un plásmido que contenía la región

30 constante de IgG de conejo diseñada para aceptar la región VH de conejos inmunizados con ADN, un plásmido que contenía la región constante de IgG humana con una mutación PG LALA diseñada para aceptar las regiones VH de conejos inmunizados con proteínas y un plásmido que contenía la región constante LC kappa humana para aceptar las regiones VL.

Los plásmidos de expresión linealizados que codifican la región constante kappa o gamma y los insertos VL /VH se amplificaron mediante PCR usando cebadores superpuestos. Los productos de PCR purificados se incubaron con la ADN-polimerasa T4, que generó salientes de una sola hebra. La reacción se detuvo mediante la adición de dCTP. En la siguiente etapa, el plásmido y el inserto se combinaron y se incubaron con recA, que indujo la recombinación específica del sitio. Los plásmidos recombinados se transformaron en *E. coli*. Al día siguiente, se recogieron las colonias crecidas y se sometió a prueba si el plásmido recombinado era el correcto mediante la preparación del plásmido y la secuenciación del ADN. Por el contrario de los plásmidos que codifican las secuencias de anticuerpos de conejo, los genes de las secuencias de anticuerpos de rata se han sintetizado en TWIST Bioscience.

Para la expresión de los anticuerpos, los plásmidos HC y LC aislados se co-transfectaron de forma transitoria en células HEK293 y los sobrenadantes se cosecharon después de 1 semana.

15 Expresión transitoria de las IgG: Los anticuerpos se produjeron en células Expi293F transfectadas de forma transitoria (línea celular de riñón embrionario humano derivada de 293) cultivadas en medio Expi293 (Invitrogen Corp.). Para la transfección, se utilizó el reactivo de transfección ExpiFectamine 293 a base de lípidos (Invitrogen Corp). Los anticuerpos se expresaron a partir de plásmidos de expresión individuales para las cadenas ligeras y pesadas de IgG. Las transfecciones se ejecutaron de la manera especificada en las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de cultivos celulares que contenían la proteína recombinante se cosecharon seis días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a temperatura reducida (por ejemplo, -80 °C) hasta la purificación. Se proporciona información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas en, por ejemplo, células HEK293 en: Meissner, P. y col, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203. Las IgG resultantes de la inmunización de conejos que se seleccionaron para su posterior caracterización fueron P1AE9452, P1AE9450, P1AE9459, P1AF0080, P1AF0079 y P1AE9457, así como P1AE5929 a partir de presentación en fagos. La IgG resultante de la inmunización de ratas que se seleccionó para su posterior caracterización fue P1AF0064.

1.5 Unión de anticuerpos IgG a LTBR humano, de cynomolgus y murino medida por ELISA

Las placas recubiertas de estreptavidina Nunc (MicroCoat #11974998001) se recubrieron con 25 µl/pocillo de dominio extracelular LTBR humano, murino o de

- cynomolgus (P1AE2401, P1AE2655 y P1AE2656, respectivamente) fusionado a un fragmento Fc de IgG1 humana a una concentración de 125ng/ml y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de lavar 3x90 µl/pocillo con tampón PBST (10x PBS, Roche #11666789001 + Tween 20 al 0,1 %), se añadieron 25 µl de anticuerpos anti-LTBR en diluciones 1:3 empezando por una concentración de 15 µg/ml y se incubaron 1 h a TA. Después del lavado (3x90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25µl/pocillo de anti kappa hu POD (Millipore, AP502P, 1:2000) y se incubaron a TA durante 1 h. Después del lavado (6x90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato TMB (Roche, 11835033001). La medición se realizó a 370/492 nm.
- La unión bivalente de las IgG anti-LTBR al dominio extracelular de LTBR humano, de cynomolgus y murino se sometió a prueba mediante ELISA directo. Todas las IgG muestran una fuerte unión al LTBR humano con una CE₅₀ en el intervalo de 3 pM - 3 nM. La unión a LTBR de cynomolgus es comparable para la mayoría de las IgG. Las excepciones son P1AE9452 (unión ~2 veces más fuerte a LTBR de cynomolgus), P1AF0079 (unión ~1,7 veces más fuerte a LTBR de cynomolgus) y no se observó ninguna unión a LTBR de cynomolgus para P1AE1873, es decir, CBE11. La unión a LTBR de ratón se detecta para P1AE9459, P1AF0080, P1AF0064 y P1AE5929, todos con una unión comparable a LTBR humano.
- La **Tabla 4** resume la unión por ELISA de las IgG anti-LTBR a LTBR humano, de cynomolgus y de ratón. Por el contrario a P1AE1873 (CBE11), todas las IgG reaccionan de forma cruzada con LTBR de cynomolgus y un subconjunto también reacciona de forma cruzada con LTBR de ratón.

25

Tabla 4: Unión de IgG anti-LTBR a LTBR humano, de cynomolgus y de ratón.

ID muestra	DEC LTBR humano		DEC LTBR cynomolgus		DEC LTBR murino	
	CE ₅₀ rel (nM)	unión máxima (DO)	CE ₅₀ rel (nM)	unión máxima (DO)	CE ₅₀ rel (nM)	unión máxima (DO)
P1AE9452 ¹	0,238	3,2998	0,1299	3,4837		0,3956
P1AE9450 ²	3,8008	2,7733	4,0175	3,1757		0,2347
P1AE9459 ³	0,0600	3,0003	0,0367	3,5118	0,0497	2,9969
P1AF0080 ⁴	0,0885	2,8776	0,0937	3,2141	0,0715	3,0746
P1AF0064	0,0620	3,0795	0,0339	3,3973	0,0649	3,0542
P1AF0079	0,1396	2,9868	0,3084	2,9696		0,0971

P1AE9457	0,1345	2,7515	0,1397	3,234		0,167
P1AE5929	0,0864	3,1347	0,0624	3,7559	0,1005	2,8561
P1AE1873	0,0028	3,2104		0,1258		0,1118

¹⁻⁴indica anticuerpos anti-LTBR que forman parte de anticuerpos biespecíficos en la **Tabla 12.**

5 1.6 ELISA que mide la competencia de ligandos para las IgG anti-LTBR con la linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ humana y LIGHT humana

Las placas recubiertas de estreptavidina Nunc (MicroCoat #11974998001) se recubrieron con 25 μ l/pocillo de dominio extracelular de LTBR humano biotinilado (P1AE2401) fusionado a un fragmento Fc de IgG1 humana a una concentración de 125 ng/ml (500 ng/ml para la interacción LIGHT) durante la noche a 4°C. Después del lavado 3x90 μ l/pocillo con tampón PBST (10x PBS, Roche #11666789001 + Tween 20 al 0,1 %), se añadieron 25 μ l de anticuerpos anti-LTBR en diluciones 1:3 empezando por una concentración de 15 μ g/ml y se incubaron 1 h a TA. Después del lavado 3x90 μ l/pocillo con tampón PBST (10x PBS, Roche #11666789001 + Tween 20 al 0,1 %), se añadieron 25 μ l de ligando (linfotoxina humana $\alpha 1\beta 2$ (P1AE1235) o LIGHT humana etiquetada con His6 (R&D systems, 664-Li) a una concentración de 250 ng/ml y 1000 ng/ml para LIGHT y se incubaron 1 h a TA. Después del lavado (3x90 μ l/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 μ l/pocillo de anti His6-POD (Bethyl # A190-114P, 1:10 000) y se incubaron a TA durante 1 h. Después del lavado (6x 90 μ l/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25 μ l/pocillo de sustrato TMB (Roche, 11835033001). La medición se realizó a 370/492 nm.

La inhibición de la interacción proteína-proteína entre el LTBR humano y los ligandos humanos linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ y LIGHT se sometió a prueba en un ensayo ELISA de varias etapas. Las siguientes IgG anti-LTBR muestran una fuerte inhibición de la interacción LTBR-linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ con valores de CI_{50} entre ~20 pM y ~0,9 nM: P1AE9452, P1AE9459, P1AF0064, P1AF0079, P1AE5929 y P1AE1873. P1AE9450 y P1AE9457 muestran una inhibición detectable pero más débil de la interacción (no se calculó CI_{50} , véase la **Figura 4**). P1AF0080 muestra un incremento de la señal del ensayo con concentraciones crecientes, lo que indica una estabilización de la interacción LTBR-linfotoxina $\alpha 1\beta 2$. La **Tabla 5** enumera los valores relativos de CI_{50} (nM), así como las DO superiores e inferiores.

Tabla 5: Inhibición de las interacciones LTBR-linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ y LTBR-LIGHT por las IgG anti-LTBR

ID muestra	interacción linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ humana			interacción LIGHT humana		
	Cl ₅₀ rel (nM)	rel. ajuste superior (DO)	rel. ajuste inferior (DO)	Cl ₅₀ rel (nM)	rel. ajuste superior (DO)	rel. ajuste inferior (DO)
P1AE9452 ¹	0,4741	1,4	0,5		1,2	0,9
P1AE9450 ²			0,5			0,4
P1AE9459 ³	0,1145	1,5	0,1		1,3	0,4
P1AF0080 ⁴	0,9371	2,56	1,6	0,8857	1,2	0,8
P1AF0064	0,0815	1,7	0,1	0,6711	1,3	0,1
P1AF0079	0,4828	1,6	0,3	1,6063	1,3	0,3
P1AE9457		1,4	1,0	0,3672	1,30	0,9
P1AE5929	0,0770	1,7	0,1	0,8415	1,3	0,1
P1AE1873	0,0160	1,5	0,4	0,0597	1,2	0,1

¹⁻⁴indica anticuerpos anti-LTBR que forman parte de anticuerpos biespecíficos en la **Tabla 13.**

La interacción LTBR-LIGHT se sometió a prueba en un ensayo ELISA similar de varios etapas. Todas las IgG anti-LTbR sometidas a prueba muestran una inhibición detectable de la interacción, en general con valores de Cl₅₀ mayores en comparación con la inhibición de la LTBR-linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ con el mismo compuesto (**véase la Figura 5**). P1AF0080 muestra una inhibición detectable de la interacción LTBR-LIGHT por el contrario a la interacción LTBR-linfotóxina $\alpha 1\beta 2$, que el compuesto parece estabilizar.

1.7 Ensayo reportero HeLa NF κ B luc

Para identificar anticuerpos agonistas anti-LTBR, se utilizaron células reporteras HeLa NF κ B para detectar la activación de NF κ B, que se encuentra corriente abajo de muchos receptores, incluyendo TNFR y LTBR, ambos expresados endógenamente por las células HeLa. Las células reporteras HeLa NF κ B luciferasa se cultivaron en DMEM Gibco 42430 + Glutamax al 1 % + FBS al 10 % + P/S al 1 % + 100 μ g/mL de higromicina B. Se incubaron con anticuerpos IgG anti-LTBR en una serie de titulación que comenzaba en 15 μ g/ml durante 6 h y se utilizó el kit de detección de luciferasa (ONE-glow, Promega, E6110) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se detectó como medida de la actividad de NF κ B usando un lector Spectra Max (Molecular Devices). Como control positivo se utilizó el anticuerpo IgG CBE11 (P1AE1873). Los anticuerpos se sometieron a prueba en ausencia o en presencia de un anticuerpo de reticulación anti-Fc humano (Fab anti-Fc humano

caprino (Jackson immunoresearch 109-006-008)) usado a una concentración fija de 88 µg/ml.

En detalle, se sembraron 25 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, de fondo plano, con tratamiento de cultivo de tejidos, en medio completo de HeLa el día 1.

- 5 El día 2, se retiró el medio y se añadieron los anticuerpos IgG anti-LTBR (+/- anticuerpo de reticulación) en 100 µl de medio completo y se incubaron durante 6 h. Las placas se retiraron de la incubadora y se equilibraron a TA, como se hizo con el reactivo ONE-glow. Se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo ONE-glow y las soluciones de prueba se transfirieron a una placa blanca antes de leer la luminiscencia usando un
- 10 lector de placas Spectra Max (Molecular Devices). Los resultados se han representado en la **Figura 6** y los datos se resumen en la

Tabla 6.

Tabla 6: Datos del ensayo reportero HeLa NFκB luc para las IgG anti-LTBR con y sin reticulación

C [ng/ml]	15 000	3750	937,5	234,4	58,59	14,64	3,66	0,91
CBE11 sin x conector	25 901	30 977	27 885	29 034	29 317	26 626	20 642	18 570
CBE11 con x conector	68 553	69 859	67 201	67 656	63 207	56 572	50 895	38 962
P1AE9452 sin x conector	17 504	17 252	15 683	13 938	10 694	10 179	10 083	9332
P1AE9452 con x conector	25 358	28 296	30 272	28 120	24 179	23 085	20 849	16 928
P1AE9450 sin x conector	19 101	17 297	17 911	18 126	16 888	14 741	14 400	14 135
P1AE9450 con x conector	23 835	28 860	30 148	30 492	24 133	24 593	20 089	16 643
P1AE9459 sin x conector	27 720	25 156	24 148	23 522	24 689	25 919	19 887	17 664
P1AE9459 con x conector	50 329	45 112	41 638	40 741	33 930	30 540	24 921	21 385
P1AF0080 sin x conector	17 813	18 480	18 060	18 288	16 663	15 484	16 580	14 018
P1AF0080 con x conector	45 046	47 133	38 220	34 097	32 263	30 047	25 184	19 864
P1AF0064 sin x conector	25 975	25 543	24 517	26 942	24 355	23 562	22 036	17 825
P1AF0064 con x conector	57 689	53 292	54 818	53 932	46 693	43 298	38 697	33 528
P1AF0079 sin x conector	13 574	14 751	15 766	13 106	11 598	10 825	10 722	10 671
P1AF0079 con x conector	22 486	23 125	24 863	18 169	16 378	12 515	12 210	10 613
P1AE9457 sin x conector	15 640	15 286	14 923	14 796	14 054	13 207	12 283	13 195
P1AE9457 con	21 506	23 039	25 444	21 857	20 872	17 446	15 264	13 710

C [ng/ml]	15 000	3750	937,5	234,4	58,59	14,64	3,66	0,91
x conector								
P1AE5929 sin x conector	23 006	23 358	21 339	22 069	21 342	19 073	17 525	16 105
P1AE5929 con x conector	47 441	48 500	44 811	43 164	37 697	31 712	27 081	23 537

1.8 Unión celular (FACS en células CHO con LTBR humano recombinante)

La unión a LTBR humano de superficie celular se determinó mediante análisis FACS en células CHO con LTBR humano recombinante a 4°C. Las células se separaron de los matraces de cultivo celular mediante el tratamiento con acutasa y se centrifugaron a 500 g durante 5 min, seguido de resuspensión en medio de cultivo celular. A continuación, las células se transfirieron a placas PP de fondo en U y se incubaron con anticuerpos IgG anti-LTBR durante 1 hora a 4 °C en BSA/PBS al 1 %. Después de lavados adicionales, los anticuerpos anti-LTBR unidos a las células se detectaron usando anticuerpos policlonales anti-IgG humana acoplados a Alexa Fluor 488 (anticuerpo secundario F(ab')₂-anti-Fc IgG humana caprina, Alexa Fluor 488, Cat No. 10120, Life Technologies). La fluorescencia unida a las células se midió en un analizador celular BD FACSCanto™ II usando los ajustes de filtro adecuados. Los resultados se representan en la **Figura 7** como mediana de los valores de fluorescencia y los datos se resumen en la **Tabla 7**. Las IgG anti-LTBR se utilizaron en una titulación con etapas de dilución de 3 veces comenzando a 20 µg/ml.

Tabla 7: Evaluación de la unión a LTBR de la superficie celular para las IgG anti-LTBR (representando la mediana de la intensidad de fluorescencia)

C [µg/ml]	CBE11	P1AE9459	P1AF0080	P1AF0079	P1AE9457	P1AE5929
20	49 925	62 004	106 578	63 573	87 016	51 024
6,6	50 905	81 630	67 392	54 718	102 798	60 490
2,2	40 762	86 534	50 343	64 284	101 098	56 505
0,73	27 172	83 465	55 483	55 329	80 728	32 800
0,24	11 809	43 572	33 559	22 809	27 937	30 450
0,08	6517	22 000	17 181	9044	18 163	16 535
0,03	6233	6756	8969	8275	7162	14 926
0,01	3964	3749	5425	3383	3383	10 483
0,003	2345	1319	5440	1503	2444	9034
0,001	1025	1323	4064	853	2075	7095
0,0003	1323	1334	1816	689	1145	4811
0,0001	1086	841	1013	710	1262	4821
CE50 [µg/ml]	0,682	0,147	0,672	0,321	0,336	0,206

1.9 Agrupamiento por epítopos de los anticuerpos IgG anti-LTBR

Los agrupamientos de epítomos de los anticuerpos IgG anti-LTBR se caracterizaron mediante un análisis de unión competitiva usando interferometría de bicapa (BLI) en un sistema Octet (Molecular Devices LLC, USA). En resumen, la fusión Fc DEC LTBR humano monomérico (S28-M227) avi biotinilado (P1AE2835) se capturó en sensores de estreptavidina a una concentración de 1 µg/ml en tampón HBSP. En una primera etapa, se midió la unión directa de los anticuerpos al antígeno capturado y se determinó la señal de asociación para cada anticuerpo ("unión directa por asociación"). Sólo se seleccionaron como anticuerpos primarios los aglutinantes estables con bajas velocidades de disociación. En una segunda etapa, se analizó la unión competitiva de los anticuerpos IgG anti-LTBR contra el mismo conjunto de anticuerpos IgG anti-LTBR "primarios". En resumen, el DEC LTBR humano biotinilado a una concentración de 1 µg/ml en tampón HBSP se capturó en sensores de estreptavidina seguido de un breve lavado por inmersión. El anticuerpo primario se unió al antígeno a una concentración de 10 µg/ml en tampón HBSP para saturar y bloquear su epítomo de unión ("anticuerpo de asociación 1"). En una etapa posterior, se analizó la unión del segundo anticuerpo (10 µg/ml, en tampón HBSP) al complejo antígeno/anticuerpo primario ("anticuerpo de asociación 2"). Se obtuvo un valor de unión relativo para la unión del segundo anticuerpo dividiendo la señal de unión (punto de informe a 120 s de la etapa "anticuerpo de asociación 2") del segundo anticuerpo por la señal de unión (punto de informe a 120 s de la etapa "unión directa por asociación") de la unión directa. Los anticuerpos evaluados se agruparon en diversos agrupamientos de epítomos usando los valores de unión relativos y una herramienta interna de agrupación que utiliza diversos algoritmos de agrupación (por ejemplo, UPGMA, WPGMA o el procedimiento de Ward). El mapa de calor de agrupamientos de epítomos resultante se representa en la **Figura 8** con los respectivos valores de unión en porcentaje mostrados en la **Tabla 8**. Los datos de 8 IgG anti-LTBR seleccionadas sometidos al agrupamiento de epítomos dieron como resultado la asignación a cuatro agrupamientos de epítomos diferentes 1, 3, 4 y 5 (véase la **Tabla 9**). P1AE9452 se encuentra en el mismo grupo de epítomos 1 que CBE11 (P1AE1873).

Tabla 8: Unión de anticuerpos secundarios en porcentaje según se representa en la matriz de agrupamiento de epítomos de los anticuerpos IgG anti-LTBR

anticuerpo primario	anticuerpo secundario							
	P1AE1 873	P1AE9 452	P1AE5 929	P1AF0 064	P1AE9 457	P1AE9 459	P1AF0 080	P1AF 0079
P1AE1873	2,13	93,02	94,15	100,00	91,19	71,29	100,00	6,47

P1AE9452	81,52	4,28	82,05	99,93	69,73	67,30	100,00	6,41
P1AE9457	88,15	96,74	93,33	100,00	5,80	5,86	35,63	5,57
P1AF0080	79,63	97,07	89,55	2,25	1,87	1,83	14,66	1,22
P1AE5929	83,96	93,77	2,70	3,13	100,00	58,06	100,00	3,72
P1AF0079	83,78	96,42	7,72	8,15	88,26	8,76	47,53	3,64
P1AF0064	93,72	100,00	3,88	2,44	94,12	2,83	15,91	3,00

Tabla 9: Agrupamiento por epítomos de los anticuerpos IgG anti-LTBR

IgG anti-LTBR	Agrupamiento de epítomos
P1AE1873	1
P1AE5929	4
P1AE9452	1
P1AE9457	5
P1AE9459	5
P1AF0064	4
P1AF0079	3
P1AF0080	5

1.10 Caracterización por SPR de los anticuerpos IgG anti-LTBR

Cinética de unión a LTBR humano, de cynomolgus y murino: La unión de las IgG anti-

- 5 LTbR a LTBR humano, de cynomolgus y murino se investigó mediante resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento Biacore T200 o Biacore 8K (Cytiva). Todos los experimentos se ejecutaron a 25 °C usando HBS-P (Cytiva #BR-1006-71) como tampón de migración y dilución. Se inmovilizó un anticuerpo específico anti-IgG humana PG LALA en un chip sensor CM5 de la serie S (GE Healthcare #29104988)
- 10 usando la química estándar de acoplamiento de aminos. Las IgG anti-LTBR se capturaron en la superficie llevando a niveles de captura entre 10 y 100 RU. Se inyectaron LTBR humano, de cynomolgus o murino (P1AE7979, P1AE4411 o P1AE4410, respectivamente) durante 120 s con concentraciones de 3,7 a 300 nM (serie de dilución 1:3) en la superficie (fase de asociación) a un caudal de 30 µl/min. La
- 15 fase de disociación se monitoreó durante 600 s mediante un lavado con tampón de migración. La superficie se regeneró mediante la inyección de NaOH 10 mM durante 60 s a un caudal de 5 µl/min. Las diferencias totales del índice de refracción se corrigieron mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie de referencia. Las inyecciones en blanco también se sustrajeron (doble referencia). Los
- 20 sensogramas registrados se ajustaron a un modelo de unión Langmuir 1:1 usando el programa informático BIAevaluation. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, así como las afinidades respectivas (constante de disociación de equilibrio KD) se han resumido en la **Tabla 10** a continuación.

Tabla 10: Cinética de unión de anticuerpos IgG anti-LTBR a LTBR humano, de cynomolgus y murino determinada mediante ELISA

IgG anti-LTBR	antígeno	Ka (1/ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	T1/2 (min)
P1AE9452	LTBR hu	1,73E+05	5,26E-05	0,3	220
	LTBR cyno	1,60E+05	5,92E-05	0,4	195
	LTBR mu	ninguna/ unión muy débil			
P1AE9450	LTBR hu	baja actividad/ninguna unión 1:1			
	LTBR cyno	baja actividad/ninguna unión 1:1			
	LTBR mu	sin unión			
P1AE9459	LTBR hu	7,95E+05	2,17E-04	0,3	53
	LTBR cyno	6,41E+05	1,91E-04	0,3	61
	LTBR mu	7,48E+05	7,95E-03	10,6	1
P1AF0080	LTBR hu	6,46E+05	1,94E-03	3,0	6
	LTBR cyno	5,31E+05	1,88E-03	3,5	6
	LTBR mu	6,33E+05	1,88E-02	29,7	1
P1AF0064	LTBR hu	1,45E+06	6,75E-05	0,05	171
	LTBR cyno	1,19E+06	5,19E-05	0,04	223
	LTBR mu	8,84E+05	3,67E-02	41,6	0,3
P1AF0079	LTBR hu	7,94E+04	2,49E-03	31	5
	LTBR cyno	6,76E+04	2,47E-03	37	5
	LTBR mu	sin unión			
P1AE9457	LTBR hu	6,85E+04	6,36E-04	9	18
	LTBR cyno	6,79E+04	6,51E-04	10	18
	LTBR mu	sin unión			
P1AE5929	LTBR hu	2,55E+05	5,22E-04	2	22
	LTBR cyno	1,87E+05	5,97E-04	3	19
	LTBR mu	3,82E+04	2,96E-03	77	19
P1AF7213	LTBR hu	2,99E+05	1,76E-03	5,9	7
	LTBR cyno	2,42E+05	2,03E-03	8,4	6
	LTBR mu	4,98E+04	7,39E-03	148,3	2
P1AE1873 (CBE11)	LTBR hu	4,89E+06	5,43E-03	1	2
	LTBR cyno	sin unión			
	LTBR mu	sin unión			

1.11 Reducción de la hidrofobia del anticuerpo anti-LTBR P1AE5929

- 5 Como la IgG anti-LTBR P1AE5929 presentó cierto grado de hidrofobia, se intentó generar una variante más hidrófila del mismo. Por tanto, se generó un modelo 3D de los dominios V en P1AE5929 y se analizó la superficie en busca de parches hidrófobos. Uno de dichos parches se identificó claramente en la punta de la CDR2 del dominio VH, centrado alrededor de una isoleucina representada en negrita: IPIFG
- 10 (SEQ ID NO:266). Como algunos residuos hidrófobos en este bucle podrían ser esenciales para la unión al antígeno, se consideró esencial una sustitución conservadora y se introdujo una mutación de fenilalanina (F) a histidina (H) para conservar la fracción aromática pero siendo más polar con una histidina en

comparación con una fenilalanina. Esta mutación resolvió el parche hidrófobo mediante la introducción de una histidina expuesta en la vecindad de dos isoleucinas y dio como resultado el anticuerpo anti-LTBR P1AF7213 con hidrofobia reparada. La hidrofobia aparente de P1AE5929, evaluada mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), pudo reducirse de 0,733 a 0,321 (tiempo de retención relativo en comparación con los estándares de hidrofobia) y el tiempo de retención real disminuyó de 41,1 min a 29,7 min en un gradiente HIC de 55 min para P1AF7213, conservando al mismo tiempo afinidades comparables a LTBR humano, de cynomolgus y murino.

Ejemplo 2

10 Generación de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

2.1 Generación y producción de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

Después de la generación y caracterización de las IgG mono-específicas anti-LTBR (**Figura 9A**), se han convertido varias IgG agonistas preferentes anti-LTBR en anticuerpos biespecíficos dirigidos al estroma tumoral (es decir, dirigidos a FAP) 1+1 (monovalentes para LTBR) y 2+1 (bivalentes para LTBR). La generación y preparación del clon 4B9 anti-FAP se divulga en el documento WO 2012/020006 A2, que se incorpora en el presente documento como referencia.

Las ilustraciones esquemáticas de las diferentes estructuras de anticuerpos biespecíficos realizadas se muestran en las **Figuras 9B a 9E** así como en las **Figuras 37B a 37E**. La Tabla 11 resume los identificadores de las IgG anti-LTBR así como los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR 1+1 y 2+1 que se han generado sobre la base de las secuencias del dominio V de las respectivas IgG y sus derivados biespecíficos resultantes.

25 **Tabla 11: Identificadores de los anticuerpos anti-LTBR y sus derivados biespecíficos resultantes**

identificador IgG	identificador anticuerpo biespecífico 1+1	identificador anticuerpo biespecífico 2+1
P1AE1873 (CBE11)	P1AG1326	P1AE1079
P1AH0119 (BHA10)	P1AH5884	P1AH5885
P1AF5929	P1AF0532	-
P1AF7213	P1AF9728 (P1AG7504)	P1AG5684, P1AG7576, P1AG7509
P1AE9450	P1AF0535 (P1AG7506)	P1AF0544, P1AG7511
P1AE9452	P1AF0534 (P1AG7505)	P1AF9729 (P1AG7510)
P1AE9457	P1AF5257	-
P1AE9459	P1AF0537 (P1AG7507), P1AG0694	P1AF0546, P1AG7512, P1AH5886

P1AF0064	P1AF9727	-
P1AF0079	P1AF5260	
P1AF0080	P1AF5261 (P1AG7508)	P1AG7513, P1AG5683, P1AG7575

Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se construyeron como IgG con Fc con botones en ojal con la tecnología CrossMab. Esto significa que para la generación de anticuerpos biespecíficos no simétricos, las subunidades del dominio Fc

5 contenían las mutaciones "botón" u "ojal" para evitar el emparejamiento erróneo de las cadenas pesadas. Para evitar el emparejamiento erróneo de las cadenas ligeras en los anticuerpos biespecíficos, se introdujo el intercambio de dominios VH/VL o CH1/Ckappa en un resto de unión (tecnología CrossFab). Para P1AF9727, P1AF9728, P1AF9729 y P1AG0694, se cruzaron los dominios CH1 y Ckappa del brazo Fab con

10 especificidad para FAP. Para P1AG1326, P1AF0532, P1AF0534, P1AF5257, P1AF5260, P1AF0535, P1AF0537, P1AF5261, P1AH5884, P1AH5885 y P1AH5886, se cruzaron los dominios VH y VL del brazo Fab con especificidad para LTBR y los dominios CH1 y Ckappa del brazo Fab con especificidad para FAP se equiparon con cargas complementarias, dos glutamatos cargados negativamente en CH1 y una

15 arginina y una lisina cargadas positivamente en Ckappa. Se introdujeron mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala (PG-LALA) en la región constante de las cadenas pesadas de IgG1 humana para anular la unión a los receptores de Fc gamma.

Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se expresaron en células Expi293 (HEK) en Roche (P1AG1326, P1AF9728, P1AF0534, P1AF0535, P1AF0537,

20 P1AF9727 y P1AE107) o en células CHO K1 en evitria (P1AF9729 y P1AF5261). Todos los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se purificaron en Roche usando un procedimiento combinado de cromatografía de afinidad con (proteína A (MabSelect™ SuRe™, Cytiva) y cromatografía de intercambio catiónico (POROS™ XS), seguido de una cromatografía de exclusión por tamaño preparativa (HiLoad®

25 16/600 Superdex® S200, Cytiva). La pureza de los anticuerpos biespecíficos purificados se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (por ejemplo, TSK G3000 SWXL) y CE-SDS (por ejemplo, Caliper LabChip GXII). Las identidades de los anticuerpos biespecíficos se confirmaron mediante LC-MS al detectar las masas teóricas de los anticuerpos reducidos y no reducidos. Se

30 determinaron los niveles de endotoxina y todos fueron inferiores a 0,33 EU/mg. Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR P1AH5884, P1AH5885 y P1AH5886 se produjeron en WuXi Biologics en CHO y se purificaron mediante cromatografía de

afinidad con proteína A MabSelectSuRe LX, cromatografía de intercambio catiónico HiTrap SP HP y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200.

2.2 Unión de anticuerpos anti-FAP/anti-LTBR a LTBR humano, de cynomolgus y murino medida mediante ELISA

- 5 Las placas recubiertas de estreptavidina Nunc (MicroCoat #11974998001) se recubrieron con 25 µl/pocillo de dominio extracelular de LTBR humano, murino o de cynomolgus (P1AE2401, P1AE2655 y P1AE2656, respectivamente) fusionado a un fragmento Fc de IgG1 humana a una concentración de 125 ng/ml y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar 3x90 µl/pocillo con tampón PBST (10x
- 10 PBS, Roche #11666789001 + Tween 20 al 0,1 %), se añadieron 25 µl de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR en diluciones 1:3 empezando por una concentración de 15 µg/ml y se incubaron 1 h a TA. Después del lavado (3x90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 µl/pocillo de anti kappa hu POD (Millipore, AP502P, 1:2000) y se incubaron a TA durante 1 h. Después del lavado (6x 90 µl/pocillo con tampón
- 15 PBST) se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato TMB (Roche, 11835033001). Las mediciones se realizaron a 370/492 nm.

- La unión de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR (unión monovalente para FAP y LTBR, excepto para P1AF9729 que es monovalente para FAP y bivalente para LTBR) al dominio extracelular de LTBR humano, de cynomolgus y murino se sometió a
- 20 prueba mediante ELISA directo (**Tabla 12**). Todos los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR muestran una fuerte unión monovalente a LTBR humano con valores de CE_{50} en el intervalo de 100 pM - 1,5 nM. P1AF9729, que es bivalente para LTBR, se une con una CE_{50} de ~50 pM. La unión a LTBR humano, de cynomolgus y murino de estos anticuerpos biespecíficos es comparable a la unión de las IgG
 - 25 monoespecíficas (véase la **Tabla 4**) que contienen el mismo aglutinante de LTBR (indicado por los ¹⁻⁴ en la **Tabla 12**). Al igual que sus predecesores IgG, todos los anticuerpos biespecíficos tienen reacción cruzada con LTBR de cynomolgus y un subconjunto también tiene reacción cruzada con LTBR murino. Las IgG bivalentes para LTBR (véase la **Tabla 4**) no muestran un cambio en general hacia valores de
 - 30 CE_{50} menores cuando se comparan con sus homólogos monovalentes para LTBR en la **Tabla 12**. Por tanto, para las IgG bivalentes, no es evidente la unión por avidéz en este ensayo. Por el contrario, P1AF9729 comprende el mismo agonista anti-LTBR que P1AF0534 pero con un fragmento Fab de unión a LTBR adicional, por lo que el cambio a una CE_{50} menor se debe probablemente a la avidéz.

Tabla 12: Unión por ELISA de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR a LTBR humano, de cynomolgus y murino

ID muestra	DEC LTBR humano		DEC LTBR cynomolgus		DEC LTBR murino	
	CE ₅₀ rel (nM)	unión máxima (DO)	CE ₅₀ rel (nM)	unión máxima (DO)	CE ₅₀ rel (nM)	unión máxima (DO)
P1AF9728	0,1340	3,4275	0,2011	3,435	4,1998	2,7609
P1AF0534 ¹	0,1031	3,297	0,1011	3,5524		2,1379
P1AF0535 ²	1,4189	3,0459	1,3617	3,1665		0,3013
P1AF0537 ³	0,0940	3,2212	0,1154	3,6737	0,3589	3,7791
P1AF5261 ⁴	0,1826	3,1277	0,1836	3,4246	0,3158	3,097
P1AF9727	0,1329	3,7425	0,0788	3,7563		3,207
P1AF9729 ¹	0,0457	3,6227	0,0233	3,7498	3,3701	3,1997

¹⁻⁴ se refiere a IgG anti-LTBR en la **Tabla 4**.

5 2.3 ELISA que mide la competencia de ligandos para los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR con la linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ humana y LIGHT humana

Las placas recubiertas de estreptavidina Nunc (MicroCoat #11974998001) se recubrieron con 25 μ l/pocillo de dominio extracelular de LTBR humano biotinilado (P1AE2401) fusionado a un fragmento Fc de IgG1 humana a una concentración de 125 ng/ml (500 ng/ml para interacción LIGHT) durante la noche a 4 °C. Después del lavado 3x90 μ l/pocillo con tampón PBST (10x PBS, Roche #11666789001 + Tween 20 al 0,1 %), se añadieron 25 μ l de anticuerpos anti-FAP/anti-LTBR en diluciones 1:3 empezando por una concentración de 15 μ g/ml y se incubaron 1 h a TA. Después del lavado con 3x90 μ l/pocillo de tampón PBST (10x PBS, Roche #11666789001 + Tween 20 al 0,1 %), se añadieron 25 μ l de ligando (linfotoxina humana $\alpha 1\beta 2$ (P1AE1235) o LIGHT humana etiquetada con His6 (R&D systems, 664-Li) a una concentración de 250 ng/ml para linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ y 1000 ng/ml para LIGHT y se incubaron 1 h a TA. Después del lavado (3x 90 μ l/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 μ l/pocillo de anti His6-POD (Bethyl # A190-114P, 1:10 000) y se incubaron a TA durante 1 h. Después del lavado (6x 90 μ l/pocillo con tampón PBST) se añadieron 25 μ l/pocillo de sustrato TMB (Roche, 11835033001). Las mediciones se realizaron a 370/492 nm y se resumen en la **Tabla 13**. Se enumeran los valores relativos de Cl₅₀ (nM), así como las DO superiores e inferiores.

Tabla 13: Inhibición de las interacciones LTBR-linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ y LTBR-LIGHT por anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

ID muestra	interacción linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ humana			interacción LIGHT humana		
	Cl ₅₀ rel (nM)	rel. ajuste superior (DO)	rel. ajuste inferior (DO)	Cl ₅₀ rel (nM)	rel. ajuste superior (DO)	rel. ajuste inferior (DO)
P1AF9728	0,2455	1,7	0,9	3,4803	1,5	0,9
P1AF0534 ¹		1,7	1,3			1,4
P1AF0535 ²						
P1AF0537 ³	0,5332	1,6	0,4		1,4	1,2
P1AF5261 ⁴	0,8733	2,56	1,7			1,4
P1AF9727	0,1375	1,7	0,1		1,5	0,2
P1AF9729 ¹	0,1404	1,6	0,6		1,4	1,4

¹⁻⁴ se refiere a IgG anti-LTBR en la **Tabla 5**.

- 5 La inhibición de la interacción proteína-proteína entre el LTBR humano y los ligandos humanos linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ y LIGHT se sometió a prueba en un ensayo ELISA de varias etapas. Los siguientes anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR muestran una inhibición de la interacción LTBR-linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ con valores de Cl₅₀ entre ~140 pM y ~0,8 nM: P1AF9728, P1AF0537, P1AF9727 y P1AF9729. P1AF0534 y P1AF0535
- 10 muestran una inhibición más débil o nula de la interacción (**Figura 10**). P1AF5261 (que comprende el anticuerpo anti-LTBR de P1AF0080) muestra un incremento de la señal del ensayo con concentraciones crecientes de nuevo, como ya se detectó para este anticuerpo anti-LTBR en el formato IgG bivalente.

- La interacción LTBR-LIGHT también puede ser inhibida por los anticuerpos
- 15 biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR en este ensayo bioquímico, aunque en menor medida que la interacción LTBR-linfotoxina $\alpha 1\beta 2$. Mientras que P1AF9727 y P1AF9728 muestran una inhibición significativa, sólo se detectó una débil inhibición a concentraciones mayores de anticuerpo para P1AF0535 y no se detectó ninguna inhibición para P1AF9729 y para P1AF0537. P1AF5261 muestra un débil incremento
- 20 de la señal a concentraciones más altas de anticuerpo por el contrario al comportamiento de la IgG bivalente P1AF0080. P1AF0534 también muestra un incremento de la señal a concentraciones mayores (**Figura 11**).

2.4 Caracterización por SPR de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

- Cinética de unión a LTBR humano, de cynomolgus y murino: La unión de anticuerpos
- 25 biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR a LTBR humano, de cynomolgus y murino se investigó mediante resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento Biacore T200 o Biacore 8K (Cytiva). Todos los experimentos se ejecutaron a 25 °C

usando HBS-P (Cytiva #BR-1006-71) como tampón de migración y dilución. Se inmovilizó un anticuerpo específico anti-IgG humana PG LALA en un chip sensor CM5 de la serie S (GE Healthcare #29104988) usando la química estándar de acoplamiento de aminas. Las anticuerpos biespecíficos se capturaron en la superficie llevando a

5 niveles de captura entre 10 y 100 RU. Se inyectaron LTBR humano, de cynomolgus o murino (P1AE7979, P1AE4411 o P1AE4410, respectivamente) durante 120 s con concentraciones de 3,7 a 300 nM (serie de dilución 1:3) en la superficie (fase de asociación) a un caudal de 30 µl/min. La fase de disociación se monitoreó durante 600 s mediante un lavado con tampón de migración. La superficie se regeneró mediante

10 inyección de NaOH 10 mM durante 60 s a un caudal de 5 µl/min. Las diferencias totales del índice de refracción se corrigieron mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie de referencia. Las inyecciones en blanco también se sustrajeron (doble referencia). Las curvas derivadas se ajustaron a un modelo de unión Langmuir 1:1 usando el programa informático BIAevaluation. Las constantes de

15 velocidad de asociación y disociación, así como las afinidades respectivas (constante de disociación de equilibrio KD) se resumen en la **Tabla 14**.

Tabla 14: Cinética de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR a LTBR humano, de cynomolgus y murino determinada mediante ELISA

anticuerpos biespecíficos anti FAP LTBR	antígeno	Ka (1/ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	T1/2 (min)
P1AF0534	LTBR hu	2,21E+05	5,18E-05	0,2	223
	LTBR cyno	1,95E+05	9,57E-05	0,5	121
	LTBR mu	ninguna/ unión muy débil			
P1AF0535	LTBR hu	baja actividad/ninguna unión 1:1			
	LTBR cyno	baja actividad/ninguna unión 1:1			
	LTBR mu	sin unión			
P1AF0537	LTBR hu	7,84E+05	2,63E-04	0,3	44
	LTBR cyno	6,67E+05	2,05E-04	0,3	56
	LTBR mu	6,46E+05	7,52E-03	12,0	2
P1AF0546	LTBR hu	9,99E+05	2,25E-04	0,2	51
P1AF5261	LTBR hu	9,22E+05	1,36E-03	1,5	8
	LTBR cyno	8,59E+05	1,27E-03	1,5	9
	LTBR mu	1,13E+06	1,62E-02	14,0	1
P1AF9727	LTBR hu	1,19E+06	1,63E-04	0,1	71
	LTBR cyno	1,11E+06	1,46E-04	0,1	79
	LTBR mu	9,25E+05	9,40E-02	102,0	0,1
P1AF9728	LTBR hu	2,51E+05	1,79E-03	7,1	6
	LTBR cyno	2,10E105	2,09E-03	9,9	6
	LTBR mu	6,86E+04	8,91E-03	130,0	1
P1AE9729	LTBR hu	2,16E+05	8,60E-05	0,4	134

anticuerpos bienespecíficos anti FAP LTBR	antígeno	Ka (1/ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	T1/2 (min)
	LTBR cyno	1,86E+05	9,89E-05	0,5	117
	LTBR mu	Ninguna/ unión muy débil			

Para los anticuerpos bienespecíficos seleccionados 1+1 y 2+1 (P1AF0534, P1AF0537, P1AF5261, y P1AF0546, P1AG5683, respectivamente), la unión monovalente (afinidad) y la unión bivalente (avidez) a LTBR humano se caracterizó además por SPR. Para medir la afinidad, los anticuerpos bienespecíficos se capturaron por un anticuerpo específico anti-IgG humana PG LALA que se había inmovilizado en un chip sensor CM3 de la serie S (GE Healthcare) usando una química de acoplamiento de aminas estándar y se utilizó LTBR humano (P1AE7979) como analito. Por el contrario, para medir la avidez de las construcciones bienespecíficas 2+1 que son bivalentes para LTBR, se capturó LTBR humano biotinilado (P1AE7979) en un chip de estreptavidina SA y se utilizaron los anticuerpos bienespecíficos como analitos. Los resultados se han resumido en la **Tabla 15A** y en la **Tabla 15B**. Se muestran las velocidades de asociación y disociación, afinidades o afinidades aparentes (de los anticuerpos bienespecíficos bivalentes para LTBR) y la semivida de los complejos anticuerpo:receptor.

Como se esperaba, para los anticuerpos bienespecíficos que son bivalentes para LTBR (P1AF0546 y P1AG5683, respectivamente), se puede observar un efecto de avidez: Para P1AF0546, la constante de velocidad de disociación k_d de $2,25E-04$ (1/s) y la afinidad de 0,2 nM, respectivamente (**Tabla 15A**), disminuye a valores fuera de las especificaciones del instrumento (**Tabla 15B**), mientras que para P1AG5683, la constante de velocidad de disociación de $1,23E-03$ k_d (1/s) y afinidad de 1,1 nM, respectivamente (**Tabla 15A**), disminuye a k_d de $4,33E-05$ (1/s) y una afinidad aparente (avidez) de 0,01 nM (**Tabla 15B**).

Tabla 15A: Cinética de unión de los anticuerpos bienespecíficos anti-FAP/anti-LTBR a LTBR humano determinada por SPR en una configuración de ensayo de "afinidad"

anticuerpos bienespecíficos anti	k_a (1/ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (min)
-------------------------------------	--------------	-------------	------------	-----------------

FAP-LTBR				
P1AF0534	2,41E+05	8,08E-05	0,3	143
P1AF0537	8,85E+05	2,20E-04	0,2	53
P1AF0546	9,99E+05	2,25E-04	0,2	51
P1AF5261	9,86E+05	1,28E-03	1,3	9
P1AG5683	1,14E+06	1,23E-03	1,1	9

Tabla 15B: Cinética de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR a LTBR humano determinada por SPR en una configuración de ensayo de "avidez"

anticuerpos biespecíficos anti FAP-LTBR	k_a (1/ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (min)
P1AF0534	3,05E+05	4,12E-05	0,1	280
P1AF0537	9,20E+05	1,15E-04	0,1	100
P1AF0546	2,03E+06	fde*	fde*	fde*
P1AF5261	2,45E+06	1,35E-03	0,6	9
P1AG5683	3,92E+06	4,33E-05	0,01	267

5 *fuera de especificación

2.5 Cinética de unión a FAP humana

La unión del dominio de unión anti-FAP de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se investigó mediante resonancia de plasmones superficiales usando un Biacore T200 (Cytiva). Se inmovilizó un anticuerpo específico anti-IgG his (Cytiva, # 28995056) en un chip sensor CM5 de la serie S (GE Healthcare #29104988) usando la química estándar de acoplamiento de aminas. Las anticuerpos se capturaron en la superficie llevando a niveles de captura entre 20 y 30 RU. Se inyectó FAP humana (P1AA5347) durante 180 s con concentraciones de 0,37 a 30 nM (serie de dilución 1:3) en la superficie (fase de asociación) a un caudal de 30 μ l/min. La fase de disociación se monitoreó durante 600 s mediante un lavado con tampón de migración. La superficie se regeneró mediante una inyección de glicina 10 mM, pH 1,5 durante 60 s a un caudal de 5 μ l/min. Las diferencias totales del índice de refracción se corrigieron mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie de referencia. Las inyecciones en blanco también se sustrajeron (doble referencia). Las curvas derivadas se ajustaron a un modelo de unión Langmuir 1:1 usando el programa informático BIAevaluation. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, así como las afinidades respectivas (constante de disociación de equilibrio K_D) se han resumido en

la **Tabla 16**. Se muestran las velocidades de asociación y disociación, las afinidades y la semivida de los complejos anticuerpo:PAF.

Tabla 16: Cinética de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR a FAP humana determinada mediante ELISA

anticuerpos biespecíficos anti FAP-LTBR	k_a (1/ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (min)
P1AF0534	2,25E+06	4,70E-04	209	25
P1AF0535	1,78E+06	4,66E-04	262	25
P1AF0537	2,09E+06	4,46E-04	213	26
P1AF5261	2,08E+06	4,73E-04	228	24
P1AF9727	2,35E+06	5,72E-04	243	20
P1AF9728	2,54E+06	5,21E-04	205	22
P1AF9729	2,05E+06	5,30E-04	259	22
P1AG0694	2,77E+06	4,81E-04	174	24

Ejemplo 3

Generación de anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos

3.1 Generación de anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

Se utilizó el agonista anti-LTBR P1AF0080, de triple reacción cruzada, humano, de cynomolgus y murino, para generar un anticuerpo sustituto murino biespecífico 1+1 y otro biespecífico 2+1 (bivalente para LTBR) para estudios in vivo en ratones. Estos anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR, P1AF4664 y P1AF4674, respectivamente, se representan en las **Figuras 12A y 12B**. Mientras que sus dominios V se mantuvieron humanos, todos los dominios constantes del anticuerpo son murinos. El Fc de IgG1 murino se heterodimerizó mediante cargas complementarias en CH3 (cadenas KK+ y DD-) y se logró silenciar las funciones efectoras de Fc mediante la introducción de mutaciones DA PG en CH2.

P1AF4664 y P1AF4674 se produjeron por Evitria usando su sistema de vector patentado con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y usando células CHO K1 adaptadas en suspensión (originalmente recibidas de ATCC y adaptadas al crecimiento libre de suero en cultivo en suspensión en Evitria). Para la producción, evitria usó sus medios patentados, libres de componentes animales y libres de suero (eviGrow y eviMake2) y su reactivo de transfección patentado (eviFect). Los sobrenadantes se cosecharon mediante centrifugación y posterior filtración (filtro

de 0,2 μ m) y las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante cosechado mediante procedimientos estándares.

En resumen, se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A (Protein A MabSelectSure) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) preparativa (HiLoad 50/600 S200) de acuerdo con procedimientos estándar y las instrucciones del fabricante. La pureza de las proteínas purificadas se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (por ejemplo, TSK G3000 SWXL) y CE-SDS (por ejemplo, Caliper LabChip GXII). Se determinaron los niveles de endotoxina y fueron $\leq 0,11$ EU/mg y 0,07 EU/mg, respectivamente.

- Se utilizó el agonista anti-LTBR P1AE9459, de triple reacción cruzada, humano, de cynomolgus y murino, para generar anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos 2+1 (bivalentes para LTBR) dirigidos a FAP o no dirigidos a FAP (DP47) para estudios *in vivo* en ratones. Estos anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR o no dirigidos/anti-LTBR, P1AG5459 y P1AG5461, respectivamente, son los representados en las **Figuras 12B y 12C**. Mientras que sus dominios V se mantuvieron humanos, todos los dominios constantes del anticuerpo son murinos. El Fc de IgG1 murino se heterodimerizó mediante cargas complementarias en CH3 (cadenas KK+ y DD-) y se logró silenciar las funciones efectoras de Fc mediante la introducción de mutaciones D265A P329G en CH2.
- P1AG5459 y P1AG5461 se produjeron y purificaron por WuXi Biologics. En resumen, se produjeron en CHO y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A MabSelectSuRe LX y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200 (P1AG5459) o cromatografía de afinidad con proteína A MabSelectSuRe LX, cromatografía de interacción hidrófoba HiTrap Butyl HP y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200 (P1AG5461).

3.2 Caracterización por SPR de anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

Afinidad y avidéz de unión a LTbR murino y FAP murina:

- Como el P1AF4664 es monovalente para el LTBR y el P1AF4674 es bivalente para LTBR, la afinidad y avidéz de unión se determinaron en un instrumento Biacore T200 (Cytiva). Todos los experimentos se ejecutaron a 25 °C usando HBS-P (Cytiva #BR-1006-71) como tampón de migración y dilución. Para determinar la afinidad de estos anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos, se inmovilizó un anticuerpo específico de cabra anti-Fc γ de ratón (JacksonImmunoResearch #115-005-071) en un chip sensor CM3 de la serie S usando la química estándar de acoplamiento de aminas. Los

- anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos se capturaron en la superficie y se inyectó LTbR murino (P1AE4410) en una corrida cinética de un solo ciclo con un tiempo de asociación de 120 s con concentraciones de 3,7 a 300 nM (serie de dilución 1:3) a un caudal de 30 μ l/min. Se determinó la afinidad a FAP murina usando el mismo chip sensor al inyectar la FAP murina (P1AD9907) con una concentración única de 100 nM en la superficie con tiempo de asociación y caudal como se describió anteriormente. La fase de disociación final se monitoreó durante 600 s mediante un lavado con tampón de migración. Posteriormente, la superficie se regeneró mediante una inyección de glicina 10 mM, pH 2,0 seguido de NaOH 10 mM durante 60 s cada uno a un caudal de 5 μ l/min. Las diferencias totales del índice de refracción se corrigieron mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie de referencia. Las inyecciones en blanco también se sustrajeron (doble referencia). Las curvas derivadas se ajustaron a un modelo de unión Langmuir 1:1 usando el programa informático BIAevaluation.
- 15 Para determinar la avidez del anticuerpo sustituto murino biespecífico 2+1 P1AF4674, se inmovilizaron aproximadamente 100 RU de LTbR murino biotinilado (P1AE4410) en un chip sensor SA de la Serie S. Los anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos se inyectaron como analitos y se sometieron a prueba en una corrida cinética de un solo ciclo con un tiempo de asociación de 120 s con concentraciones de 11,1 a 100 nM (serie de dilución 1:3) a un caudal de 30 μ l/min. La fase de disociación final se monitoreó durante 1800 s mediante un lavado con tampón de migración. Posteriormente, la superficie se regeneró mediante inyección de glicina 10 mM, pH 2,0 durante 60 s cada uno a un caudal de 5 μ l/min. Las diferencias totales del índice de refracción se corrigieron mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie de referencia. Las inyecciones en blanco también se sustrajeron (doble referencia). Las curvas derivadas se ajustaron a un modelo de unión Langmuir 1:1 usando el programa informático BIAevaluation. En esta configuración de ensayo, P1AF4674 mostró una clara avidez (aprox. K_D 0,2 nM) por el contrario al anticuerpo sustituto murino biespecífico 1+1 P1AF4664 (aprox. K_D 5 nM). Las constantes de disociación de equilibrio (K_D) así como las semividas de los complejos ($t_{1/2}$) para los anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP/anti-LTbR monovalentes (1+1) y bivalentes (2+1) que se unen a LTbR murino o FAP murina se indican en la **Tabla 17**.

Tabla 17: Constantes de disociación de equilibrio (KD) y semividas de los complejos (t1/2) para los anticuerpos sustitutos murinos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

anticuerpos biespecíficos anti-FAP LTBR mu	configuración de afinidad LTbR murino		configuración de aivez LTbR murino		configuración de afinidad FAP murina
	K _D (nM)	t1/2 (s)	aprox. K _D (nM)	t1/2 (s)	K _D (nM)
P1AF4664 (1+1)	13	75	5	45	<0,1
P1AF4674 (2+1)	13	71	0,2	413	<0,1

5 Ejemplo 4

Caracterización funcional de los anticuerpos anti-LTBR

La activación de LTBR da lugar a la regulación por incremento de genes inflamatorios y de desarrollo tales como la molécula de adhesión ICAM, por parte de las células estromales. Hemos caracterizado la actividad biológica de los novedosos agonistas de LTBR midiendo su capacidad para la regulación por incremento de ICAM en las células endoteliales humanas y en fibroblastos asociados al cáncer (CAF) *in vitro*.

4.1 Efecto de los anticuerpos anti-LTBR humanos sobre las células endoteliales

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se trataron con anticuerpos anti-LTBR en presencia o ausencia de un reticulante anti-Fc y se midieron los niveles de la molécula de adhesión ICAM mediante análisis FACS.

En resumen, se sembraron HUVEC (15 000 células/pocillo, cat. C2517AS, Lonza) en una placa de 96 pocillos recubierta de gelatina en medio completo EGM-2 (cat. CC3162, Lonza) y se dejaron formar una monocapa durante la noche. Las monocapas de HUVEC se trataron durante la noche con anticuerpos anti-LTBR preincubados durante 30 minutos con o sin reticulante F(ab)2 anti-Fc humano (cat. 109-006-008, Jackson ImmunoResearch, proporción molar anticuerpo/reticulador 1:2) en medio de ensayo (medio EBM-2 complementado con FBS al 2 %, ácido ascórbico, heparina, GA-1000 y heparina, cat. CC3156 y CC4176, Lonza). Las HUVEC tratadas se separaron con acutasa (Gibco) y se tiñeron con un colorante viva/muerta (kit de viabilidad Zombie Aqua fijable, cat.423102 Biolegend) y con un anticuerpo marcado anti-ICAM-BV421 humano (BD cat. 564077, diluido 1:100). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo (BD Fortessa). La mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de ICAM se analizó en FlowJo y los datos se normalizaron con respecto a CBE11 usando la siguiente fórmula: MFI normalizada = (MFI - MFI_{mín}) / (MFI_{máx} - MFI_{mín}), donde MFI_{máx} se calculó como la mediana de

los valores de MFI medidos en las concentraciones superiores de CBE11 (PAE1873) con reticulante, y MFI_{mín} se calculó como la mediana de los valores de MFI medidos en la concentración más baja de CBE11 (P1AE1873) sin reticulante.

Los novedosos anticuerpos anti-LTBR humano inducen la regulación por incremento de ICAM en HUVEC de forma dependiente de la dosis y del reticulador (**Figuras 13A a 13D**).

4.2 Efecto de los anticuerpos anti-LTBR humano sobre los fibroblastos asociados al cáncer

Se caracterizó además la capacidad de los novedosos anticuerpos anti-LTBR para inducir la regulación por incremento de las moléculas de adhesión en un segundo tipo de célula estromal *in vitro*, a saber, fibroblastos asociados al cáncer. Con este objetivo, los cultivos de CAF se trataron con anticuerpos en presencia o ausencia de un reticulante anti-Fc, y se midieron los niveles de la molécula de adhesión ICAM mediante análisis FACS.

En resumen, los fibroblastos asociados al cáncer inmortalizados de próstata (12 000 células/pocillo, CAF hTERT PF179T, ATCC CRL-3290) se sembraron en una placa de 96 pocillos en un medio completo (EMEM complementado con FBS al 10 %, bicarbonato de sodio al 0,075 %, 1 µg/mL de puromicina). Los CAF se trataron durante la noche con anticuerpos anti-LTBR preincubados durante 30 minutos con o sin reticulante F(ab)₂ anti-Fc humano (cat. 109-006-008, Jackson ImmunoResearch, proporción molar anticuerpo/reticulador 1:2) en medio completo. Los CAF tratados se separaron con acutasa (Gibco) y se tiñeron con un colorante NIR viva/muerta (kit de tinción de células muertas IR-cercano LIVE/DEAD Fijable, Thermo Fischer Scientific cat. L34975) y con un anticuerpo marcado anti-ICAM-BV421 humano (BD cat. 564077, diluido 1:100). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo (BD Fortessa). La mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de ICAM se analizó en FlowJo y los datos se normalizaron con respecto a CBE11 usando la siguiente fórmula: MFI normalizada = (MFI - MFI_{mín}) / (MFI_{máx} - MFI_{mín}), donde MFI_{máx} se calculó como la mediana de los valores de MFI medidos en las concentraciones superiores de CBE11 (PAE1873) con reticulante, y MFI_{mín} se calculó como la mediana de los valores de MFI medidos en la concentración más baja de CBE11 (P1AE1873) sin reticulante.

Los anticuerpos anti-LTBR humano inducen la regulación por incremento de ICAM en CAF de forma dependiente de la dosis y del reticulador (**Figuras 14A a 14D**).

Tomados conjuntamente, estos ejemplos muestran que los novedosos anticuerpos agonistas anti-LTBR humano son capaces de regular por incremento la molécula de adhesión ICAM en una variedad de células estromales y su actividad depende estrictamente de la reticulación. A continuación generamos moléculas biespecíficas que comprenden los novedosos agonistas anti-LTBR preferentes y un dominio de unión a antígeno FAP para obtener anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR.

Ejemplo 5

Caracterización funcional de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR

5.1 Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se unen a LTBR humano, de cynomolgus y murino en células

Para probar la capacidad de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR de unirse a LTBR humano, de mono cynomolgus (cyno) y murino en células, los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se incubaron con células genomanipuladas para expresar LTBR humano, de cyno o de ratón y su unión se midió por citometría de flujo.

En resumen, las células CHO-K1 genomanipuladas para sobreexpresar LTBR humano, de cyno o murino se separaron con acutasa (Gibco) y se sembraron 100 000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron con anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR en medio de cultivo (DMEM/F12, FBS al 10 %) durante 1 h a 4 °C. Después del lavado, se incubaron las moléculas unidas a las células con anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR durante 1 h a 4 °C. Después del lavado, se detectaron las moléculas unidas a las células usando un anticuerpo anti-Fc humano marcado con PE (Fragmento F(ab')₂ AffiniPure anti-IgG humana caprino, Fcy, Jackson Immunoresearch, cat. 109-116-098). La fluorescencia unida a las células se midió en un citómetro de flujo iQue (Sartorius). La mediana de la intensidad de fluorescencia de PE se analizó en FlowJo y los datos se normalizaron con respecto a los controles no tratados (MFI / MFI de referencia).

Todas las moléculas biespecíficas se unen a LTBR humano y de cyno con la excepción de P1AG1326 que se une a LTBR humano pero no se une a LTBR de cyno (**Figura 15A y Figura 15B** así como **Figura 15D y 15E**). Estos datos están en línea con los datos de SPR descritos en el Ejemplo 2.4.

La reactividad cruzada con cyno es una ventaja importante de las moléculas biespecíficas novedosas, ya que permitirá la investigación del perfil de toxicidad en una especie relevante. Dado que LTBR es una diana ampliamente expresada, es de gran importancia desvelar los potenciales efectos toxicológicos *in vivo*.

P1AF0537, P1AF5261, P1AF0546, P1AG5683 y, en menor medida, P1AF9728 y P1AF9727 se unen además a LTBR murino en células (**Figuras 15C y 15F**) lo que permite someter a prueba la eficacia y farmacodinámica en modelos singénicos murinos.

5 5.2 Caracterización de la actividad dependiente de FAP de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR *in vitro*

Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR están diseñados para restringir la activación de LTBR al estroma tumoral mediante el direccionamiento a FAP. La activación de LTBR da lugar a la regulación por incremento de genes inflamatorios y de desarrollo tales como las moléculas de adhesión (ICAM y VCAM) y los quimioatrayentes (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) por parte de las células estromales. Se caracterizó la actividad biológica de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR midiendo su capacidad para regular por incremento las moléculas de adhesión y los quimioatrayentes de forma dependiente de FAP en células endoteliales humanas y fibroblastos asociados al cáncer *in vitro*.

5.2.1 Efecto de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR sobre los fibroblastos asociados al cáncer

Para someter a prueba la capacidad de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR para activar fibroblastos asociados al cáncer de una manera dependiente de FAP *in vitro*, se trataron cultivos de CAF que expresaban FAP endógeno y CAF con eliminación de la expresión de FAP con moléculas biespecíficas y se midieron los niveles de la molécula de adhesión ICAM mediante análisis FACS.

En resumen, la expresión de FAP por fibroblastos asociados al cáncer inmortalizados de próstata (hTERT PF179T CAF, ATCC CRL-3290) se inactivó mediante tecnología CRISPR. Los CAF hTERT originales y los CAF con inactivación de FAP (hTERT CAFs_{delFAP}) se sembraron en placas de 96 pocillos en medio completo (EMEM, FBS al 10 %, bicarbonato de sodio al 0,075 %, 1 µg/ml de puromicina) a una densidad de 12 000 células por pocillo. Las células se trataron durante la noche con anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR en medio completo. Las células tratadas se separaron con acutasa (Gibco) y se tiñeron con un colorante NIR viva/muerta (kit de tinción de células muertas IR-cercano LIVE/DEAD Fijable, Thermo Fischer Scientific cat. L34975) y con un anticuerpo marcado anti-ICAM-BV421 humano (BD cat. 564077, diluido 1:100). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo (BD Fortessa). La mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de ICAM se analizó en

FlowJo y los datos se normalizaron con respecto a los controles no tratados de referencia y se expresaron como cambio en veces sobre el valor de referencia.

Las moléculas biespecíficas anti FAP-LTBR inducen la regulación por incremento de ICAM en CAF hTERT de forma dependiente de la dosis y dependiente de FAP
5 **(Figuras 16A a 16D).**

5.2.2 Efecto de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR sobre las células endoteliales

Para someter a prueba la capacidad de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR para activar células endoteliales humanas de forma dependiente de FAP in vitro,
10 se trataron cultivos conjuntos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP humana con moléculas biespecíficas. Los niveles de la molécula de adhesión ICAM en HUVEC se midieron mediante análisis FACS y las cantidades de los quimioatrayentes CXCL9, CXCL10 y CXCL11 secretados en el sobrenadante se midieron mediante análisis Bio-plex.

En resumen, se sembraron HUVEC (13 000 células/pocillo, cat. C2517AS, Lonza) con
15 NIH-3T3 o NIH-3T3 que sobreexpresan FAP (2000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos recubierta de gelatina en medio completo EGM-2 (cat. CC3162, Lonza) y se dejaron formar una monocapa durante la noche. Los co-cultivos se trataron con anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR en medio de ensayo (medio EBM-2
20 suplementado con FBS al 2 %, ácido ascórbico, heparina, GA-1000 y heparina, cat. CC3156 y CC4176, Lonza). Después de 24 horas, los cultivos conjuntos se separaron con acutasa (Gibco) y se tiñeron con un colorante NIR viva/muerta en PBS (kit de tinción de células muertas IR-cercano LIVE/DEAD Fijable, Thermo Fischer Scientific cat. L34975) y con un anticuerpo anti-ICAM-BV421 (BD cat. 564077, diluido 1:100) y
25 un anticuerpo marcado anti-CD31 humano- APC/Cy7 (Biolegend cat. 303120, diluido 1:300). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo (BD Fortessa). La mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de ICAM en la población CD31+ se analizó en FlowJo y los datos se normalizaron con respecto a los controles no tratados de referencia y se expresaron como cambio en veces sobre el valor de
30 referencia. Los medios condicionados se recogieron después de 48 horas y la concentración de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 se midió usando un kit de ensayo de quimiocinas múltiples Bio-plex personalizado (Biorad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR inducen la regulación por
35 incremento de ICAM en células endoteliales humanas de forma dependiente de la

dosis y dependiente de FAP (**Figuras 17A a 17D**). Las moléculas bivalentes
 biespecíficas P1AF0546 y P1AG5683 tienen los menores valores de EC₅₀ más bajos,
 lo que sugiere una mayor potencia de este formato 2+1. Los anticuerpos biespecíficos
 anti-FAP/anti-LTBR también muestran una inducción dependiente de la dosis y
 5 dependiente de FAP de CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en el sobrenadante (**Figuras 18A
 a 18F**). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que los anticuerpos
 biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR pueden modular el endotelio para incrementar las
 moléculas de adhesión y los quimioatrayentes importantes para incrementar la
 infiltración inmunitaria en el tumor. Es importante destacar que el efecto depende de la
 10 presencia de FAP, lo que demuestra que el agonismo de LTBR puede restringirse al
 microambiente tumoral por medio del direccionamiento a FAP.

5.2.3 Efecto de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR sobre la adhesión de los linfocitos T

El ejemplo anterior demostró que los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR
 15 modulan el endotelio humano para regular por incremento las moléculas de adhesión y
 los quimioatrayentes, que son críticos para la cascada de infiltración inmunitaria. Para
 someter a prueba si estos efectos se traducen en un incremento de la infiltración de
 linfocitos T, medimos la primera etapa de la cascada de infiltración inmunitaria, a
 saber, la adhesión de células inmunitarias al endotelio estimulada con anticuerpos
 20 biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR.

En resumen, se sembraron HUVEC con NIH-3T3 o NIH-3T3 que sobreexpresan FAP y
 se estimularon con moléculas biespecíficas anti FAP-LTBR (2 nM) como se describe
 en el ejemplo anterior, o con TNF α (0,5 ng/ml, Peprotech). Las PBMC se aislaron de
 capas leucocíticas de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de
 25 densidad con Histopaque-1077 y se congelaron hasta su uso. Los linfocitos Pan-T se
 purificaron a partir de alícuotas de PBMC congeladas usando un kit de aislamiento de
 linfocitos Pan-T (Miltenyi Biotec, cat. 130-096-535) y de acuerdo con las instrucciones
 del fabricante. Los linfocitos T purificados se dejaron reposar durante la noche en
 medio para linfocitos T (medio optimizador de linfocitos T, Gibco cat. A1048501). Se
 30 recogieron los linfocitos T en reposo, se lavaron en DPBS⁺⁺ (Gibco, cat. 14040182)
 complementado con BSA al 0,2 % y se marcaron con Calceína AM (Invitrogen, cat.
 C3100MP) durante 20 min a 37 °C. Después de un lavado exhaustivo, los linfocitos T
 marcados se resuspendieron en DPBS⁺⁺ BSA al 0,2 % y se añadieron 100 000
 35 células/pocillo a los cultivos conjuntos tratados que se habían lavado previamente con
 medio de ensayo. Los linfocitos T se dejaron adherir durante 1 hora a 37 °C y las

células no adherentes se eliminaron mediante lavados por inversión con DPBS⁺⁺ BSA al 0,2 %. Se adquirieron imágenes de fase y fluorescencia verde (5 por pocillo) usando un sistema de análisis de células vivas Incucyte S3 (Sartorius) y las células T adherentes se cuantificaron como el área cubierta por linfocitos T fluorescentes verdes usando el programa informático de análisis de imágenes Incucyte.

La estimulación con TNF α induce la adhesión de linfocitos T independientemente de FAP y sirve como control positivo. La adhesión de linfocitos T se incrementó en el endotelio tratado con anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR y el efecto depende de la presencia de FAP en el sistema de cocultivo (**Figura 19**).

- Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que el agonismo anti-LTBR puede inducirse de forma dirigida por FAP y regula por incremento un programa inflamatorio por el endotelio humano que da como resultado la inducción de la adhesión de linfocitos T, la primera etapa en la cascada de infiltración inmunitaria. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR pueden actuar como moduladores del microambiente tumoral para incrementar el reclutamiento de células inmunitarias en el tumor.

5.3 Caracterización de sustitutos de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR *in vitro* e *in vivo*

Un subconjunto de las novedosas moléculas biespecíficas anti FAP-LTBR presenta reactividad cruzada con LTBR murino. Generamos moléculas sustitutas murinas en una cadena principal de IgG murina como se describe en ejemplos anteriores y se sometió a prueba su actividad *in vitro* e *in vivo*.

5.3.1 Actividad *in vitro* de los sustitutos de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR sobre los fibroblastos murinos

- Para someter a prueba la capacidad de las moléculas sustitutas anti-FAP/anti-LTBR de activar células estromales murinas *in vitro* de forma dependiente de FAP, se incubaron moléculas biespecíficas anti FAP-LTBR con células NIH-3T3 o NIH-3T3 que sobreexpresan FAP y se midió la regulación por incremento de VCAM mediante análisis FACS.
- En resumen, las células NIH-3T3 o NIH-3T3 que sobreexpresan FAP se sembraron en una placa de 96 pocillos en medio completo. Se diluyeron moléculas sustitutas anti-FAP/anti-LTBR o el anticuerpo 5G11 (anticuerpo agonista anti-LTBR de ratón, Hycult Biotech cat. hm1079) en medio bajo en suero (DMEM, FBS al 1 %) y se estimularon las células durante la noche. Las células tratadas se separaron con acutasa (Gibco) y se tiñeron con un colorante NIR viva/muerta (kit de tinción de células muertas IR-

cercano LIVE/DEAD Fijable, Thermo Fischer Scientific cat. L34975) y con un anticuerpo anti-VCAM de ratón marcado con azul del Pacífico (Biolegend, cat. 105722). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo (BD Fortessa). La mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de VCAM se analizó en FlowJo y los datos se normalizaron con respecto a los controles no tratados de referencia y se expresaron como cambio en veces sobre el valor de referencia.

El anticuerpo agonista anti-LTBR murino 5G11 induce la regulación por incremento de VCAM en ambos tipos celulares, mientras que P1AF4664 y, en menor medida, P1AF4674, son inactivos en células NIH-3T3 y sólo inducen VCAM en presencia de expresión de PAF (**Figuras 20A y 20B**).

5.3.2 Actividad *in vitro* de los sustitutos de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR sobre las células endoteliales

Para someter a prueba la capacidad de las moléculas sustitutas anti-FAP/anti-LTBR para activar células endoteliales de forma dependiente de FAP *in vitro*, se trataron cultivos conjuntos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP humana con moléculas biespecíficas y se midieron los niveles de la molécula de adhesión ICAM en HUVEC mediante análisis FACS.

En resumen, se sembraron HUVEC (15 000 células/pocillo, Lonza cat. C2517AS) conjuntamente con células NIH-3T3 originales o células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP (2000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos recubierta de gelatina en medio completo EGM-2 (cat. CC3162, Lonza). Los co-cultivos se trataron durante la noche con moléculas biespecíficas anti-FAP-LTBR en medio de ensayo (medio EBM-2 complementado con FBS al 2 %, ácido ascórbico, heparina, GA-1000 y heparina, cat. CC3156 y CC4176, Lonza). Los cultivos conjuntos tratados se separaron con acutasa (Gibco) y se tiñeron con un colorante NIR viva/muerta en PBS (kit de tinción de células muertas IR-cercano LIVE/DEAD Fijable, Thermo Fischer Scientific cat. L34975) y con un anticuerpo anti-ICAM-BV421 (BD cat. 564077, diluido 1:100) y un anticuerpo marcado anti-CD31 humano- APC/Cy7 (Biolegend cat. 303120, diluido 1:300). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo (BD Fortessa). La mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de ICAM en la población CD31+ se analizó en FlowJo.

Las moléculas sustitutas anti-FAP/anti-LTBR inducen la regulación por incremento de ICAM en células endoteliales humanas de forma dependiente de la dosis y dependiente de FAP (**Figuras 21A y 21B**).

Tomados conjuntamente, estos datos muestran que las moléculas sustitutas son activas *in vitro* e inducen un agonismo de LTBR dependiente de FAP en células estromales, de forma similar al efecto de las moléculas de cadena principal humana. A continuación sometimos a prueba la actividad de las moléculas sustitutas *in vivo* en modelos tumorales de ratones singénicos.

5.3.3 Estudio *in vivo* de eficacia y farmacodinámica con moléculas sustitutas anti FAP-LTBR en modelos tumorales subcutáneos de cáncer colorrectal y cáncer de páncreas

Se evaluó la eficacia y el efecto farmacodinámico sobre la activación endotelial de moléculas sustitutas anti-FAP-LTBR en ratones portadores de tumores colorrectales subcutáneos (MC38-huCEA) que expresan antígeno carcinoembrionario humano (CEA) y tumores pancreáticos que expresan CEA humano (KPC4662-huCEA). Este último modelo se caracteriza por estroma con expresión abundante de FAP⁺ y un infiltrado inmunitario escaso al inicio del estudio, mientras que el modelo de tumor MC38-huCEA se caracteriza por una expresión moderada de FAP en el estroma y un infiltrado inmunitario más abundante al inicio del estudio.

Las células KPC4662 se obtuvieron de la Universidad de Pensilvania y se genomanipularon internamente para que expresaran CEA humano. Las células se cultivaron en DMEM + FBS al 10 % + Higromicina 500 µg/ml. Las células MC38 que expresan CEA humano se obtuvieron del Beckman Research Institute de City of Hope. Las células se cultivaron en DMEM + FBS al 10 % + Geneticina 500 µg/ml. Antes de la inyección, se contaron las células y se inyectaron 500 000 células (MC38-huCEA) o 300 000 células (KPC4662-huCEA) en un volumen total de 100 µl, en una mezcla 1:1 con RPMI y Matrigel, por vía subcutánea en el flanco de ratones que expresan CEA humano. El crecimiento tumoral se midió al menos dos veces por semana usando un calibre y el volumen tumoral se calculó como sigue: Volumen tumoral = $(W^2/2) \times L$ (W: ancho, L: Longitud).

En el estudio con MC38-huCEA (**Figura 22**), se aleatorizó a los ratones 21 días después de la inyección celular, cuando el tamaño del tumor alcanzó un promedio de aproximadamente de 195 mm³. Todos los ratones se inyectaron i.v. con 200 µl de la solución apropiada de vehículo, P1AF4664, P1AF4674, aPD-L1 (clon 6E11), aPD-L1 + P1AF4664 y aPD-L1 + P1AF4674 (P1AF4664, P1AF4674 3 veces por semana, 5 mg/kg y aPD-L1 dos veces por semana 5 mg/kg, para aPD-L1 la primera inyección se administró i.p. a 10 mg/kg). Para obtener la cantidad adecuada de compuestos por 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con tampón de histidina (Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0). En los días 9 y 16 posteriores al inicio del tratamiento, se

sacrificaron cinco ratones, o la cantidad de ratones supervivientes. Los tumores de estos ratones se procesaron para los análisis corriente abajo.

Las suspensiones de células individuales tumorales para el análisis por citometría de flujo se obtuvieron digiriendo las muestras tumorales con liberasa y ADNasa. A continuación, las suspensiones de células individuales se tiñeron, entre otros, para CD45 murino, CEA humano PerCP-Cy5.5, Podoplanina murina PE-Cy7, CD31 murino APC/Cy7 e ICAM APC. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo Fortessa de BD y los datos se analizaron en FlowJo.

En el estudio de KPC4662-huCEA (**Figura 25**), después de 16 días de crecimiento tumoral inicial de los ratones, cuando el tamaño de los tumores alcanzó aproximadamente 140 mm³, los ratones aleatorizaron y se trataron tres veces por semana con tampón de histidina (vehículo) o P1AF4664 o P1AF4674 (10 mg/kg). Todos los ratones se inyectaron por vía i.v. con 200 µl de la solución adecuada. Para obtener la cantidad apropiada de compuestos por 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con tampón de histidina (Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0). El día 6 posterior al inicio del tratamiento se sacrificaron cinco ratones de cada grupo. Los tumores de estos ratones se procesaron para el análisis histológico corriente abajo.

Para el análisis histológico por inmunofluorescencia (procesamiento tridimensional de imágenes, 3DIP) los tumores se fijaron en solución BD Cytofix, diluida 1:4 en PBS, durante aproximadamente 20 horas. Después de lavarlos y transferirlos a PBS, los tumores se incluyeron en agarosa de baja temperatura de gelificación al 4 %. A partir de estos bloques se cortaron secciones tumorales (de 70 µm de grosor) usando un vibratomo Leica VT1200s equipado con cuchillas de afeitar comunes. Posteriormente, las secciones se permeabilizaron (TBS + Triton-X al 0,3 %) y se bloquearon usando BSA y suero de ratón (cada uno al 1%) durante dos horas antes de teñirlas durante la noche (aproximadamente 15 horas) a temperatura ambiente usando, entre otros, los siguientes anticuerpos: PNAAd/Meca79 (AF647) y CD31 (AF594). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal invertido Leica SP8. La cuantificación de imágenes se llevó a cabo en Imaris 9.6 (Bitplane).

Para los datos de crecimiento tumoral, citometría de flujo, así como el análisis 3DIP, la representación se realizó en GraphPad PRISM 8 y se ejecutaron pruebas Anova unidireccional, con comparaciones múltiples entre grupos, con una corrección Holm-Sidak para pruebas múltiples.

En el estudio de MC38-huCEA (**Figura 22**) observamos que el tratamiento con las moléculas sustitutas anti FAP-LTBR P1AF4664 y P1AF4674 inhibe el crecimiento de

los tumores MC38-huCEA en monoterapia y mejora la inhibición del crecimiento tumoral de aPD-L1 (**Figuras 23A a 23C**). La cinética de crecimiento tumoral muestra que la inhibición del crecimiento tumoral de los animales tratados empieza a ser visible después de aproximadamente una semana de tratamiento (**Figuras 23A y 23C**). A los 5 12 días posteriores al inicio del tratamiento, hay una diferencia estadísticamente significativa del volumen tumoral entre el vehículo y P1AF4674, así como entre el vehículo y ambas combinaciones de aPD-L1 con P1AF4664 y P1AF4674. Además, la combinación de P1AF4674 y aPD-L1 muestra un volumen tumoral estadísticamente significativo menor que la monoterapia con aPD-L1 (**Figura 23B**). Esto indica que el 10 formato 2+1 (P1AF4674) muestra una inhibición del crecimiento tumoral superior en comparación con el formato 1+1 (P1AF4664).

El análisis por citometría de flujo de suspensiones de células individuales tumorales en el día 9 y en el día 16 posteriores al inicio del tratamiento reveló una regulación por incremento de la molécula de adhesión ICAM en el endotelio tumoral tras el 15 tratamiento con moléculas sustitutas anti FAP-LTBR (**Figuras 24A y 24B**). P1AF4674, que es un agonista de LTBR bivalente, es superior a la molécula monovalente P1AF4664.

En el estudio de KPC4662-huCEA (**Figura 25**), 6 días posteriores al inicio del tratamiento observamos a través de análisis histológico un incremento 20 estadísticamente significativo de la presencia de vénulas de endotelio alto (HEV) en el tejido tumoral tras el tratamiento con las moléculas sustitutas anti FAP-LTBR P1AF4664 y P1AF4674 (**Figuras 26A, 26B y 26C**).

5.3.4 Estudio *in vivo* de eficacia y farmacodinámica con moléculas sustitutas anti FAP-LTBR en combinación con anti-PD-L1 en modelo de cáncer de mama ortópico.

25 Se evaluó la eficacia y el efecto farmacodinámico sobre la activación endotelial, la secreción de citocinas y la infiltración inmunitaria del anticuerpo biespecífico anti-FAP/anti-LTBR P1AG5459, en monoterapia o en combinación con el inhibidor de puntos de control aPD-L1, en ratones portadores de tumores de mama ortotópicos (EMT6). El modelo se caracteriza por un estroma con expresión abundante de FAP⁺ y 30 un escaso infiltrado inmunitario, localizado principalmente en el borde del tumor al inicio del estudio.

Las células EMT6 se obtuvieron de ATCC (CRL-2755). Las células se cultivaron en DMEM + FCS al 15 %. Antes de la inyección, se contaron las células y se inyectaron 1 000 000 de células en un volumen total de 50 µl, en una mezcla 1:1 con RPMI y 35 Matrigel, en el panículo adiposo mamario de ratones BALB/c. El crecimiento tumoral

se midió al menos dos veces por semana usando un calibre y el volumen tumoral se calculó como sigue: Volumen tumoral = $(W^2/2) \times L$ (W: ancho, L: Longitud). En este estudio, se definió a los que responden al tratamiento y a los que no responden al tratamiento como aquellos con un volumen tumoral, en el punto temporal analizado, inferior o superior al volumen tumoral al inicio del tratamiento, respectivamente.

Las suspensiones de células tumorales individuales para el análisis por citometría de flujo y el análisis histológico se realizaron como se describe en el apartado 5.3.3 con la adición de anticuerpos contra CD8 (BV421), CD4 (BV570) y B220 (BV711) al panel histológico.

- 10 Los niveles de quimiocinas en los lisados tumorales se evaluaron usando un kit BCA (Thermo Scientific, kit de ensayo de proteínas Pierce BCA, #23225, US) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la placa se leyó en el lector ELISA Spectramax i3 (Molecular Devices, EE. UU.). A continuación se utilizó el panel de quimiocinas de ratón Bio-Plex Pro™ 33-Plex (#12002231, BioRad, EE. UU.) para medir el nivel de
- 15 citocinas y quimiocinas en el lisado proteico. Las muestras se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante en placas magnéticas de 96 pocillos (placas de fondo plano Bio-Plex Pro™, #171025001, BioRad, EE.UU.). El ensayo se leyó en la máquina Flexmap 3D® (Luminex, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del programa informático xPonent®, versión 4.2, proporcionado con la máquina.
- 20 En el estudio de EMT6 (**Figura 27**) observamos que el tratamiento con la molécula sustituta anti FAP-LTBR P1AG5459 controla eficazmente los tumores ortotópicos EMT6 en monoterapia y mejora aún más la inhibición parcial del crecimiento tumoral del tratamiento con anti PD-L1, induciendo la regresión tumoral (**Figura 28A-B**). Al final del estudio, 3 ratones en el brazo de monoterapia y 5 ratones en el brazo de
- 25 combinación estaban libres de tumor. Es importante destacar que el efecto de inhibición del crecimiento tumoral no se observa cuando los ratones se tratan con un anticuerpo no dirigido (DP47)-LTBR (P1AG5461, **Figura 28A-B**), lo que demuestra el efecto dependiente de FAP del anticuerpo biespecífico anti-FAP/anti-LTBR *in vivo*. El análisis por citometría de flujo de la suspensión de células tumorales individuales el
- 30 día 13 después del inicio del tratamiento reveló una regulación por incremento dependiente de FAP de las moléculas de adhesión ICAM (**Figura 29A**) y VCAM (**Figura 29B**) en el endotelio tumoral en todos los grupos tratados con P1AG5459, pero no con P1AG5461. La regulación por incremento de las moléculas de adhesión en el endotelio tumoral podría facilitar la migración transendotelial de las células
- 35 inmunitarias de la sangre al tejido. Además, puede detectarse una abundante

población de HEV Meca79+ en los tumores tratados con P1AG5459 (**Figura 29C**). Las HEV son vasos especializados para la extravasación de linfocitos T no expuestos previamente y de memoria en órganos linfoides y se han relacionado recientemente con el incremento de la infiltración inmunitaria en tumores (Asrir y col, Cancer Cell. 2022 Mar 14;40(3):318-334.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2022.01.002). Las lecturas de PD observadas fueron heterogéneas, pero se observa un mayor efecto sobre los niveles de moléculas de adhesión en las células endoteliales y se observa un mayor porcentaje de HEV en los tumores caracterizados como que responden al tratamiento (cuadrados abiertos, □) en comparación con los que no responden al tratamiento (círculos cerrados, ●, **Figura 29A-C**). El análisis histológico por inmunofluorescencia confirmó el incremento significativo de la presencia de vénulas de endotelio alto diferenciadas Meca79+ (**Figura 30A**) en los tumores tratados con P1AG5459 solo o en combinación con el anticuerpo aPD-L1. Las HEV se detectan mucho menos en los tumores tratados con P1AG5461, lo que confirma la actividad dependiente de FAP de FAP LTBR *in vivo*. El análisis histológico reveló además que el tratamiento con P1AG5459 incrementa la infiltración de linfocitos B (**Figura 30D**), linfocitos T CD8 (**Figura 30B**) y CD4 (**Figura 30C**) en el tumor. El incremento del infiltrado inmunitario también fue heterogéneo, pero se observa un mayor nivel de infiltrado inmunitario en los tumores que responden al tratamiento (cuadrados abiertos, □) en comparación con los que no responden al tratamiento (círculos cerrados, ●). El incremento del infiltrado inmunitario depende de FAP, ya que no se observa en el tratamiento con la molécula no dirigida P1AG5461. El análisis de los lisados tumorales reveló un incremento de las cantidades de las quimiocinas CXCL13 (**Figura 31A**), CCL5 (**Figura 31B**) y CXCL10 (**Figura 31C**) en respuesta al tratamiento con P1AG5459. La regulación por incremento de las quimiocinas en la zona tumoral en respuesta al tratamiento con FAP-LTBR puede mediar en la atracción de más células inmunitarias al sitio tumoral.

5.3.5 Estudio de eficacia *in vivo* con molécula sustituta anti FAP-LTBR y grupos con disminución de linfocitos T y B en un modelo de cáncer de mama ortotópico.

La dependencia de la eficacia antitumoral de P1AG5459, en monoterapia, se evaluó en ratones agotados de linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 o células B que expresan CD20+ y portadores de tumores de mama ortotópicos (EMT6). El modelo se caracteriza por un estroma con expresión abundante de FAP+ y un escaso infiltrado inmunitario, localizado principalmente en el borde del tumor al inicio del estudio.

Las células EMT6 se obtuvieron de ATCC (CRL-2755). Las células se cultivaron en DMEM + FCS al 15 %. Antes de la inyección, se contaron las células y se inyectaron

100 000 células en un volumen total de 50 µl, en una mezcla 1:1 con RPMI y Matrigel, en el panículo adiposo mamario de ratones BALB/c. El crecimiento tumoral se midió al menos dos veces por semana usando un calibre y el volumen tumoral se calculó como sigue: Volumen tumoral = $(W^2/2) \times L$ (W: ancho, L: Longitud). La disminución de

5 linfocitos T CD4/CD8 se llevó a cabo mediante la inyección de 150 microgramos de anti-CD4 (GK1.5) o anti-CD8 (2.43) los días 4, 5, 6, 9 y 16 por vía intraperitoneal. La disminución de células B se llevó a cabo mediante la inyección de 250 microgramos de anti-CD20 (SA271G2) el día 8 por vía intravenosa.

10 Para los datos de crecimiento tumoral, la representación se realizó en GraphPad PRISM 8 y se ejecutaron pruebas Anova unidireccional, con comparaciones múltiples entre grupos indicados, con una corrección Holm-Sidak para pruebas múltiples.

En este estudio confirmamos que el tratamiento con la molécula sustituta anti FAP-LTBR P1AG5459 controla eficazmente los tumores ortotópicos EMT6 en monoterapia (véanse las **Figuras 32A a 32C**). También mostramos que, en ausencia de linfocitos T

15 CD8, los tumores tratados con vehículo y con P1AG5459 crecen de forma similar con rapidez. En el día 15, cuando aún quedaban más de 3 animales por grupo, un análisis estadístico indicó que no había diferencias estadísticamente significativas en el volumen tumoral entre los grupos de vehículo y P1AG5459 con disminución de CD8, lo que demuestra que las linfocitos T CD8 son necesarios para mediar la eficacia de

20 P1AG5459 en el modelo tumoral EMT6 (**Figura 32B**). De forma similar, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el volumen tumoral entre los grupos de vehículo y de P1AG5459 con disminución de CD4 y entre los grupos de vehículo y de P1AG5459 con disminución de CD4 que expresan células B CD20⁺, que se analizaron en el día 20 (**Figura 32C**), lo que sugiere que los linfocitos CD4 y B también

25 desempeñan un papel en la mediación de la eficacia de P1AG5459.

5.3.6 Estudio farmacodinámico *in vivo* con una molécula sustituta anti FAP-LTBR en un modelo ortotópico de CRC que alberga mutaciones en Apc/KrasG12D/p53 shRNA/Smad4.

Los efectos farmacodinámicos de P1AG5459, en monoterapia, se evaluaron en

30 ratones portadores de tumores de CRC ortotópicos (modelo organoide AKPS). El modelo se caracteriza por un estroma con expresión abundante de FAP⁺ y un muy escaso infiltrado inmunitario, como mucho, localizado principalmente en el borde del tumor al inicio del estudio.

Los organoides de cáncer colorrectal AKPS (organoides intestinales de ratón

35 genomanipulados por medio de CRISPR-Cas9 para albergar mutaciones en Apc,

KrasG12D (Inserción), p53 (Inactivación) y Smad4) se obtuvieron de Genentech. Los organoides se cultivaron en un medio que contenía suplemento B-27™ (Gibco™), N₂, DMEM/F-12 avanzado (Gibco™) más glutamina y HEPES. Antes de la inyección, se contaron los organoides y se inyectaron 200 organoides en un volumen total de 50 µl del mismo medio descrito anteriormente, en la submucosa del colon (por medio de colonoscopia) de ratones C57BL/6-N. El crecimiento tumoral se monitoreó semanalmente por medio de colonoscopia.

La cosecha del tumor se llevó a cabo cuando fue necesario sacrificar a los ratones de acuerdo con las directrices locales o, por último, en el día 50 posterior a la implantación. Para el análisis histológico por inmunofluorescencia (procesamiento tridimensional de imágenes, 3DIP) los tumores se fijaron en solución de tampón de fijación BD Cytofix™, diluida 1:4 en PBS, durante aproximadamente 20 horas. Después de lavarlos y transferirlos a PBS, los tumores se incluyeron en agarosa de baja temperatura de gelificación al 4 %. A partir de estos bloques se cortaron secciones tumorales (de 70 µm de grosor) usando un vibratomo Leica VT1200s equipado con cuchillas de afeitar comunes. Posteriormente, las secciones se permeabilizaron (TBS + Triton-X al 0,3 %) y se bloquearon usando BSA y suero de ratón (cada uno al 1%) durante dos horas antes de teñirlas durante la noche (aproximadamente 15 horas) a temperatura ambiente usando, entre otros, los siguientes anticuerpos: Ki67 (AF532), B220 (AF647), CD8 (BV421), CD4 (BV570), CD11c (BV480), PD1 (PE), TCF1 (AF488), PNA^{Ad}/Meca79 (AF647) y CD31 (AF594). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal invertido Leica SP8. La preparación de imágenes se llevó a cabo en Imaris 9.9 (Bitplane). Todas las tinciones, excepto una, se llevaron a cabo en la misma sección (indicada en la **Figura 34**).

Como se observó en otros modelos de ratón, confirmamos que el tratamiento con P1AG5459 induce la diferenciación de HEV Meca79+ (**Figura 33**). Es importante destacar que las HEV se desarrollan dentro del tumor, pero no en el tejido de colon normal adyacente (**Figura 33**). Además, el tratamiento con P1AG5459 incrementó drásticamente el número de linfocitos T CD8 en el tumor (**Figura 33**). Además, en una muestra de un ratón que recibió tratamiento con P1AG5459 y que se sacrificó en el día 50, observamos que el infiltrado inmunitario tumoral se organizó por sí mismo en una estructura linfoide terciaria (TLS), caracterizada por la presencia de células mieloides CD11c, zonas diferenciadas de linfocitos B y T, un centro de linfocitos B proliferantes y

que contenía linfocitos T activados (PD1+) y linfocitos T que expresan el marcador de troncalidad TCF1 (**Figura 34**).

Este estudio demostró no sólo que el tratamiento con P1AG5459 puede incrementar el contenido de células inmunitarias y VHE dentro del tumor, sino que también permite la
5 formación de estructuras linfoides terciarias que se conoce que se correlacionan con una mejor respuesta al tratamiento con inhibidores de puntos de control en diversos cánceres (Schumacher y Thommen, DOI: 10.1126/science.abf9419).

En conjunto, los datos descritos en el Ejemplo 5 muestran que los novedosos anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR son eficaces *in vivo* y son capaces de
10 controlar el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer colorrectal y cáncer de mama inmunoexcluido. Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR hicieron sinergia con el inhibidor de puntos de control anti PD-L1, lo que sugiere que los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR pueden utilizarse para mejorar la respuesta a los inhibidores de puntos de control en la clínica. Los datos también demuestran que los
15 anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR modulan el microambiente tumoral, especialmente la vasculatura tumoral, regulando por incremento las moléculas de adhesión y diferenciando los vasos hacia un fenotipo HEV, y mediante la inducción de la secreción de quimioatrayentes. Conjuntamente, estos efectos mejoran la infiltración inmunitaria en el tumor y el incremento del contenido de células inmunitarias está
20 mediando la eficacia antitumoral de los novedosos anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR, que hemos demostrado en el modelo de cáncer de mama ortotópico. Además, los novedosos anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR pueden impulsar la formación de estructuras linfoides terciarias, como se observó en un modelo de cáncer colorrectal ortotópico.

25 **Ejemplo 6**

Comparación y superioridad de anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR con respecto a anticuerpos anti-LTBR conocidos

6.1 Efecto de los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR sobre las células endoteliales *in vitro*

30 Para comparar funcionalmente anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR que contienen anticuerpo anti-LTBR P1AE9459 o anticuerpos anti-LTBR conocidos CBE11 (como se describe en el documento US 7,429,644 B2) y BHA10 (como se describe en el documento US 7,429,645 B2), los cultivos conjuntos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células NIH-3T3 que sobreexpresan FAP humana se
35 trataron con moléculas biespecíficas y se midieron los niveles de la molécula de

adhesión ICAM en HUVEC mediante análisis FACS como se describe en el apartado 5.2.2.

Todas las moléculas biespecíficas sometidas a prueba regulan por incremento ICAM en las células endoteliales en presencia de FAP con una potencia similar (**Figura 35A**). La mayoría de las moléculas son inactivas en ausencia de FAP (**Figura 35B**), sin embargo, un anticuerpo biespecífico que contiene CBE11 como dominio de unión a antígeno agonista de LTBR (P1AE1079) muestra cierta actividad en ausencia de FAP a dosis altas, lo que sugiere la superioridad de los formatos biespecíficos que contienen el novedoso anticuerpo agonista anti-LTBR o BHA10 sobre el clon de anticuerpo CBE11.

6.2 Los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se unen a LTBR humano, de cynomolgus y murino en células

Para comparar la capacidad de los anticuerpos biespecíficos que contienen el anticuerpo anti-LTBR P1AE9459 y los anticuerpos anti-LTBR conocidos CBE11 y BHA10 para unirse a LTBR humano, de mono cynomolgus (cyno) y murino en células, los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se incubaron con células genomanipuladas para expresar LTBR humano, cyno o de ratón y su unión se midió por citometría de flujo como se describe en el apartado 5.1.

Todos los anticuerpos biespecíficos anti-FAP/anti-LTBR se unen a LTBR humano en células de forma similar, sin embargo P1AE1079 se une a LTBR humano de forma menos eficaz que los anticuerpos biespecíficos que contienen BHA10 o el anticuerpo anti-LTBR P1AE9459. Además, los anticuerpos biespecíficos con unión monovalente a LTBR (formato 1+1) que contienen BHA10 se unen peor a LTBR humano que las moléculas con unión bivalente a LTBR (tanto para BHA10 como para el novedoso anticuerpo anti-LTBR P1AE9459) (**Figura 36A**).

Los anticuerpos biespecíficos que contienen el novedoso anticuerpo anti-LTBR P1AE9459 o BHA10 se unen de forma similar a LTBR cyno, sin embargo, una molécula biespecífica que contiene CBE11 no se une a LTBR cyno (**Figura 36B**) de acuerdo con el Ejemplo 5.1. La reactividad cruzada con cynomolgus es una ventaja importante de los novedosos anticuerpos biespecíficos, ya que permitirá la investigación del perfil de toxicidad en una especie relevante. Dado que LTBR es una diana ampliamente expresada, es de gran importancia desvelar los potenciales efectos toxicológicos *in vivo*.

De forma interesante, sólo las moléculas biespecíficas que contienen el novedoso anticuerpo anti-LTBR P1AE9459 se unen a LTBR murino en células, mientras que las

moléculas biespecíficas que contienen anticuerpos conocidos CBE11 o BHA10 no presentan reacción cruzada con LTBR murino (**Figura 36C**). Estos datos sugieren que el novedoso anticuerpo anti-LTBR P1AE9459 se une a un epítipo distinto que permite la reactividad cruzada entre tres especies a pesar de la baja identidad entre el LTBR humano y de ratón (69 % de alineación del DEC humano y de ratón). La unión a LTBR murino es una ventaja importante de los novedosos anticuerpos biespecíficos, ya que permite la investigación directa de la eficacia *in vivo* y los efectos farmacodinámicos del mismo aglutinante en modelos singénicos relevantes, ya que requiere sólo la murinización de la cadena principal. Los modelos singénicos que reflejan diferentes biología

6.3 Comparación de la unión a LTBR mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR)

El comportamiento de unión del nuevo anticuerpo agonista anti-LTBR P1AE9459 se comparó con el de los anticuerpos anti-LTBR conocidos CBE11 y BHA10. La unión de los anticuerpos IgG anti-LTbR a LTBR humano, de cynomolgus y murino se investigó mediante resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento Biacore T200 o Biacore 8K (Cytiva). Todos los experimentos se ejecutaron a 25 °C usando HBS-P (Cytiva #BR-1006-71) como tampón de migración y dilución. Se inmovilizó un anticuerpo específico anti-IgG humana PG LALA en un chip sensor CM5 o CM3 de la serie S usando la química estándar de acoplamiento de aminas. Las IgG anti-LTBR se capturaron en la superficie llevando a niveles de captura entre 10 y 100 RU. Se inyectaron LTBR humano, de cynomolgus o murino (P1AE7979, P1AE4411 o P1AE4410, respectivamente) durante 120 s con concentraciones de 3,7 a 300 nM (serie de dilución 1:3) en la superficie (fase de asociación) a un caudal de 30 µl/min. La fase de disociación se monitoreó durante 600 s mediante un lavado con tampón de migración. La superficie se regeneró mediante la inyección de NaOH 10 mM durante 60 s a un caudal de 5 µl/min. Las diferencias totales del índice de refracción se corrigieron mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie de referencia. Las inyecciones en blanco también se sustrajeron (doble referencia). Los sensogramas registrados se ajustaron a un modelo de unión Langmuir 1:1 usando el programa informático BIAevaluation. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, así como las afinidades respectivas (constante de disociación de equilibrio KD) se han resumido en la **Tabla 18** a continuación. El novedoso anticuerpo agonista

anti-LTBR P1AE9459 presenta reacción cruzada con LTBR humano, de cynomolgus y murino, mientras que CBE11 sólo se une a LTBR humano y BHA10 presenta reacción cruzada con LTBR humano y de cynomolgus, pero no se une a LTBR murino. Las afinidades de P1AE9459 y BHA10 a LTBR humano son comparables (0,3 nM frente a 0,5 nM, respectivamente), mientras que la afinidad de CBE11 a LTBR humano es ~3 veces menor que la de P1AE9459. En comparación con los anticuerpos conocidos CBE11 y BHA10, P1AE9459 es el anticuerpo más afín al LTBR humano y de cynomolgus y el único que presenta reacción cruzada con el receptor murino.

Tabla 18: Comparación de cinética de unión de anticuerpos IgG anti-LTBR a LTBR humano, de cynomolgus y murino determinada mediante SPR

IgG anti-LTBR	antígeno	Ka (1/ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	T1/2 (min)
P1AE9459 (9459)	LTBR hu	7,95E+05	2,17E-04	0,3	53
	LTBR cyno	6,41E+05	1,91E-04	0,3	61
	LTBR mu	7,48E+05	7,95E-03	10,6	1
P1AE1873 (CBE11)	LTBR hu	4,89E+06	5,43E-03	1	2
	LTBR cyno	sin unión			
	LTBR mu	sin unión			
P1AH0119 (BHA10)	LTBR hu	1,72E+06	8,53E-04	0,5	14
	LTBR cyno	1,31E+06	1,54E-03	1,18	8
	LTBR mu	sin unión			

6.4 Determinación del epítipo por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX)

Los epítipos del anticuerpo agonista anti-LTBR P1AE9459, así como de CBE11 (P1AE1873) y BHA10 (P1AH0119) se determinaron por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio. A modo de comparación, también se determinó la interfaz de unión de la construcción monocatenaria del ligando natural linfotoxina humana $\alpha 1\beta 2$ (P1AE1235) a LTBR humano (P1AH2680) que se clonó de serina 28 a metionina 227.

El LTBR humano se marcó con deuterio mediante incubación en agua tamponada deuterada (D₂O) en ausencia de un anticuerpo o ligando (estado proteico 1) o en presencia del anticuerpo principal P1AE9459 (estado proteico 2) o en presencia del anticuerpo CBE11 (estado proteico 3) o en presencia de BHA10 (estado proteico 4) o en presencia de la construcción monocatenaria del ligando natural linfotoxina humana $\alpha 1\beta 2$ (estado proteico 5) durante diversas duraciones. Se utilizaron los siguientes tampones e instrumentación: Tampón H₂O (histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 en H₂O), tampón D₂O (histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 en D₂O), y tampón de desactivación (urea 4 M, KH₂PO₄ 0,17 M, clorhidrato de tris-(2-carboxietil)fosfina 0,3 M

(TCEP), pH 2,8). Para el pipeteado y el marcaje, se utilizó un muestreador automático PAL HTC de Leap Technologies. Todas las muestras de marcaje (0 min, 15 segundos, 1, 10, 60 y 300 minutos de marcaje) se realizaron por triplicado.

Después de los distintos tiempos de marcaje, la reacción de intercambio se desactivó mediante la adición de tampón de extinción. Posteriormente, todas las muestras se digirieron mediante la proteasa Nepenthesina-2. Los péptidos resultantes se separaron mediante UPLC de fase inversa y se identificaron mediante detección MS/MS usando un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribid™ (Thermo Fisher Scientific). Para la evaluación de los datos, para identificar los péptidos con diferentes niveles de deuteración de LTBR en los estados proteicos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente, se utilizaron las herramientas de programas informáticos disponibles comercialmente Peaks™ Studio de Bioinformatics Solutions, Inc. (BSI) y HDEaminer de Sierra Analytics.

Más detalladamente, los análisis de las muestras marcadas con deuterio se realizaron como sigue: las muestras marcadas y desactivadas se cargaron en un sistema nanoACQUITY UPLC® de Waters® enfriado (0 °C) (Waters Corp., Milford, MA). La digestión con la proteinasa aspártica nepenthesina-2 (Affipro, # AP-PC-004) se realizó en línea a 20 °C. Los péptidos obtenidos se atraparon y desalaron a 0 °C durante 3 min (ácido fórmico al 0,23 % en agua, 200 µl/min, Waters™ VanGuard C18, 1,7 µm, 2,1x5 mm). Posteriormente se realizó una separación en fase inversa (columna Waters™ BEH C18, 1,7 µm, 1x100 mm) usando un gradiente de 8-35 % con ácido fórmico al 0,23 % en acetonitrilo (pH 2,5) en 7 min para todas las muestras, a un caudal de 40 µl/min.

El análisis de masas se realizó con el espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribid™ usando ionización por electronebulización de ion positivo. Para la identificación de péptidos usando la muestra de 0 min de tiempo de marcaje, se utilizó disociación colisional de alta energía (HCD) para la primera réplica, disociación por transferencia de electrones (ETD) para la segunda réplica y disociación por transferencia de electrones/colisión de alta energía (ETHcd) para la tercera réplica, todo ello en modo de adquisición dependiente de datos (DDA). Para todas las mediciones de marcaje fue suficiente el modo de barrido completo.

En términos de evaluación de datos, se utilizó Peaks™ Studio, Bioinformatics Solutions Inc. (BSI) para la identificación de péptidos de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se utilizó HDEaminer, Sierra Analytics, para determinar la incorporación de deuterio en los péptidos a partir de los diferentes tiempos de marcaje

en comparación con el control sin deuterar (tiempo de marcaje de 0 min) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para determinar los epítomos se utilizó el mapa de diferencias de deuteración de HDEaminer, comparando los niveles de deuteración en los estados 2, 3, 4 y 5 de las proteínas unidas, respectivamente, con el estado 1 de la proteína no unida.

Los mapas de diferencias de deuteración determinados para los diferentes anticuerpos anti-LTBR así como para el ligando natural linfotoxina humana $\alpha 1\beta 2$ (P1AE1235) se muestran en las **Figuras 38A a 38D**. Un sumario de las regiones epitópicas correspondientes se muestra en **Tabla 19** a continuación. El epítomo de P1AE9459 se solapa pero es distinto del epítomo del anticuerpo BHA10. El anticuerpo CBE11 se une a un epítomo completamente diferente.

Tabla 19: Sumario de las regiones epitópicas determinadas por espectrometría de masas HDX

Anticuerpo o ligando LTBR	Región epitópica	AA (de – a) en P1AH2680 (UniProt P36941-1)
P1AE9459	-QCRCQPGMFCAAWALEC- (SEQ ID NO:351)	96-112 (123-139)
P1AH0119 (BHA10)	-AWALECTHCELL- (SEQ ID NO:352)	107-118 (134-145)
P1AE1873 (CBE11)	-QTCRDQEKEYYEPQHR- (SEQ ID NO:353) -SRIRDTC- (SEQ ID NO:354)	14-29 (41-56) 46-53 (73-80)
P1AE1235 (linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ hu)	-SYNEHWNYLTICQL – (SEQ ID NO:355) -WALECTHCELLSDCPPGT – (SEQ ID NO:356)	60-73 (87-100) 108-125 (135-152)

Si bien la invención anterior se describió con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo a fin de que se entienda mejor, ni las descripciones ni los ejemplos deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. Las divulgaciones de todas las patentes y literatura científica citadas en la presente se incorporan expresamente en su totalidad como referencia.