

**DOMINIOS VARIABLES ÚNICOS DE INMUNOGLOBULINA QUE SE DIRIGEN
AL RECEPTOR DE LINFOCITOS T**

DESCRIPCIÓN

1 Ámbito de la presente tecnología

5 La presente tecnología proporciona dominios variables únicos de
inmunoglobulina (ISVD) que se unen tanto al dominio constante de un receptor de
linfocitos T (TCR) humano en un linfocito T como al dominio constante de un TCR
de primate no humano en un linfocito T. También se refiere a polipéptidos
multiespecíficos que comprenden un ISVD de acuerdo con la presente tecnología y
10 al menos un ISVD capaz de unirse a un antígeno en una célula diana. La presente
tecnología proporciona además ácidos nucleicos que codifican dichos ISVD o
polipéptidos, así como vectores, hospedadores y métodos para producir estos ISVD
o polipéptidos. Además, la presente tecnología se refiere a métodos para el
tratamiento que hace uso de los ISVD o polipéptidos de acuerdo con la presente
15 tecnología.

2 Antecedentes tecnológicos

 El cáncer tiene un enorme coste humano en todo el mundo. Hoy en día es la
segunda causa principal de muerte a nivel mundial, solo precedida por cardiopatías
y accidentes cerebrovasculares. Los cánceres figuran entre las principales causas
20 de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 19.3 millones
de nuevos casos y 10 millones de muertes relacionadas con el cáncer en 2020. Se
espera que el número de nuevos casos aumente aún más en las próximas décadas.
El crecimiento de la población, el envejecimiento y los cambios en el estilo de vida
se han descrito como factores que contribuyen a la creciente carga de cáncer. En
25 2013, la OMS proyectó que para 2030 el cáncer superará la cardiopatía isquémica
y se convertirá en la causa más común de muerte en todo el mundo (fuente: Cáncer
de la OMS).

 El impacto económico total de la muerte prematura y la discapacidad debido
al cáncer en todo el mundo ya fue de aproximadamente 900 mil millones de dólares
30 en 2008, lo que representó el 1.5 % del producto interior bruto del mundo en ese

momento. Dado que el cáncer se vuelve cada vez más común, el impacto económico total seguramente también ha aumentado significativamente. Los regímenes de tratamiento disponibles para tumores sólidos incluyen normalmente una combinación de resección quirúrgica, quimioterapia y radioterapia. En 40 años de experiencia clínica se ha logrado poco progreso, especialmente en estadios avanzados del cáncer. Se esperan con ansias nuevas terapias que combatan contra el cáncer.

La terapia con anticuerpos es ahora una parte importante de los recursos terapéuticos para combatir enfermedades y especialmente el cáncer. Los anticuerpos monoclonales se han establecido como una estrategia terapéutica clave para una serie de enfermedades durante varios años. La mayoría de las terapias con anticuerpos aprobados de forma contemporánea se basan en anticuerpos monoclonales (mAb, del inglés *monoclonal antibodies*) monoespecíficos. Hasta hoy en día, la mayoría de las dianas de los mAb necesitan un enfoque agonista o antagonista. Mientras que el direccionamiento de los propios antígenos de la superficie celular puede mediar en la actividad antitumoral a través de la inducción de la apoptosis, la mayoría de la actividad basada en mAb contra neoplasias malignas hemáticas depende de cualquiera de las funciones efectoras mediadas por Fc, tales como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*).

Más recientemente, la inmunoterapia ha surgido como un área en crecimiento rápido de la investigación contra el cáncer. La inmunoterapia dirige el sistema de vigilancia inmunitaria del organismo y, en particular, los linfocitos T, a las células cancerosas.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL, del inglés *cytotoxic T cells*) son linfocitos T que destruyen células cancerosas, células que están infectadas (particularmente con virus) o células que están dañadas de otras maneras. Los linfocitos T (también denominados células T) expresan el receptor de linfocitos T (TCR) y el receptor CD3 en la superficie celular. El complejo TCR $\alpha\beta$ –CD3 (o "complejo TCR") está

compuesto de seis proteínas transmembrana de extensión única de tipo I diferentes: las cadenas TCR α y TCR β que forman el heterodímero TCR responsable del reconocimiento del ligando, y las cadenas CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y ζ asociadas no covalentemente, que portan motivos de secuencia citoplasmática que se fosforilan en tirosina tras la activación del receptor y reclutan un gran número de componentes de señalización (Call *et al.* 2004, Molecular Immunology 40: 1295–1305).

Tanto las cadenas α como β del receptor de linfocitos T (TCR) heterodimérico consisten en un dominio constante y un dominio variable. Los linfocitos T se activan tras el reconocimiento del TCR de péptidos afines presentados por moléculas de autoMHC, con transducción de señales iniciada por complejos de CD3 fosforilados en tirosina, lo que conduce a la proliferación y diferenciación de los linfocitos T.

En lugar de provocar respuestas de linfocitos T específicos, que dependen de la expresión por parte de células cancerosas de moléculas MHC y la presencia, generación, transporte y presentación de antígenos peptídicos específicos, los desarrollos más recientes han intentado combinar las ventajas de la inmunoterapia con la terapia con anticuerpos mediante el acoplamiento de todos los linfocitos T de un paciente de manera policlonal a través de tecnologías basadas en anticuerpos recombinantes. Se han genomodificado anticuerpos biespecíficos que tienen una parte de reconocimiento de tumor en un brazo (brazo de unión a la diana) mientras que el otro brazo de la molécula tiene especificidad por un antígeno de linfocitos T (brazo de unión al efector), un denominado activador de linfocitos T (TCE, del inglés *T cell engager*), que a menudo se dirige a CD3. Estos anticuerpos biespecíficos son moléculas de multidireccionamiento que potencian la respuesta inmunitaria del paciente a las células malignas. El acoplamiento conjunto de linfocitos T y células tumorales por el anticuerpo biespecífico conduce a la formación de una sinapsis citolítica entre el linfocito T y la célula tumoral, que induce la activación de linfocitos T y da como resultado la destrucción de células tumorales.

Aunque la mayoría de los anticuerpos biespecíficos activadores de linfocitos T se dirigen al complejo CD3 en el linfocito T, algunos aglutinantes biespecíficos que se dirigen al dominio constante del receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ se han descrito

en el documento WO 2016/180969 A1. Sin embargo, uno de los principales problemas con estos anticuerpos biespecíficos activadores de linfocitos T es que se observó poca reactividad cruzada con el receptor de linfocitos T de macaco.

Las construcciones de anticuerpos biespecíficas se han propuesto en múltiples formatos. Por ejemplo, los formatos de anticuerpos biespecíficos pueden implicar la conjugación química de dos anticuerpos o fragmentos de los mismos (Brennan M. *et al.* 1985, Science 229(4708): 81-83; Glennie M. J. *et al.* 1987, J Immunol 139(7): 2367-2375).

Sin embargo, las desventajas de dichos formatos de anticuerpos biespecíficos incluyen peso molecular elevado y viscosidad elevada a concentración elevada, lo que hace, por ejemplo, que la administración subcutánea sea difícil, y porque cada unidad de unión requiere la interacción de dos dominios variables para la unión de afinidad específica y elevada, teniendo implicaciones en la estabilidad del polipéptido y la eficacia de producción. Dichos formatos de anticuerpos biespecíficos también pueden conducir potencialmente a problemas de CMC relacionados con la mala eficacia de producción y bajas cantidades y/o emparejamiento erróneo de las cadenas ligeras o emparejamiento erróneo de las cadenas pesadas.

Actualmente, solo se comercializa un anticuerpo biespecífico, blinatumomab (una molécula BiTE que reconoce a CD19 y CD3), para su uso en la clínica para el tratamiento del cáncer. Aunque este formato de activación de linfocitos T fue aprobado en diciembre de 2014 para el tratamiento de segunda línea por la FDA, se tuvieron que superar muchos obstáculos. Los primeros ensayos clínicos de blinatumomab se detuvieron prematuramente debido a acontecimientos neurológicos adversos, síndrome de liberación de citocinas (CRS, del inglés *cytokine release syndrome*) e infecciones, por un lado, y la ausencia de respuestas clínicas objetivas o signos sólidos de actividad biológica, por otro lado. El CRS es el acontecimiento adverso más importante notificado en los primeros tratamientos que intervienen con linfocitos T.

Para minimizar el riesgo de acontecimientos adversos y efectos secundarios sistémicos, tales hipercitocinemia, debe tenerse mucho cuidado en la selección del brazo de antígeno de linfocitos T. Este último debe unirse al complejo TCR de manera monovalente y puede no desencadenar la señalización de linfocitos T en ausencia de las células cancerosas diana. Solo la unión específica de ambos brazos del anticuerpo biespecífico a sus dianas (el tumor y el antígeno de linfocitos T) puede desencadenar la formación de las sinapsis citolíticas y la posterior destrucción de las células tumorales.

Los primates no humanos, tales como macacos cangrejeros o macacos de la India, se consideran generalmente la especie animal más adecuada para estudios preclínicos, incluidos estudios de eficacia y toxicidad. Para permitir la evaluación de la toxicidad de un anticuerpo activador de linfocitos T biespecífico en primates no humanos, es aconsejable una buena reactividad cruzada entre especies del anticuerpo para el TCR humano y de primates no humanos.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de formatos de activación de linfocitos T multiespecíficos adicionales y, en particular, formatos de activación de linfocitos T multiespecíficos dirigidos a receptores de linfocitos T diferentes de CD3.

Adicionalmente, existe la necesidad de construcciones de anticuerpos que se unan tanto a una célula diana como a un linfocito T con suficiente afinidad para inducir una respuesta citotóxica. Al mismo tiempo, dichas construcciones no deben inducir una respuesta citotóxica a células no diana, es decir, células que no expresan el antígeno diana o solo lo expresan a niveles bajos. De este modo, se puede alcanzar un equilibrio entre la eficacia y la seguridad. Además, es deseable que dichas construcciones se puedan producir de manera eficaz, por ejemplo, en hospedadores microbianos. Además, las construcciones, cuando se utilizan de manera terapéutica, no deben ejercer efectos secundarios no deseados o solo mínimos, por ejemplo, provocados por la actividad citotóxica en células que no son diana.

3 Sumario de la tecnología actual

Los presentes inventores han encontrado nuevos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD, del inglés *immunoglobulin single variable domains*) activadores de linfocitos T (TCE) que son capaces de dirigirse específicamente y unirse al TCR. Estos ISVD de unión a TCR, también denominados TCE, se pueden unir a una fracción capaz de unirse a una diana específica de células. Las patologías que están provocadas por células anormales, tales como el cáncer, que presentan dicha diana específica en su superficie celular se pueden abordar por el sistema inmunitario a través de la unión del ISVD TCE a los linfocitos T. En consecuencia, los linfocitos T se dirigen a las células tumorales que expresan dicha diana específica y a través de esta unión de los linfocitos T al TCE, se induce la activación de los linfocitos T. Una vez que los linfocitos T se activan, se desencadena la destrucción eficaz de las células diana.

Los inventores encontraron que una construcción que comprende un ISVD que se dirige al TCR de acuerdo con la presente tecnología y una diana específica de células al mismo tiempo conduce a una destrucción mediada por linfocitos T eficaz de las células que expresan la diana *in vitro*. Además, dichas construcciones mostraron solo una actividad limitada contra células que expresaban niveles bajos o nulos en la diana. Esto sugiere la posibilidad de inducir una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T altamente específica contra células diana específicas, al tiempo que muestra un perfil de seguridad favorable.

En los estudios de estabilidad con un ISVD de unión a TCR desarrollado anteriormente, los inventores observaron la falta de estabilidad química para algunos de los restos de aminoácidos en determinadas posiciones en el ISVD. Específicamente, se observó que la isomerización se produjo en el ácido aspártico (D) en la posición 61 y que la oxidación del triptófano (W) se produjo en la posición 99 (numeración de Kabat). Se planteó la hipótesis de que, en el procesamiento posterior, el polisorbato cataliza niveles mínimos de metales de transición, lo que condujo a la oxidación observada del triptófano. Los inventores realizaron varias sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del ISVD de unión a TCR

y observaron que estos efectos perjudiciales podrían reducirse o incluso prevenirse por completo.

En el presente documento se proporcionan ISVD de unión a TCR que tienen una potente unión a TCR de diferentes especies y una estabilidad química mejorada.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente tecnología se refiere a un ISVD que se dirige específicamente a un dominio constante de un receptor de linfocitos T humano y/o de primate no humano presente en un linfocito T, en donde el ISVD comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), y en donde:

a. la secuencia de aminoácidos de CDR1 (de acuerdo con Kabat) es INFYG (SEQ ID NO: 79);

b. la secuencia de aminoácidos de CDR2 (de acuerdo con Kabat) es HISIGDQTDYAX₁SAKG (SEQ ID NO: 80); y

c. la secuencia de aminoácidos de CDR3 (de acuerdo con Kabat) es LSRIX₂PYDY (SEQ ID NO: 81);

en donde

- el resto de aminoácido X₁ se selecciona de E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F y S; y/o

- el resto de aminoácido X₂ se selecciona de Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L e I.

Otro aspecto de la presente tecnología se refiere a un ISVD que se une específicamente a un dominio constante de un receptor de linfocitos T (TCR) humanos y/o de primates no humanos presente en un linfocito T, en donde dicho ISVD comprende 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en donde

a. la secuencia de aminoácidos de CDR1 (de acuerdo con AbM) es GYVHKINFYG (SEQ ID NO: 82);

b. la secuencia de aminoácidos de CDR2 (de acuerdo con AbM) es HISIGDQTD (SEQ ID NO: 83); y

c. la secuencia de aminoácidos de CDR3 (de acuerdo con AbM) es LSRIX₂PYDY (SEQ ID NO: 84);

y en donde

- el resto de aminoácido en la posición 61 (de acuerdo con Kabat) se selecciona de E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F y S; y/o
- el resto de aminoácido X₂ se selecciona de Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L e I.

En una realización, X₁ se selecciona de E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F y S. En una realización, X₁ se selecciona de E o D, tal como X₁ es E.

En otra realización, la posición 61 (de acuerdo con Kabat) se selecciona de E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F y S, tal como la posición 61 (de acuerdo con Kabat) es E o D.

En una realización, la posición 61 (de acuerdo con Kabat) es E.

En una realización, X₂ se selecciona de Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L e I. En una realización, X₂ es Y, A, Q, F, S, T o H. En una realización, X₂ es Y, Q, S o T. En una realización, X₂ es Y.

En una realización, el resto de aminoácido en el ISVD en la posición 103 (numeración de Kabat) se selecciona del grupo que consiste en W, R, A, E, Y, L, H, I, Q, V, K, S, G, P, F, T, tal como el aminoácido en la posición 103 (numeración de Kabat) es W.

En otra realización, la presente tecnología proporciona un ISVD en donde X₁ es E, X₂ es Y y el resto de aminoácido en la posición 103 (numeración de Kabat) es W; o un ISVD en donde el resto de aminoácido en la posición 61 (numeración de Kabat) es E, X₂ es Y y el resto de aminoácido en la posición 103 (numeración de Kabat) es W.

En una realización adicional, el ISVD es un ISVD de cadena pesada. En una realización, el ISVD se selecciona de un VHH, un VHH humanizado, un VH camelizado, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de dominio único o un dAb.

En una realización, el ISVD se selecciona de un VHH, un VHH humanizado y un VH

camelizado. En una realización, el ISVD tiene un grado de identidad de secuencia con la secuencia de las SEQ ID NO: 2 a 57 de al menos un 85 %, preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, en la que , con el fin de determinar el grado de identidad secuencial, se descartan los restos de aminoácidos que forman las secuencias CDR.

Un aspecto adicional de la presente tecnología se refiere a un ISVD, en donde la secuencia del ISVD es

X_0 VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKV
AHISIGDQTDYAX₁SAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIX₂P
YDYX₃GQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 85),

en donde

- a. X_0 se selecciona de E y D.
- b. X_1 se selecciona del grupo que consiste en E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F y S;
- c. X_2 se selecciona del grupo que consiste en Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L e I; y
- d. X_3 se selecciona del grupo que consiste en W, R, A, E, Y, L, H, I, Q, V, K, S, G, P, F y T.

En una realización, X_0 es D. En una realización, X_1 se selecciona de D o E. En una realización, X_1 es E. En una realización, X_2 se selecciona del grupo que consiste en Y, T, S y Q. En una realización, X_2 es Y. En una realización, X_3 es W.

En otro aspecto de la presente tecnología, el ISVD de acuerdo con la presente tecnología forma parte de un polipéptido multiespecífico que comprende además una fracción capaz de unirse a una diana específica de la superficie celular.

En algunas realizaciones de la presente tecnología, la presente tecnología proporciona por tanto un polipéptido que comprende un primer ISVD y al menos uno adicional, en donde dicho primer ISVD se une específicamente a un dominio constante de un TCR humano y/o de un primate no humano presente en un linfocito T, y el al menos un ISVD adicional se une específicamente a un antígeno en una

célula diana, en donde el primer ISVD es un ISVD de acuerdo con la presente tecnología.

En estas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del primer ISVD puede tener al menos un 80 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 a 57, en la que, a efectos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, no se tienen en cuenta los restos de aminoácidos que forman las secuencias de las CDR. En una realización, dicho primer ISVD se selecciona del grupo de secuencias de aminoácidos que consiste en las SEQ ID NO: 37, 42, 46, 50 y 52, tal como la SEQ ID NO: 37 o la SEQ ID NO: 42.

En otra realización, el polipéptido puede comprender además un tercer ISVD, que se une específicamente a un segundo antígeno en una célula diana.

En algunas realizaciones de la presente tecnología, el polipéptido comprende además uno o más grupos, restos, fracciones o unidades de unión diferentes, opcionalmente unidos mediante uno o más enlazadores peptídicos, en los que dichos uno o más grupos, restos, fracciones o unidades de unión diferentes proporcionan al polipéptido una semivida aumentada, en comparación con el polipéptido correspondiente sin dichos uno o más grupos, restos, fracciones o unidades de unión diferentes. Por ejemplo, la unidad de unión puede ser un ISVD que se une a una proteína sérica (humana), tal como la seroalbúmina humana.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el ISVD o polipéptido de la presente tecnología o un vector que comprende el ácido nucleico.

La presente tecnología también se refiere a un hospedador no humano o célula hospedadora transformada o transfectada con el ácido nucleico o vector que codifica un el ISVD o polipéptido de acuerdo con de la presente tecnología.

La presente tecnología se refiere además a una composición que comprende el ISVD o polipéptido de la presente tecnología, preferiblemente la composición es una composición farmacéutica.

Además, se proporciona un método para producir el ISVD o polipéptido como se divulga en el presente documento, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- 5 a. expresar, en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, una secuencia de ácido nucleico que codifique el ISVD o polipéptido; opcionalmente seguido de:
- b. aislar y/o purificar el ISVD y/o el polipéptido.

Además, la presente tecnología se refiere a la composición o polipéptidos para su uso como medicamento.

10 En una realización de la presente tecnología, el polipéptido o composición es para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmunitaria. En una realización de la presente tecnología, dicha enfermedad proliferativa es cáncer.

15 La presente tecnología también proporciona un método de tratamiento que comprende la etapa de administrar la composición o polipéptidos a un sujeto que lo necesita.

20 En una realización de la presente tecnología, el método de tratamiento es para tratar una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmunitaria. En una realización, dicha enfermedad proliferativa es cáncer.

25 La presente tecnología proporciona adicionalmente la composición o polipéptidos para su uso en la preparación de un medicamento. En una realización de la presente tecnología, el medicamento se utiliza en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmunitaria.

 En una realización de la presente tecnología, dicha enfermedad proliferativa es cáncer.

4 Breve descripción de los dibujos

En la **figura 1** se muestra la unión por los ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología a linfocitos T humanos primarios como se determina en citometría de flujo (FACS).

5 En la **figura 2** se muestra la unión por parte de las construcciones de ISVD TCE-CD123-ALB de acuerdo con la presente tecnología a linfocitos T humanos primarios como se determina en citometría de flujo (FACS).

En la **figura 3** se muestran las curvas de dosis y respuesta de las construcciones TCE-CD123-ALB en el ensayo de destrucción celular MOLM-13
10 mediado por linfocitos T humanos basado en citometría de flujo utilizando una relación efector respecto a diana de 10 a 1 en presencia de HSA 30 μ M. Las células se obtuvieron de 2 donantes humanos. Los resultados para el donante 1 se muestran en las figuras **3A**, **3C** y **3E**, mientras que los resultados para el donante 2 se muestran en las figuras **3B**, **3D** y **3F**.

15 En la **figura 4** se muestran las curvas de dosis y respuesta de las construcciones TCE-CD123-ALB en el ensayo de destrucción celular KG-1a mediado por linfocitos T humanos (**4A**) y de macaco(**4B**) utilizando una relación de efector respecto a diana de 10 a 1 en presencia de HSA 30 μ M.

En la **figura 5** se muestran las curvas de respuesta a la dosis de las
20 construcciones TCE-GPC3-GPC3-ALB en el ensayo de destrucción celular HuH-7 mediado por linfocitos T humanos (**Figuras 5A y 5B**) y de macaco (**Figuras 5C y 5D**) utilizando una relación efector respecto a la diana de 15 a 1 en presencia de HSA 30 μ M.

EN la **figura 6** se muestra la evolución de la oxidación relativa de triptófano
25 a 25 °C, cuantificada como la suma de máximos con RRT <1.0 en cromatografía de fase inversa, para ambas construcciones ISVD A022600424 y A022600462.

En la **figura 7** se muestra la evolución de la oxidación del triptófano, cuantificada como la suma de máximos con RRT <1.0 en cromatografía de fase inversa, para ambas construcciones ISVD A022600424 y A022600462, en
30 condiciones de degradación forzada después de 1 día y después de 2 semanas.

En la **figura 8** se muestran los resultados del mapeo de péptidos de las construcciones ISVD A022600424 y A022600462.

5 Descripción detallada de la presente tecnología

Los inventores encontraron en estudios previos que la introducción de determinadas mutaciones de aminoácidos, y combinaciones de las mismas, en las CDR de ISVD T0170056G05 (divulgadas como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969) dio como resultado una unión mejorada a los dominios constantes de un TCR humano y/o de un TCR de primate no humano. Sin embargo, el ISVD de unión a TCR mejorado que se desarrolló, denominado T017000700 (SEQ ID NO: 1) tenía algunos problemas en los estudios de estabilidad química relacionados con la isomerización y la oxidación del triptófano.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de una mejora adicional de los ISVD de unión a TCR.

Los presentes inventores han encontrado ahora que la introducción de determinadas mutaciones de aminoácidos en posiciones particulares dentro de la secuencia del ISVD puede eliminar los problemas observados con T017000700, mientras que conserva la unión a TCR mejorada con respecto a T0170056G05 (divulgado como SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969).

Los restos de aminoácidos se indicarán indistintamente en el presente documento de acuerdo con el código de aminoácidos convencional de tres letras o de una letra, como se menciona en la Tabla B-1 a continuación.

Tabla B-1: Aminoácidos comunes

1 letra Código	3 letras Código	Nombre
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina

5	G	Gly	Glicina
	H	His	Histidina
	I	Ile	Isoleucina
	K	Lys	Lisina
	L	Leu	Leucina
10	M	Met	Metionina
	N	Asn	Asparagina
	P	Pro	Prolina
	Q	Gln	Glutamina
	R	Arg	Arginina
15	S	Ser	Serina
	T	Thr	Treonina
	V	Val	Valina
	W	Trp	Triptófano
	X	Xaa	No especificado
	Y	Tyr	Tirosina

Cuando un resto de aminoácido se indica como "X" o "Xaa", significa que el resto de aminoácido no está especificado, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada. Por ejemplo, si la descripción proporciona una secuencia de aminoácidos de una CDR en donde uno (o más) de los restos de aminoácido está o están indicados con "X", la descripción puede especificar además qué resto o restos de aminoácido está o están (puede o pueden estar) presente(s) en esa posición específica de la CDR.

5.1 Dominios variables únicos de inmunoglobulina

La expresión "dominio variable único de inmunoglobulina" (ISVD) define moléculas de inmunoglobulina en donde el sitio de unión al antígeno está presente y formado por un único dominio de inmunoglobulina. Esto diferencia a los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas "convencionales" (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o sus fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, di-scFv), en donde dos dominios de inmunoglobulina, en particular

dos dominios variables, interactúan para formar un sitio de unión al antígeno. Normalmente, en las inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del V_H y el V_L contribuirán al sitio de unión al antígeno, es decir, un total de 6 CDR participarán en la formación del sitio de unión al antígeno.

En vista de la definición anterior, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo convencional de 4 cadenas (tal como una molécula IgG, IgM, IgA, IgD o IgE; conocido en la técnica) o de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv tal como un Fv con enlaces disulfuro o un fragmento scFv, o un diacuerpo (todos conocidos en la técnica) derivado de dicho anticuerpo convencional de 4 cadenas, no se consideraría normalmente un dominio variable único de inmunoglobulina, ya que, en estos casos, la unión al epítipo respectivo de un antígeno normalmente no se produciría por un (único) dominio de inmunoglobulina, sino por un par de dominios de inmunoglobulina (asociados) tales como los dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, por un par V_H - V_L de dominios de inmunoglobulina, que se unen conjuntamente a un epítipo del antígeno respectivo.

Por el contrario, los dominios variables únicos de inmunoglobulina son capaces de unirse específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un único dominio V_H , un único dominio V_{HH} o un único dominio V_L .

Como tal, el dominio variable único puede ser una secuencia de dominio variable de cadena ligera (p. ej., una secuencia V_L) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (p. ej., una secuencia V_H o secuencia V_{HH}) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea capaz de formar una unidad de unión a antígeno única (es decir, una unidad de unión a antígeno funcional que consiste esencialmente en el dominio variable único,

de tal manera que el dominio de unión a antígeno único no necesita interactuar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional).

Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) puede ser, por ejemplo, un ISVD de cadena pesada, tal como un V_H , V_{HH} , incluido un V_H camelizado o V_{HH} humanizado. Preferiblemente, es un V_{HH} , incluido un V_H camelizado o V_{HH} humanizado. Los ISVD de cadena pesada pueden proceder de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas o de un anticuerpo de cadena pesada.

Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio (único) (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para su uso como anticuerpo de dominio único), un "dAb" o dAb (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para su uso como dAb); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de ellos.

En particular, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un dominio variable único de inmunoglobulina NANOBODY® (tal como un V_{HH} , incluido un V_{HH} humanizado o un V_H camelizado) o un fragmento adecuado del mismo. NANOBODY® y NANOBODIES® son marcas registradas de Ablynx N.V.

Los "dominios V_{HH} ", también conocidos como V_{HH} , fragmentos de anticuerpo V_{HH} y anticuerpos V_{HH} , se han descrito originalmente como el dominio variable de inmunoglobulina de unión a antígeno de los "anticuerpos de cadena pesada" (es decir, de "anticuerpos desprovistos de cadenas ligeras"; Hamers-Casterman *et al.* 1993, Nature 363: 446-448). Se ha elegido el término "dominio V_{HH} " para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en anticuerpos convencionales de 4 cadenas (a los que se hace referencia en el presente documento como "dominios V_H ") y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en anticuerpos convencionales de 4 cadenas (a los que se hace referencia en el presente documento como "dominios V_L "). Para una descripción más detallada de V_{HH} , se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302).

Normalmente, la generación de inmunoglobulinas implica la inmunización de animales de experimentación, la fusión de células productoras de inmunoglobulinas

para crear hibridomas y el cribado de las especificidades deseadas. Como alternativa, se pueden generar inmunoglobulinas mediante el cribado de bibliotecas sintéticas o sin tratamiento previo, por ejemplo, mediante presentación en fagos.

La generación de secuencias de inmunoglobulinas se ha descrito ampliamente en diversas publicaciones, entre las que destacan el documento WO 94/04678, Hamers-Casterman *et al.* 1993 y Muyldermans *et al.* 2001. En estos métodos, se inmuniza a camélidos con el antígeno diana para inducir una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno diana. El repertorio de VHH obtenido de dicha inmunización se examina además en busca de VHH que se unen al antígeno diana.

En estos casos, la generación de inmunoglobulinas requiere un antígeno purificado para la inmunización y/o el cribado. Los antígenos pueden purificarse a partir de fuentes naturales o en el transcurso de la producción recombinante.

La inmunización y/o el cribado de secuencias de inmunoglobulina pueden realizarse utilizando fragmentos peptídicos de dichos antígenos.

La presente tecnología puede utilizar secuencias de inmunoglobulinas de diferente origen, que comprenden secuencias de inmunoglobulinas de ratón, rata, conejo, burro, ser humano y camélido. La tecnología también incluye secuencias completamente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, la tecnología comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o anticuerpos de dominio camelizado, por ejemplo, dAb camelizados como los descritos por Ward *et al.* (véase, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann 1994 y 1996). Además, la tecnología también utiliza secuencias de inmunoglobulina fusionadas, por ejemplo, que forman una construcción multivalente y/o multiespecífica (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios V_{HH} y su preparación, también se hace referencia a Conrath *et al.* 2001, J. Biol. Chem. 276 (10): 7346-7350, así como, por ejemplo, a los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221), y secuencias de inmunoglobulina que comprenden marcadores u otras fracciones funcionales, por ejemplo, toxinas, etiquetas, productos

radioquímicos, etc., que pueden proceder de las secuencias de inmunoglobulina de la presente tecnología.

Un " V_{HH} humanizado" comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} de origen natural, pero que se ha "humanizado", es decir, se ha sustituido uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de V_{HH} de origen natural (y en particular en las secuencias marco) por uno o más de los restos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio V_H de un anticuerpo convencional de 4 cadenas de un ser humano (p. ej., los indicados anteriormente). Esto puede realizarse de una manera por sí misma conocida, que será evidente para el experto, por ejemplo, en función de la descripción adicional del presente documento y la técnica anterior (p. ej., el documento WO 2008/020079). Una vez más, cabe señalar que dichos V_{HH} humanizados pueden obtenerse de cualquier manera adecuada por sí misma conocida y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a los polipéptidos que se han obtenido utilizando un polipéptido que comprende un dominio V_{HH} de origen natural como material de partida.

Un " V_H camelizado" comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de origen natural, pero que se ha "camelizado", es decir, se ha sustituido uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de origen natural de un anticuerpo convencional de 4 cadenas por uno o más de los restos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada. Esto puede realizarse de una manera por sí misma conocida, que será evidente para el experto, por ejemplo, en función de la descripción adicional del presente documento y la técnica anterior (p. ej., el documento WO 2008/020079). Dichas sustituciones "camelizantes" se insertan preferiblemente en posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfaz V_H - V_L , y/o en los denominados restos característicos de camélidos, como se definen en el presente documento (véanse, por ejemplo, el

documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann 1994 y 1996, mencionado anteriormente). Preferiblemente, la secuencia de V_H que se utiliza como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el V_H camelizado es preferiblemente una secuencia de V_H de un mamífero, más preferiblemente la secuencia de V_H de un ser humano, tal como una secuencia de V_H3 . Sin embargo, cabe señalar que dichos V_H camelizados pueden obtenerse de cualquier manera adecuada por sí misma conocida y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a los polipéptidos que se han obtenido utilizando un polipéptido que comprende un dominio V_H natural como material de partida.

Una estructura preferida de una secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina puede considerarse que comprende cuatro regiones marco ("FR"), a las que se hace referencia en la materia y en el presente documento como "región marco 1" ("FR1"); como "región marco 2" ("FR2"); como "región marco 3" ("FR3"); y como "región marco 4" ("FR4"), respectivamente; cuyas regiones marco están interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), denominadas en la materia y en el presente documento "región determinante de la complementariedad 1" ("CDR1"); "región determinante de la complementariedad 2" ("CDR2"); y "región determinante de la complementariedad 3" ("CDR3"), respectivamente.

Como se describe adicionalmente en el párrafo q) en las páginas 58 y 59 del documento WO 08/020079, los restos de aminoácidos de un dominio variable único de inmunoglobulina se pueden numerar de acuerdo con la numeración general para los dominios V_H proporcionada por Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, publicación n.º 91), aplicado a los dominios V_{HH} de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans 2000 (J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195; véase, por ejemplo, la figura 2 de esta publicación). Cabe señalar que, como es bien sabido en la técnica para los dominios V_H y para los dominios V_{HH} , el número total de restos de aminoácido en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de restos de aminoácido indicado por la numeración de Kabat (es decir,

una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más restos de aminoácido que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, en general, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los restos de aminoácidos en la secuencia real. El número total de restos de aminoácidos en un dominio V_H y un dominio V_{HH} estará normalmente en el intervalo de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. No obstante, cabe señalar que secuencias más pequeñas y más largas también pueden ser adecuadas para los fines descritos en el presente documento.

En la presente solicitud, a menos que se indique de otro modo, las secuencias de CDR se determinaron de acuerdo con Kabat (Martin 2010, *en*: Kontermann y Dübel (eds.), Antibody Engineering Vol. 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Capítulo 3, págs. 33-51). De acuerdo con este método, la FR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 1-30, la CDR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 31-35, la FR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 50-65, la FR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 66-94, la CDR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 95-102 y la FR4 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

La determinación de las regiones CDR también puede realizarse de acuerdo con diferentes métodos. En la presente solicitud, las secuencias de CDR también se determinaron de acuerdo con la definición de AbM tal como se describe en Martin 2010 (*en*: Kontermann y Dübel (Eds.) 2010, Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, capítulo 3, páginas 33-51). Según este método, la FR1 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 1-25, la CDR1 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 26-35, la FR2 comprende los

aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 50-58, la FR3 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 59-94, la CDR3 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 95-102 y la FR4 comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

En dicha secuencia de inmunoglobulina, las secuencias marco pueden ser cualquier secuencia marco adecuada, y los ejemplos de secuencias marco adecuadas quedarán claros para el experto, por ejemplo basándose en los manuales estándar y la divulgación adicional y la técnica anterior mencionadas en el presente documento.

Las secuencias marco son preferiblemente (una combinación adecuada de) secuencias marco de inmunoglobulina o secuencias marco que han derivado de secuencias marco de inmunoglobulina (por ejemplo, por humanización o camelización). Por ejemplo, las secuencias marco pueden ser secuencias marco derivadas de un dominio variable de cadena ligera (p. ej., una secuencia V_L) y/o de un dominio variable de cadena pesada (p. ej., una secuencia V_H o una secuencia V_{HH}). En un aspecto particularmente preferido, las secuencias marco son secuencias marco que han derivado de una secuencia de V_{HH} (en la que dichas secuencias marco pueden opcionalmente haberse humanizado parcial o totalmente) o son secuencias de V_H convencionales que se han camelizado (como se define en el presente documento).

En particular, las secuencias marco presentes en la secuencia de ISVD utilizada en la tecnología pueden contener uno o más restos característicos (como se define en el presente documento), de modo que la secuencia de ISVD es un V_{HH} , incluido un V_{HH} humanizado o V_H camelizado. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de (combinaciones adecuadas de) tales secuencias marco quedarán claros a partir de la divulgación adicional en el presente documento.

De nuevo, tal como se describe de manera general en el presente documento para las secuencias de inmunoglobulina, también es posible utilizar fragmentos adecuados (o combinaciones de fragmentos) de cualquiera de los anteriores, tales

como fragmentos que contienen una o más secuencias de CDR, convenientemente flanqueadas por una o más secuencias marco, y/o unidas a ellas, (por ejemplo, en el mismo orden que estas secuencias marco y las CDR pueden aparecer en la secuencia de inmunoglobulina de tamaño completo de la que procede el fragmento).

5 Sin embargo, debe tenerse en cuenta la tecnología no está limitada en cuanto al origen de la secuencia del ISVD (o de la secuencia de nucleótidos utilizada para expresarlo), ni en cuanto a la forma en que la secuencia del ISVD o la secuencia de nucleótidos es (o ha sido) generada u obtenida. Por tanto, las secuencias de ISVD pueden ser secuencias naturales (de cualquier especie adecuada) o secuencias
10 sintéticas o semisintéticas. En un aspecto específico, pero no limitante, la secuencia de ISVD es una secuencia natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia sintética o semisintética, incluidas, pero no de forma limitante, secuencias de inmunoglobulina "humanizadas" (como se definen en el presente documento) (tales como secuencias de inmunoglobulina de ratón o conejo parcial o totalmente
15 humanizadas y, en particular, secuencias de V_{HH} parcial o totalmente humanizadas), secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (como se definen en el presente documento) así como secuencias de inmunoglobulina que se han obtenido mediante técnicas tales como la maduración de la afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o naturales), injerto de
20 CDR, enchapado, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR utilizando cebadores solapantes y técnicas similares para la modificación por ingeniería genética de secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por el experto; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las anteriores.

25 Del mismo modo, las secuencias de nucleótidos pueden ser secuencias de nucleótidos naturales o secuencias sintéticas o semisintéticas, y pueden ser, por ejemplo, secuencias aisladas por PCR a partir de una plantilla natural adecuada (p. ej., ADN o ARN aislado de una célula), secuencias de nucleótidos que se han aislado de una biblioteca (y, en particular, de una biblioteca de expresión),
30 secuencias de nucleótidos que se han preparado introduciendo mutaciones en una

secuencia de nucleótidos natural (utilizando cualquier técnica adecuada por sí misma conocida, como la PCR de emparejamiento erróneo), secuencias de nucleótidos que se han preparado mediante PCR utilizando cebadores solapados, o secuencias de nucleótidos que se han preparado utilizando técnicas de síntesis de ADN por sí mismas conocidas.

Tal como se ha descrito anteriormente, un ISVD puede ser un ISVD o un fragmento adecuado del mismo. Para una descripción general de los ISVD, se hace referencia a la descripción adicional siguiente, así como a la técnica anterior mencionada en el presente documento. A este respecto, cabe señalar, sin embargo, que esta descripción y la técnica anterior describían principalmente ISVD de la denominada clase "V_H3" (es decir, ISVD con un alto grado de homología de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H3, tales como DP-47, DP-51 o DP-29). Sin embargo, cabe señalar que la tecnología en su sentido más amplio generalmente puede utilizar cualquier tipo de ISVD y, por ejemplo, también utiliza los ISVD pertenecientes a la denominada clase "V_H4" (es decir, los ISVD con un alto grado de homología de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H4, tales como DP-78), como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/118670.

Generalmente, los ISVD (en particular las secuencias de V_{HH}, incluidas las secuencias de V_{HH} (parcialmente) humanizadas y las secuencias de V_H camelizadas) pueden caracterizarse por la presencia de uno o más "restos característicos" (como se describe en el presente documento) en una o más de las secuencias marco (de nuevo como se describe adicionalmente en el presente documento). Por tanto, en general, un ISVD puede definirse como una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que uno o más de los restos característicos son como se definen adicionalmente en el presente documento.

En particular, un ISVD puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que las secuencias marco son como se definen adicionalmente en el presente documento.

Más en particular, un ISVD puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que

uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 de acuerdo con la numeración de Kabat se seleccionan de los restos característicos mencionados en la siguiente Tabla A-0.

Tabla A-0: Restos característicos en los ISVD

Posición	V _H 3 humano	Restos característicos
11	L, V; predominantemente L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; preferiblemente L
37	V, I, F; normalmente V	F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, preferiblemente F ⁽¹⁾ o Y
44 ⁽⁸⁾	G	E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; preferiblemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q ⁽³⁾ ; lo más preferiblemente G ⁽²⁾ o Q ⁽³⁾ .
45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; preferiblemente L ⁽²⁾ o R ⁽³⁾

5	47 ⁽⁸⁾	W, Y	F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ o W ⁽²⁾ G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; preferiblemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾
	83	R o K; normalmente R	R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; preferiblemente K o R; lo más preferiblemente K
	84	A, T, D; predominantemente A	P ⁽⁵⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; preferiblemente P
10	103	W	W ⁽⁴⁾ , R ⁽⁶⁾ , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P ⁽⁶⁾ , E, C; preferiblemente W
	104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferiblemente G
15	108	L, M o T; predominantemente L	Q, L ⁽⁷⁾ , R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L ⁽⁷⁾

Notas:

(1) En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

(2) Normalmente como GLEW en las posiciones 44-47.

(3) Generalmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, p. ej., como KEREL, KEREF, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW o KQREG en las posiciones 43-47. Como alternativa, también son posibles secuencias tales como TERE (por ejemplo, TEREL), TQRE (por ejemplo, TQREL), KECE (por ejemplo, KECCEL o KECER), KQCE (por ejemplo, KQCEL), RERE (por ejemplo, REREG), RQRE (por ejemplo, RQREL, RQREF o RQREW), QERE (por ejemplo, QEREG), QQRE, (por ejemplo, QQREW, QQREL o QQREF), KGRE (por ejemplo, KGREG), KDRE (por ejemplo, KDREV). Otras secuencias posibles pero menos preferidas son, por ejemplo, DECKL y NVCEL.

(4) Con GLEW en las posiciones 44-47 y KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

(5) A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de los dominios V_{HH} naturales.

(6) En particular, pero no exclusivamente, en combinación con GLEW en las posiciones 44-47.

(7) Con la salvedad de que cuando las posiciones 44-47 son GLEW, la posición 108 es siempre Q en las secuencias V_{HH} (no humanizadas) que también contienen una W en 103.

(8) El grupo GLEW también contiene secuencias similares a GLEW en las posiciones 44-47, tales como por ejemplo GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER y ELEW.

La tecnología utiliza, entre otras cosas, ISVD que pueden unirse al dominio constante de un TCR. En el contexto de la presente tecnología, "unirse a" una determinada molécula diana tiene el significado habitual en la materia como se entiende en el contexto de los anticuerpos y sus respectivos antígenos.

En consecuencia, las moléculas diana de los ISVD utilizados en la tecnología son el dominio constante del TCR.

La unión a TCR se puede conseguir, por ejemplo, mediante la unión a la subunidad TCR alfa y/o a la subunidad TCR beta. Un ejemplo es TCR de mamífero. Aunque se prefiere el TCR humano, las versiones de otras especies también son susceptibles de la presente tecnología, por ejemplo TCR de ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, caballos, cerdos, primates no humanos, tales como los macacos cangrejeros (también denominados en el presente documento "*cyno*"), o camélidos, tales como la llama o la alpaca.

Las secuencias de los dominios constantes TCR- α/β de origen humano y de macaco se proporcionan en la tabla A-1 (SEQ ID NO: 106 y 108 para el dominio constante de TCR α de origen humano y de macaco, respectivamente; SEQ ID NO: 107 y 109 para el dominio constante de TCR β de origen humano y de macaco, respectivamente). El origen de cada una de estas secuencias, expresado por un identificador de archivos de UniProt o Genbank, se enumera para cada una de las secuencias mencionadas anteriormente en la tabla A-1. La secuenciación interna

confirmó que las secuencias de aminoácidos procedentes originalmente de macaco de la India eran idénticas a las de macaco cangrejero.

En una realización, el ISVD se une específicamente al dominio constante de un receptor de linfocitos T α (TCR- α) humano (SEQ ID NO: 106) y/o al dominio constante del receptor de linfocitos T humano β (TCR- β) (SEQ ID NO: 107) o isoformas o variantes polimórficas de los mismos.

En una realización, la ISVD se une específicamente al dominio constante de un TCR de primate no humano. En una realización, el TCR de primate no humano es un TCR de macaco cangrejero o macaco de la India. En una realización, el TCR de macaco cangrejero o macaco de la India comprende el dominio constante de un TCR- α de SEQ ID NO: 108 y/o de un TCR- β de SEQ ID NO: 109, o variantes o isoformas polimórficas de los mismos.

Las isoformas son secuencias proteicas alternativas que se pueden generar a partir del mismo gen mediante uno solo evento biológico o mediante la combinación de varios de ellos, tales como el uso de promotores alternativos, el corte y empalme alternativo, el inicio alternativo y el desplazamiento del marco ribosómico, todas como se conocen en la materia.

Tabla A-1 Secuencias de aminoácidos relacionadas con TCR ("ID" se refiere a la SEQ ID NO dada, tal como se utiliza en el presente documento)

ID	Nombre	Secuencia de aminoácidos
106	Dominio constante de TCR alfa humano (derivado de P01848)	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK SFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS
107	Dominio constante de TCR beta humano (derivado de P01850)	EDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LNSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT

		SVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
5	108 TCR alfa de macaco de la India (AEA41863)	MLLLLVLVLEVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVSVSEG VPVLLRCNYSSSFSPYLFWYVQYPNQGLQLLLKY TSGTTLVKGINGFEAEFKKSETSFHLTKASAHVSD AAEYFCALARGALVFGKGTRLVIPNIQNPDPVAVY QLRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHI TDKTVLDMRSMDFKSNGAVAWSNKSDFACTSAF KDSVIPADTFFPGTESVCDANLVEKSFETDMNLNF QNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
10	109 TCR beta de macaco de la India (AEA41864)	MGFWTLCCVSFCILVAKHTDAGVIQLPRHEVTEM GKEVTLRCEPISGHSSLFWYRQTMMRGLEFLIYF NNKSPIDDSGMPKDRFSATMPDASFSTLKIQPSEP RDSAVYFCASTPGQGREKLFFGSGTQLSVLEDLK KVFPKPVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD HVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALEDS RYCLSSRLRVSATFWHNPVHFRQCQVQFYGLSE DDEWTEDRDKPITQKISAEVWGRADCGFTSVSYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALMLMAMVKRK DF
15	110 Cremallera TCR humana: cadena alfa	MNMRPVTSSVLVLLLMLRRSNGQLLEQSPQFLSI QEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPVLL VTVVTGGEVKKLKRLTFQFGDARKDSSLHITAAQP GDTGLYLCAGAGSQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKSVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCSSADLVPRGSTTA PSAQLKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQEQ KLISEEDL
20		
25		
30		

5	111	Cremallera humana: beta	TCR cadena	MSNTVLADSAWGITLLSWVTVFLLGTSSADGGITQ SPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDP GQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESF PLTVTSAQKNPTAFYLCASSSRSSYEQYFGPGTR LTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYSLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQV QFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADC SSADLVPRGSTTAPSAQLEKELQALEKENA QLEW ELQALEKELAQTGHHHHHHHHHHH
15	112	Cremallera de macaco cangrejero: cadena (derivada de AEA41865)	TCR de alfa	MLLITSVLVLWMQLSQVNGQQIMQIPQYQH VQEG EDFTTYCNSSTTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIMLVK SGEVKKQKRLIFQFGEAKKNSSLHITATQT TDVGT YFCATTGVNNLFFGTGTRLTVLPYIQNPDP AVYQL RGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITD KTVLDMRSMDFKSNGAVAWSNKSDFACTS AFKD SVIPADTFFPSPESSCSSADLVPRGSTTAPSA QLK KKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKKLAQE QKLISEED L
25	113	Cremallera de macaco cangrejero: cadena (derivada de AEA41866 y AEA41868)	TCR de beta	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKT GQSMTLQCAQDMNHDYMYWYRQDPGMGLRLIH YSVGEGSTEKGEVPDGYNVTRSNTEDFPLRLESA APSQTSVYFCASSYWTGRS YEQYFGPGTRLT VIE DLKKVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL EDSRYSLSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFYG LSEDEWTE DRDKPITQKISAEAWGRADCSSADL VPRGSTTAPSAQLEKELQALEKENA QLEWELQAL EKELAQTGHHHHHHHHHHH

5	114	Dominio constante de TCR alfa humano (derivado de P01848)	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC
	115	Dominio constante de TCR beta humano (derivado de P01850)	EDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LNDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC
10	116	Dominio constante de TCR-alfa de macaco cangrejero (derivado de AEA41865)	PYIQNPDPAVYQLRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMN VSQSKDSDVHITDKTVLDMRSMDFKSNGAVAWS NKSDFACTSAFKDSVIPADTFFPSPESSC
15	117	Dominio constante de TCR-beta de macaco cangrejero (derivado de AEA41868)	EDLKKVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LEDSTRYSLSRLRVSATFWHNPARNHFRCQVQFY GLSEDEWTEDEDRDKPITQKISAEAWGRADC

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente tecnología se refiere a un ISVD que se une específicamente a un dominio constante de un receptor de linfocitos T (TCR) humano y/o de primate no humano presente en un linfocito T, en donde dicho ISVD consiste esencialmente en 4 regiones marco (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en donde

- a. la secuencia de aminoácidos de CDR1 (de acuerdo con Kabat) es INFYG (SEQ ID NO: 79);
- b. la secuencia de aminoácidos de CDR2 (de acuerdo con Kabat) es HISIGDQTDYAX₁SAKG (SEQ ID NO: 80); y
- c. la secuencia de aminoácidos de CDR3 (de acuerdo con Kabat) es LSRIX₂PYDY (SEQ ID NO: 81);

en donde

- el resto de aminoácido X_1 se selecciona de E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F y S; y/o
- el resto de aminoácido X_2 se selecciona de Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L e I.

La secuencia ISVD también puede representarse usando la definición AbM para CDR tal como sigue. Un ISVD, que se une específicamente a un dominio constante de un receptor de linfocitos T (TCR) humano y/o de primate no humano presente en un linfocito T, en donde dicho ISVD consiste esencialmente en 4 regiones marco (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), en donde

- a. la secuencia de aminoácidos de CDR1 (de acuerdo con AbM) es GYVHKINFYG (SEQ ID NO: 82);
- b. la secuencia de aminoácidos de CDR2 (de acuerdo con AbM) es HISIGDQTD (SEQ ID NO: 83); y
- c. la secuencia de aminoácidos de CDR3 (de acuerdo con AbM) es LSRIX₂PYDY (SEQ ID NO: 84);

y en donde

- el residuo de aminoácido en la posición 61 (de acuerdo con Kabat) se selecciona de E, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F y S; y/o
- el resto de aminoácido X_2 se selecciona de Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L e I.

Los inventores encontraron que un ISVD con las CDR de acuerdo con la presente tecnología tenía potentes capacidades de unión a TCR y no tenía isomerización u oxidación de triptófano en las posiciones relevantes 61 y 99 (numeración de Kabat), respectivamente. Esto significa que la molécula es tanto eficaz para activar a los linfocitos T como para ser químicamente estable.

En una realización de la presente tecnología, la secuencia de aminoácidos del ISVD que se une específicamente al TCR humano puede presentar una identidad de secuencia de más de un 85 %, tal como más de un 90 %, más de un

95 % o más de un 99 %, con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, en donde las CDR son las definidas en el presente documento.

En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos del ISVD que se une específicamente al TCR humano puede presentar una identidad de secuencia de más de un 85 %, preferiblemente de al menos un 90 %, más preferiblemente de al menos un 95 %. Preferiblemente, la secuencia comprende la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 50 o la SEQ ID NO: 52, tal como la SEQ ID NO: 37 o la SEQ ID NO: 42.

En otra realización de la presente tecnología, la secuencia de aminoácidos del ISVD que se une específicamente al TCR humano puede presentar una identidad de secuencia de más de un 85 %, tal como más de un 90 %, más de un 95 % o más de un 99 %, con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, en la que, a efectos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, no se tienen en cuenta los restos de aminoácidos que forman las secuencias de las CDR.

En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos del ISVD que se une específicamente al TCR humano puede presentar una identidad de secuencia de más de un 85 %, preferiblemente de al menos un 90 %, más preferiblemente de al menos un 95 %, en la que, a efectos de determinar el grado de identidad de secuencia, se descartan los restos de aminoácidos que forman las secuencias de las CDR. Preferiblemente, la secuencia comprende la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 50 o la SEQ ID NO: 52, tal como la SEQ ID NO: 37 o la SEQ ID NO: 42.

Cuando el ISVD presenta una identidad de secuencia de más de un 85 %, tal como más de un 90 %, más de un 95 % o más de un 99 %, con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, el ISVD presenta preferiblemente al menos la mitad de la afinidad de unión, más preferiblemente al menos la misma afinidad de unión al TCR humano en comparación con uno de los ISVD expuestos en la tabla A-4, en donde la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como resonancia de plasmón superficial (SPR).

Además, cuando el ISVD presenta una identidad de secuencia de más de un 85 %, tal como más de un 90 %, más de un 95 % o más de un 99 %, con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, el ISVD presenta preferiblemente al menos la mitad de la potencia en la destrucción de células diana mediada por linfocitos T, más preferiblemente al menos la misma potencia en la destrucción de células diana mediada por linfocitos T en comparación con uno de los ISVD expuestos en la tabla A-4, en donde la destrucción de células diana mediada por linfocitos T se mide usando el mismo método, tal como un ensayo de destrucción de células mediado por linfocitos T basado en citometría de flujo o un ensayo de destrucción mediada por linfocitos T basado en impedancia.

El porcentaje de "*identidad de secuencia*" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos puede calcularse dividiendo [*el número de restos de aminoácidos de la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los restos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la segunda secuencia de aminoácidos*] por [*el número total de restos de aminoácidos de la primera secuencia de aminoácidos*] y multiplicando por [100 %], en la que cada eliminación, inserción, sustitución o adición de un resto de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos, en comparación con la primera secuencia de aminoácidos, se considera una diferencia en un único resto de aminoácido (es decir, en una única posición).

Normalmente, para determinar el porcentaje de "*identidad de secuencia*" entre dos secuencias de aminoácidos de acuerdo con el método de cálculo descrito anteriormente, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de restos de aminoácidos se tomará como la "*primera*" secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la "*segunda*" secuencia de aminoácidos.

Una "*diferencia de aminoácidos*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una eliminación, inserción o sustitución de un único resto de aminoácido con respecto a una secuencia de referencia, y, preferiblemente, es una sustitución.

En una realización de la presente tecnología, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas. Dichas sustituciones conservativas

preferiblemente son sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) - (e) se sustituye por otro resto de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) pequeños restos alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) restos polares con carga negativa y sus amidas (sin carga): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) restos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) grandes restos alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) restos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

En otra realización de la presente tecnología, las sustituciones conservativas son las siguientes: Ala en Gly o en Ser; Arg en Lys; Asn en Gln o en His; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; His en Asn o en Gln; Ile en Leu o en Val; Leu en Ile o en Val; Lys en Arg, en Gln o en Glu; Met en Leu, en Tyr o en Ile; Phe en Met, en Leu o en Tyr; Ser en Thr; Thr en Ser; Trp en Tyr; Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en Ile o en Leu.

En una realización de la presente tecnología, la secuencia de aminoácidos completa del ISVD se representa por la SEQ ID NO: 85, que es

X₀VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKV
AHISIGDQTDYAX₁SAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIX₂P
YDYX₃GQGTLVTVSS, en donde

- a. X₀ se selecciona de E y D.
- b. X₁ se selecciona del grupo que consiste en E, D N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F y S;
- c. X₂ se selecciona del grupo que consiste en Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L e I; y
- d. X₃ se selecciona del grupo que consiste en W, R, A, E, Y, L, H, I, Q, V, K, S, G, P, F y T.

En una realización de la presente tecnología, X₀ es D, y/o X₁ es E, y/o X₂ es cualquiera de Y, T, S o Q, y/o X₃ es W.

En otra realización de la presente tecnología, X₀ es E, y/o X₁ es E, y/o X₂ es cualquiera de Y, T, S o Q, y/o X₃ es W.

En una realización de la presente tecnología, X_0 es E, y/o X_1 es E, y/o X_2 es T, y/o X_3 es W.

En una realización adicional de la presente tecnología, X_0 es D, y/o X_1 es E, y/o X_2 es T, y/o X_3 es W.

5 En otra realización de la presente tecnología, X_0 es E, y/o X_1 es E, y/o X_2 es S, y/o X_3 es W.

En una realización de la presente tecnología, X_0 es D, y/o X_1 es E, y/o X_2 es S, y/o X_3 es W.

10 En una realización de la presente tecnología, X_0 es E, y/o X_1 es E, y/o X_2 es Q, y/o X_3 es W.

En otra realización de la presente tecnología, X_0 es D, y/o X_1 es E, y/o X_2 es Q, y/o X_3 es W.

En una realización adicional de la presente tecnología, X_0 es E, y/o X_1 es E, y/o X_2 es Y, y/o X_3 es W.

15 En una realización de la presente tecnología, X_0 es D, y/o X_1 es E, y/o X_2 es Y, y/o X_3 es W.

Los inventores encontraron que la sustitución del aminoácido en la primera posición de la secuencia (numeración de Kabat) de E por D podría prevenir la formación de piroglutamato, mientras que la eficacia del ISVD no se vio afectada.

20 En otra realización de la presente tecnología, el ISVD de acuerdo con la presente tecnología tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 37, 42, 46, 50 y 52.

En una realización adicional de la presente tecnología, el ISVD tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o la SEQ ID NO: 42.

25 Los inventores observaron que los ISVD de acuerdo con la presente tecnología con una E en la posición 61 y una Y, A, S o H en la posición 99 (numeración de Kabat) tenían una temperatura de fusión (T_m) similar o superior, una temperatura superior para el inicio de la agregación (T_{agg}) y una reducción de la fracción oligomérica en comparación con el ISVD T017000700 de referencia. Para
30 los ISVD con una E en la posición 61 y una Q o T en la posición 99 (numeración de

Kabat) no hubo una disminución significativa en la T_m , al tiempo que se mantenía o tenía una T_{agg} superior y una fracción oligomérica ($\Delta\%$ de oligo) similar o reducida.

Como tal, en una realización, el ISVD de acuerdo con la presente tecnología o un ISVD que presenta una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, tiene una temperatura de fusión (T_m) de al menos 71 °C, al menos 72 °C, preferiblemente al menos 72.5 °C, más preferiblemente al menos 73 °C.

En otra realización, el ISVD de acuerdo con la presente tecnología o un ISVD que presenta una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, tiene una temperatura de inicio de la agregación (T_{agg}) de al menos 67 °C, al menos 68 °C, al menos 69 °C, al menos 71 °C, preferiblemente al menos 72 °C, más preferiblemente al menos 73 °C.

En aún una realización adicional, el ISVD de acuerdo con la presente tecnología o un ISVD que presenta una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, tiene una fracción de oligomerización ($\Delta\%$ de oligo) inferior al 0.5 %, preferiblemente inferior al 0.4 %, más preferiblemente inferior al 0.3 %, incluso más preferiblemente inferior al 0.2 %, o incluso inferior al 0.1 %.

En la tabla A-4 se puede encontrar una lista de los ISVD generados. Además, las combinaciones de secuencias de CDR de los ISVD generados se pueden encontrar en la tabla A-5.

En una realización de la presente tecnología, el ISVD TCE tiene una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionada de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentadas en la tabla A-5.

En otra realización de la presente tecnología, el ISVD TCE tiene una secuencia de CDR1, CRD2 y CDR3 seleccionada de la combinación de secuencias de CDR presentadas en la misma fila en la tabla A-5.

5.2 Polipéptidos multiespecíficos

Los inventores encontraron que la introducción de determinadas mutaciones de aminoácidos, y combinaciones de las mismas, en las CDR del ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969) dio como resultado una unión mejorada a los dominios constantes de un TCR humano y/o de un TCR de primate no humano. Las mutaciones de aminoácidos adicionales en posiciones específicas dentro de la secuencia del ISVD podrían mejorar además la estabilidad química del ISVD, minimizando o incluso evitando la isomerización y la oxidación del triptófano.

Por lo tanto, en un aspecto de la presente tecnología, se proporciona un polipéptido que comprende un primer ISVD capaz de unirse específicamente a un dominio constante de un receptor de linfocitos T (TCR) humano y/o de primate no humano presente en un linfocito T y un segundo ISVD capaz de unirse específicamente a un primer antígeno en una célula diana, en donde dicho primer antígeno es diferente de dicho TCR, y en donde dicha célula diana es diferente de dicho linfocito T, en donde dichos primer y segundo ISVD consisten esencialmente en 4 regiones marco (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), y en donde el primer ISVD es un ISVD de acuerdo con la presente tecnología.

En este polipéptido multiespecífico, las regiones CDR son como se definen en el presente documento (véase el punto 5.1). Los inventores encontraron que un polipéptido que comprende un primer ISVD con las CDR de acuerdo con la presente tecnología tenía potentes capacidades de unión a TCR y no tenía isomerización u oxidación de triptófano en las posiciones importantes 61 y 99 (numeración de Kabat) respectivamente.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del primer ISVD tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, en el que la secuencia de las regiones CDR es tal como se define en el

presente documento, preferiblemente en donde la secuencia del primer ISVD comprende la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 50 o la SEQ ID NO: 52.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del primer ISVD tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con al menos una de las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2 a 57, preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95%, en el que, con el fin de determinar el grado de identidad de secuencia, se descartan los restos de aminoácidos que forman las secuencias de CDR, preferiblemente en donde la secuencia del primer ISVD comprende la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 50 o la SEQ ID NO: 52.

En otra realización, el primer ISVD tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 33 y/o 35 a 57, preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, en el que la secuencia de las regiones CDR es tal como se define en el presente documento, y en donde preferiblemente la secuencia comprende la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 50 o la SEQ ID NO: 52.

En otra realización, el primer ISVD tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 33 y/o 35 a 57, preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, en el que, a efectos de determinar el grado de identidad secuencial, se descartan los restos de aminoácidos que forman las secuencias de CDR, y en donde preferiblemente la secuencia comprende la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 50 o la SEQ ID NO: 52.

En una realización adicional, el primer ISVD comprende o consiste en la SEQ ID NO: 37 o la SEQ ID NO: 42.

En otra realización más, el primer ISVD comprende o consiste en la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 50 o la SEQ ID NO: 52.

Como se ha mostrado en los ejemplos proporcionados adicionalmente en el presente documento, la sustitución de restos de aminoácidos particulares en las posiciones 61 y 99 en T017000700 (SEQ ID NO: 1) no afectó a la afinidad del ISVD al dominio constante de un TCR humano y/o de primate no humano, mientras que las variantes resultantes tenían una mejor estabilidad química en comparación con el T017000700 desarrollado previamente (SEQ ID NO: 1). T017000978 (SEQ ID NO: 37) y T017000991 (SEQ ID NO: 42) resultaron ser particularmente potentes y estables. Adicionalmente, T017000995 (SEQ ID NO: 46), T017000999 (SEQ ID NO: 50) y T017001001 (SEQ ID NO: 52) mostraron una menor afinidad por TCR, pero mantuvieron una alta potencia en la destrucción celular, lo que sugiere que pueden tener una mejor biodistribución y, por lo tanto, el potencial de tener un efecto más específico en la diana.

En una realización de la presente tecnología, el polipéptido es al menos biespecífico, pero también puede ser, por ejemplo, triespecífico, tetraespecífico, pentaespecífico, etc. Además, el polipéptido es al menos bivalente, pero también puede ser, por ejemplo, trivalente, tetravalente, pentavalente, hexavalente, etc.

Los términos "*biespecífico*", "*triespecífico*", "*tetraespecífico*", "*pentaespecífico*", etc., entran, todos ellos, en el término "*multiespecífico*" y se refieren a la unión a dos, tres, cuatro, cinco, etc., moléculas diana diferentes, respectivamente.

Los términos "*bivalente*", "*trivalente*", "*tetravalente*", "*pentavalente*", "*hexavalente*", etc. entran, todos ellos, en el término "*multivalente*" e indican la presencia de dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc., unidades de unión/componentes básicos, respectivamente, tales como ISVD.

Por ejemplo, el polipéptido puede ser bivalente biespecífico, tal como un polipéptido que comprende o que consiste en dos ISVD, en donde un ISVD se une específicamente al dominio constante de un TCR humano y/o de primate no humano en un linfocito T y un ISVD se une específicamente a un antígeno diana específico de la superficie celular, en donde el TCR y el antígeno diana son preferiblemente humanos.

El polipéptido también puede ser biespecífico-trivalente, tal como un polipéptido que comprende o que consiste en tres ISVD, en donde dos ISVD se unen específicamente al mismo antígeno diana específico de la superficie celular y un ISVD se une específicamente al dominio constante de un TCR humano y/o de primate no humano en un linfocito T.

En otro ejemplo, el polipéptido puede ser triespecífico-trivalente, tal como un polipéptido que comprende o que consiste en tres ISVD, en donde un ISVD se une específicamente al dominio constante de un TCR humano y/o de primate no humano en un linfocito T, un ISVD se une específicamente a un primer antígeno en una célula diana y un ISVD se une específicamente a un segundo antígeno en la misma célula diana.

En aún otro ejemplo, el polipéptido triespecífico-trivalente, junto a un ISVD que se une específicamente al dominio constante de un TCR humano y/o de primate no humano en un linfocito T y un ISVD que se une específicamente a un primer antígeno en una célula diana, comprende un ISVD que se une específicamente a la seroalbúmina humana.

Los ejemplos adicionales de polipéptidos multiespecíficos multivalentes serán evidentes para el experto basándose en la divulgación del presente documento.

Dicho polipéptido puede ser al mismo tiempo biparatópico, por ejemplo, si dos ISVD se unen a dos epítopos diferentes del antígeno diana.

El término "biparatópico" se refiere a la unión a dos partes diferentes (por ejemplo, epítopos) de la misma molécula diana.

Los componentes, preferiblemente ISVD, de dichos polipéptidos multiespecíficos-multivalentes descritos en el presente documento pueden estar unidos entre sí mediante uno o más enlazadores adecuados, tales como enlazadores peptídicos.

El uso de enlazadores para conectar dos o más (poli)péptidos es bien conocido en la técnica.

Una clase de enlazador peptídico utilizado con frecuencia es el conocido como enlazador "Gly-Ser" o "GS". Se trata de enlazadores que consisten esencialmente en restos de glicina (G) y serina (S), y suelen comprender una o más repeticiones de un motivo peptídico, tal como el motivo GGGGS (SEQ ID NO: 86) (por ejemplo, que presenta la fórmula (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n en la que n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más). Algunos ejemplos a menudo utilizados de dichos enlazadores GS son los enlazadores 9GS (GGGGSGGGGS, SEQ ID NO: 87), enlazadores 15GS (n=3) y enlazadores 35GS (n=7). Se hace referencia, por ejemplo, en Chen *et al.* 2013 (Adv. Drug Deliv. Rev. 65(10): 1357–1369) y Klein *et al.* 2014 (Protein Eng. Des. Sel. 27 (10): 325-330). En el o los polipéptidos divulgados en el presente documento, se prefiere el uso de enlazadores 5GS y 9GS para unir los componentes del polipéptido entre sí. Preferiblemente, se utiliza un enlazador de menos de 10 aminoácidos para unir un primer ISVD capaz de unirse específicamente a TCR a un segundo ISVD capaz de unirse específicamente a un antígeno diana específico de la superficie celular.

En la tabla A-2 a continuación se proporcionan ejemplos de enlazadores adecuados.

Tabla A-2: Secuencias enlazadoras ("ID" se refiere a la SEQ ID NO utilizada en el presente documento)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Enlazador 3A	136	AAA
Enlazador 5GS	86	GGGGS
Enlazador 7GS	137	SGGSGGS
Enlazador 8GS	138	GGGGSGGS
Enlazador 9GS	87	GGGGSGGGGS
Enlazador 10GS	139	GGGGSGGGGS
Enlazador 15GS	140	GGGGSGGGGSGGGGS
Enlazador 18GS	141	GGGGSGGGGSGGGGSGGS
Enlazador 20GS	142	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

5

10

Enlazador 25GS	143	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
Enlazador 30GS	144	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
Enlazador 35GS	145	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
Enlazador 40GS	146	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
Bisagra G1	147	EPKSCDKTHTCPPCP
Bisagra 9GS-G1	148	GGGGS GGGSEPKSCDKTHTCPPCP
Región bisagra larga superior de llama	149	EPKTPKPQAAA
Bisagra G3	150	ELKTP LGDTTHTCPRCPEPKSCDT PPPCPRCPEPKS CDTPPPCPRCPEPKSCDT PPPCPRCP

15

Por lo tanto, en una realización, el polipéptido comprende un primer ISVD capaz de unirse específicamente al dominio constante de TCR humano y/o de primate no humano de acuerdo con la presente tecnología y un segundo ISVD capaz de unirse específicamente a un antígeno diana específico de la superficie celular, que están unidos por enlazadores 5GS y/o 9GS.

20

En otra realización de la presente tecnología, el polipéptido comprende un primer ISVD capaz de unirse específicamente al dominio constante del TCR humano y/o de primate no humano de acuerdo con la presente tecnología y un segundo ISVD capaz de unirse específicamente a un antígeno diana específico de la superficie celular, que están unidos por enlazadores 9GS.

25

Los inventores encontraron de manera sorprendente que dicha configuración puede aumentar la eficacia del polipéptido para provocar una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T.

30

Se apreciará (tal como se demuestra también en la sección de ejemplos) que el ISVD de unión a TCR y los ISVD que se unen al primer antígeno en una célula diana pueden posicionarse en cualquier orden en el polipéptido multiespecífico-multivalente de la presente tecnología.

Por consiguiente, es una realización de la presente tecnología, el polipéptido comprende o consiste en lo siguiente, en el orden que comienza desde el extremo N del polipéptido: un primer ISVD que se une específicamente a TCR, un segundo ISVD que se une específicamente a un antígeno diana específico de la superficie celular y una unidad de unión opcional que proporciona al polipéptido una semivida aumentada como se define en el presente documento. En una realización, los ISVD están unidos mediante un enlazador 9GS. La unidad de unión que proporciona al polipéptido una semivida aumentada es preferiblemente un ISVD, que se une preferiblemente a la seroalbúmina.

Dichas configuraciones del polipéptido pueden proporcionar potencias fuertes con respecto al tratamiento del cáncer.

Una vez más, no se excluye que otras unidades de unión/componentes básicos, tales como ISVD adicionales que se unen a antígenos adicionales en una célula diana, o que se unen a otra diana, puedan estar presentes en el polipéptido. Además, no excluye la posibilidad de que se puedan colocar entre medias otras unidades de unión/componentes básicos, tales como ISVD. Por ejemplo, tal como se describe adicionalmente a continuación (véase en particular, la sección 5.4 "(Extensión de la semivida *in vivo*)" más adelante), el polipéptido puede comprender además otro ISVD que se une específicamente a la seroalbúmina humana que incluso puede ubicarse entre, por ejemplo, el "primer ISVD" y "segundo ISVD".

El segundo ISVD del polipéptido de la presente tecnología se une específicamente a un antígeno en una célula diana, preferiblemente una célula cancerosa. Una "célula diana", tal como se cita en el presente documento, es una célula que presenta un antígeno particular en su superficie. En una realización, la "célula diana" es una célula cancerosa.

La membrana (también denominada membrana plasmática o bicapa fosfolipídica) rodea el citoplasma de una célula, que es el límite externo de la célula, es decir, la membrana es la superficie de la célula. Esta membrana sirve para separar y proteger una célula de su entorno circundante y está hecha principalmente de una doble capa de fosfolípidos. Dentro de esta membrana hay una variedad de

moléculas de proteína, tales como canales, bombas y receptores celulares. Dado que la membrana es fluida, las moléculas de proteína pueden viajar dentro de la membrana. La expresión "antígeno en una célula diana", tal como se utiliza en la presente, indica una molécula, que se presenta en la superficie de una célula. En la mayoría de los casos, esta molécula se ubicará en o sobre la membrana plasmática de la célula de modo que al menos parte de esta molécula permanezca accesible desde el exterior de la célula en forma terciaria. Un ejemplo no limitante de una molécula de la superficie celular, que se encuentra en la membrana plasmática, es una proteína transmembrana que comprende, en su conformación terciaria, regiones de hidrofilia e hidrofobia. Aquí, al menos una región hidrófoba permite que la molécula de la superficie celular se incruste o inserte en la membrana plasmática hidrófoba de la célula mientras que las regiones hidrófilas se extienden a cada lado de la membrana plasmática hacia el citoplasma y el espacio extracelular, respectivamente.

Dicho antígeno puede ser cualquier diana en una célula, por ejemplo, un antígeno tumoral. En una realización, dicho antígeno es específico para dicha célula diana, por ejemplo, una célula cancerosa, tal como un antígeno tumoral o un antígeno asociado a tumor (TAA, del inglés *tumor associated antigen*) en dicha célula cancerosa.

La expresión "antígeno tumoral", como se utiliza en el presente documento, puede entenderse como aquellos antígenos que se presentan en las células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse en la superficie celular con una parte extracelular, que a menudo se combina con una parte transmembrana y citoplasmática de la molécula. En ocasiones, estos antígenos pueden estar presentes únicamente en células tumorales y nunca en una célula normal o sana. Los antígenos tumorales pueden expresarse exclusivamente en células tumorales o pueden representar una mutación específica de tumor en comparación con células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos de tumor. Sin embargo, este no será el caso en general. Los más comunes son antígenos que están presentes en células tumorales y en células normales, y se denominan

"antígenos asociados a tumor (TAA)". Estos antígenos asociados a tumores pueden sobreexpresarse en células tumorales en comparación con células normales o son más accesibles para la unión de anticuerpos en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido tumoral en comparación con el tejido normal.

5 Los TAA son preferiblemente antígenos que se expresan en células de tumores particulares, pero que preferiblemente no se expresan en células normales. A menudo, los TAA son antígenos que se expresan normalmente en células solo en momentos particulares en el desarrollo de un organismo (tal como durante el desarrollo fetal) y que se expresan inapropiadamente en el organismo en el presente
10 momento de desarrollo, o son antígenos que no se expresan en tejidos o células normales de un órgano que ahora expresa el antígeno.

En una realización, dicho primer antígeno en una célula diana es un antígeno asociado a tumor (TAA).

15 En una realización, dicho primer antígeno en una célula diana está presente más abundantemente en una célula cancerosa que en una célula normal. El antígeno en una célula diana es preferiblemente un antígeno asociado a tumor (TAA).

En una realización, dicho primer antígeno en una célula diana es un antígeno tumoral o un antígeno específico de tumor (TSA, del inglés *tumor specific antigen*).

20 En una realización, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos de la tecnología actual comprenden un segundo ISVD que se une específicamente a CD123 o glipicano-3.

25 En una realización adicional, el polipéptido de acuerdo con la presente tecnología comprende además un tercer ISVD, que se une específicamente a un segundo antígeno en una célula diana.

La célula diana a la que se unen los polipéptidos de la presente tecnología se refiere en particular a células de mamífero, preferiblemente a células de primate y, aún más preferiblemente, a células humanas. La célula diana es preferiblemente una célula hiperproliferativa, tal como, por ejemplo, una célula cancerosa.

En otra realización de la presente tecnología, el polipéptido multiespecífico multivalente presenta una unión reducida por anticuerpos preexistentes en suero humano. Con este fin, en una realización de la presente tecnología, el polipéptido presenta una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición de aminoácido 89 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un ISVD (y preferiblemente el ISVD en el extremo C del polipéptido), pero preferiblemente en cada ISVD.

En otra realización de la presente tecnología, el polipéptido presenta una prolongación de 1 a 5 aminoácidos (preferiblemente de origen natural), tal como una sola prolongación de alanina (A), en el extremo C del ISVD carboxiterminal. El extremo C de un ISVD es normalmente VTVSS (SEQ ID NO: 88).

En otra realización de la presente tecnología, el polipéptido presenta una lisina (K) o una glutamina (Q) en la posición 110 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un ISVD.

En otra realización de la presente tecnología, el ISVD presenta una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 112 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un ISVD. En estas realizaciones, el extremo C del ISVD es VKVSS (SEQ ID NO: 89), VQVSS (SEQ ID NO: 90), VTVKS (SEQ ID NO: 91), VTVQS (SEQ ID NO: 92), VKVKS (SEQ ID NO: 93), VKVQS (SEQ ID NO: 94), VQVKS (SEQ ID NO: 95), o VQVQS (SEQ ID NO: 96) de modo que después de la adición de una única alanina, el extremo C del polipéptido presenta, por ejemplo, la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 97), VKVSSA (SEQ ID NO: 98), VQVSSA (SEQ ID NO: 99), VTVKSA (SEQ ID NO: 100), VTVQSA (SEQ ID NO: 101), VKVKSA (SEQ ID NO: 102), VKVQSA (SEQ ID NO: 103), VQVKSA (SEQ ID NO: 104), o VQVQSA (SEQ ID NO: 105), preferiblemente VTVSSA.

En otra realización de la presente tecnología, el polipéptido presenta una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición de aminoácido 89 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos el ISVD carboxiterminal, opcionalmente una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 110 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un ISVD, y presenta una

prolongación de 1 a 5 aminoácidos (preferiblemente de origen natural), tal como una única prolongación de alanina (A), en el extremo C del ISVD carboxiterminal (de manera que el extremo C del polipéptido consiste en, por ejemplo, la secuencia VTVSSA, VKVSSA o VQVSSA, preferiblemente VTVSSA). Véanse, p. ej., los documentos WO2012/175741 y WO2015/173325 para más información al respecto.

Como se desprende claramente de la descripción anterior y del presente documento, los ISVD de la presente tecnología se pueden utilizar como "componentes básicos" para formar polipéptidos de la presente tecnología, *por ejemplo*, combinándolos adecuadamente con otros grupos, restos, fracciones o unidades de unión, para formar compuestos o construcciones como las descritas en el presente documento (tal como, sin limitaciones, los polipéptidos bi-/tri-/tetra-/multivalentes y bi-/tri-/tetra-/multiespecíficos de la presente tecnología descritos en el presente documento), que combinan en una molécula una o más propiedades o funciones biológicas deseadas. Un polipéptido con múltiples ISVD también se denomina en el presente documento "construcción" o "formato de ISVD".

5.3 Especificidad

Los términos y expresiones "*especificidad*", "*que se une específicamente*" o "*unión específica*" se refieren al número de moléculas diana diferentes, tales como antígenos, del mismo organismo a las que una unidad de unión particular, tal como un ISVD, puede unirse con una afinidad suficientemente elevada (véase más adelante). "*Especificidad*", "*que se une específicamente*" o "*unión específica*" se utilizan indistintamente en el presente documento con "*selectividad*", "*que se une selectivamente*" o "*unión selectiva*". Las unidades de unión, como los ISVD, se unen de manera específica preferiblemente a sus dianas designadas.

La especificidad/selectividad de una unidad de unión se puede determinar en función de la afinidad. La afinidad indica la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se suele expresar mediante la K_D o constante de disociación que se expresa en unidades de mol/litro (o M). La afinidad también se puede expresar como una constante de asociación, K_A , que es igual a $1/K_D$ y se expresa en unidades de $(\text{mol/litro})^{-1}$ (o M^{-1}).

La afinidad es una medida de la fuerza de unión entre una fracción y un sitio de unión en la molécula diana: cuanto menor sea el valor de la K_D , mayor será la fuerza de unión entre una molécula diana y una fracción diana.

Normalmente, las unidades de unión utilizadas en la presente tecnología (tales como ISVD) se unirán a sus dianas con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} mol/litro o inferior, preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} mol/litro o inferior y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} mol/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litro/mol o superior, preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litro/mol o superior y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litro/mol).

Cualquier valor de K_D superior a 10^{-4} mol/litro (o cualquier valor de K_A inferior a 10^4 litro/mol) se considera generalmente indicativo de unión inespecífica.

Las K_D para interacciones biológicas, tales como la unión de secuencias de inmunoglobulina a un antígeno, que se consideran específicas suelen estar en el intervalo de 10^{-5} mol/litro (10000 nM o 10 μ M) a 10^{-12} mol/litro (0.001 nM o 1 pM) o inferior.

En consecuencia, la unión específica/selectiva puede significar que, utilizando el mismo método de medición, por ejemplo, SPR, una unidad de unión (o polipéptido que la comprende) se une a TCR con un valor de K_D de 10^{-5} a 10^{-12} mol/litro o inferior y se une a dianas relacionadas con un valor de K_D superior a 10^{-4} mol/litro.

Por lo tanto, el ISVD presenta preferiblemente al menos la mitad de la afinidad de unión, más preferiblemente al menos la misma afinidad de unión, al TCR humano en comparación con un ISVD que consiste en el aminoácido de la SEQ ID NO: 1, en donde la afinidad de unión se mide utilizando el mismo método, tal como SPR.

La unión específica a una diana determinada de una especie determinada no excluye que la unidad de unión también pueda unirse específicamente a la diana análoga de una especie diferente. Por ejemplo, la unión específica al TCR humano no excluye que la unidad de unión (o un polipéptido que la comprende) también pueda unirse específicamente al TCR de macacos cangrejeros.

Cuando se dice que un ISVD presenta "reactividad cruzada mejorada para la unión a TCR de humano y de primate no humano" en comparación con otro ISVD, significa que para dicho ISVD, la relación de la actividad de unión (tal como se expresa en términos de K_D o k_{off}) para TCR humano y para TCR de primate no humano es inferior a la misma relación calculada para los otros ISVD en el mismo ensayo.

La buena reactividad cruzada para la unión a TCR humano y de primate no humano permite la evaluación de la toxicidad de un polipéptido multiespecífico que activa el linfocito T en estudios preclínicos realizados en primates no humanos.

La unión específica de una unidad de unión a su diana designada puede determinarse de cualquier manera adecuada en sí misma conocida, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), enzoinmunoensayos (EIA) y ensayos de competencia de tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas per se en la técnica; así como las demás técnicas mencionadas en el presente documento.

La constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente, como será evidente para el experto. Los métodos para determinar la constante de disociación serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas a continuación. A este respecto, también quedará claro que puede no ser posible medir constantes de disociación de más de 10^{-4} mol/litro o 10^{-3} mol/litro (p. ej., de 10^{-2} mol/litro). Opcionalmente, como también será evidente para el experto, la constante de disociación (real o aparente) puede calcularse a partir de la constante de asociación (real o aparente) (K_A), mediante la relación [$K_D = 1/K_A$].

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse mediante diferentes técnicas conocidas en sí mismas, como la conocida técnica de biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) (véase, por ejemplo, Ober et al. 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559). La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biespecíficas en tiempo real mediante

la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, donde una molécula se inmoviliza en el chip de biosensor y la otra molécula pasa por encima de la molécula inmovilizada en condiciones de flujo, lo que produce mediciones de k_{on} , k_{off} y, por lo tanto, valores de K_D (o K_A). Esto puede realizarse, por ejemplo, utilizando el conocido sistema BIAcore® (BIAcore International AB, una empresa de GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jonsson *et al.* (1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26), Jonsson *et al.* (1991, Biotechniques 11: 620-627), Johnsson *et al.* (1995, J. Mol. Recognit. 8: 125-131) Y Johnson *et al.* (1991, Anal. Biochem. 198: 268-277).

Otra técnica de biosensores bien conocida para determinar afinidades de interacciones biomoleculares es la interferometría de biocapa (BLI) (véase, por ejemplo, Abdiche *et al.* 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217). La expresión "interferometría de biocapas" o "BLI", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una técnica óptica sin etiquetas que analiza el patrón de interferencia de la luz reflejada desde dos superficies: una capa de referencia interna (haz de referencia) y una capa de proteína inmovilizada en la punta del biosensor (haz de señal). Un cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia, que se reporta como un cambio de longitud de onda (nm), cuya magnitud es una medida directa del número de moléculas unidas a la superficie de la punta del biosensor. Dado que las interacciones pueden medirse en tiempo real, pueden determinarse las tasas de asociación y disociación y las afinidades. La BLI puede realizarse, por ejemplo, utilizando los conocidos sistemas Octet® (ForteBio, una división de Pall Life Sciences, Menlo Park, EE. UU.).

Como alternativa, las afinidades pueden medirse en un ensayo cinético de exclusión (KinExA) (véase, por ejemplo, Drake *et al.* 2004, Anal. Biochem., 328: 35-43), utilizando la plataforma KinExA® (Sapidyne Instruments Inc, Boise, EE. UU.). El término "KinExA", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un método basado en soluciones para medir la verdadera afinidad de unión en equilibrio y la cinética de moléculas no modificadas. Las soluciones equilibradas de

un complejo anticuerpo/antígeno se pasan por una columna con perlas recubiertas previamente con antígeno (o anticuerpo), permitiendo que el anticuerpo (o antígeno) libre se una a la molécula aplicada como recubrimiento. La detección del anticuerpo (o antígeno) así capturado se realiza con una proteína marcada con fluorescencia que se une al anticuerpo (o antígeno).

El sistema de inmunoensayo GYROLAB® proporciona una plataforma para el bioanálisis automatizado y la rápida entrega de muestras (Fraley *et al.* 2013, Bioanalysis 5: 1765-74).

En una realización, el ISVD de la presente tecnología tiene una constante de asociación (k_{on}) para la unión al TCR humano seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente tal como se mide por SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25° .

En una realización, la ISVD de la presente tecnología tiene una k_{on} para la unión al TCR de primate no humano seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferiblemente tal como se mide mediante SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25°C .

En una realización, el ISVD de la presente tecnología tiene una k_{off} para la unión al TCR humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-1}s^{-1} , como máximo aproximadamente 10^{-2}s^{-1} , como máximo aproximadamente 10^{-3}s^{-1} y como máximo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} , preferiblemente tal como se mide por SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25°C .

En una realización, el ISVD de la presente tecnología tiene una k_{off} para la unión al TCR de primate no humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-1}s^{-1} , como máximo aproximadamente 10^{-2}s^{-1} , como máximo aproximadamente 10^{-3}s^{-1} y como máximo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} ,

preferiblemente tal como se mide por SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C.

Los ISVD con una Y, F, H, K, L o R en la posición 99 mostraron una k_{off} particularmente ventajosa en comparación con los ISVD con un aminoácido diferente en la posición 99. Como tal, en una realización, el ISVD tiene Y, F, H, K, L o R en la posición 99. En una realización, el ISVD tiene Y, F, H o R en la posición 99.

Los ISVD con W, A, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V o Y en la posición 103 (numeración de Kabat) mostraron una k_{off} ventajosa particular en comparación con ISVD con otro aminoácido en la posición 103. Como tal, en una realización, el ISVD tiene W, A, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V o Y en la posición 103. En una realización, el ISVD tiene W, A, E, F, H, I, K, L, Q, S, T o V en la posición 103.

Los ISVD con A, E, F, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V o Y en la posición 61 (numeración de Kabat) mostraron una k_{off} que era tan buena como un ISVD TCE de referencia con una D en la posición 61. Dado que la isomerización se observó en D61 en dicho ISVD de referencia, hubo una necesidad de obtener ISVD con una velocidad de disociación al menos similar con un aminoácido diferente en la posición 61. Por lo tanto, en una realización, el ISVD tiene A, E, F, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V o Y en la posición 61, preferiblemente el ISVD tiene una E en la posición 61.

En una realización, el ISVD de la presente tecnología tiene una afinidad (K_D) para unirse al TCR humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-6} M, como máximo aproximadamente 10^{-7} M, como máximo aproximadamente 10^{-8} M y como máximo aproximadamente 10^{-9} M, preferiblemente tal como se mide por SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C.

En una realización, el ISVD de la presente tecnología tiene una K_D para unirse al TCR de primate no humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-5} M, como máximo aproximadamente 10^{-6} M, como máximo aproximadamente 10^{-7} M y como máximo aproximadamente 10^{-8} M,

preferiblemente tal como se mide por SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C.

En algunas realizaciones, los ISVD de unión al TCR de la presente tecnología se unen al TCR humano con la misma constante de disociación (k_{off}) o inferior en comparación con la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el ISVD de la presente tecnología se une a TCR de primate no humano con la misma k_{off} o inferior en comparación con un ISVD de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, los ISVD de unión al TCR de la presente tecnología se unen al TCR humano con la misma constante de disociación (k_{off}) o inferior en comparación con el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969).

En algunas realizaciones, el ISVD de la presente tecnología se une al TCR de primate no humano con la misma k_{off} o inferior en comparación con el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969). La velocidad de disociación (k_{off}) se puede medir mediante cualquier método conocido por el experto. En una realización, la velocidad de disociación (k_{off}) se mide mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C.

Los inventores descubrieron que los ISVD de acuerdo con la presente tecnología con una afinidad (K_D) que era igual o superior a la del ISVD T017000700 de referencia (SEQ ID NO: 1) también tenían una potencia similar o superior a dicho ISVD de referencia cuando se sometió a ensayos de destrucción celular.

Sorprendentemente, los inventores encontraron un subconjunto de los ISVD de la presente tecnología con una afinidad (K_D) por la unión al TCR humano que era más de 40 veces inferior que la del ISVD T017000700 de referencia (SEQ ID NO: 1), pero que mantuvo una alta potencia en los ensayos de destrucción celular. Estos ISVD particulares con una E en la posición 61 y una Q, S o T en la posición 99 (numeración de Kabat) presentan una oportunidad interesante en la generación de agentes bioterapéuticos con una mejor biodistribución.

En una realización, el ISVD de la presente tecnología tiene una reactividad cruzada mejorada para la unión a TCR humano y de primate no humano en comparación con el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969). Por consiguiente, en una realización particular, el

5 ISVD de la presente tecnología tiene una k_{off} para la unión a TCR de primates no humanos que está dentro del intervalo de 5 veces de la k_{off} para la unión al TCR humano.

En otra realización, el ISVD de la presente tecnología se une al TCR humano con la misma K_D o inferior en comparación con la SEQ ID NO: 1, preferiblemente tal

10 como se mide mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C. En otra realización, el ISVD de la presente tecnología se une a TCR de primate no humano con la misma K_D o inferior en comparación con la SEQ ID NO: 1, preferiblemente tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), preferiblemente

15 realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C. En otra realización, el ISVD de la presente tecnología se une al TCR humano con la misma K_D o inferior en comparación con el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969), preferiblemente tal como se mide por resonancia de plasmón superficial (SPR), preferiblemente realizada en un

20 instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C. En otra realización, el ISVD de la presente tecnología se une a TCR de primate no humano con la misma K_D o inferior en comparación con el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969), preferiblemente tal como se mide por resonancia de plasmones superficiales (SPR), preferiblemente realizada en un

25 instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C.

En una realización, el ISVD de la presente tecnología tiene (i) una afinidad (K_D) para unirse al TCR humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-6} M, como máximo aproximadamente 10^{-7} M, como máximo aproximadamente 10^{-8} M, como máximo aproximadamente 10^{-8} M y como

30 máximo aproximadamente 10^{-9} M, y (ii) tiene una K_D para la unión al TCR de primate

no humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-5} M, como máximo aproximadamente 10^{-6} M, como máximo aproximadamente 10^{-7} M y como máximo aproximadamente 10^{-8} M, preferiblemente tal como se mide por SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C.

En una realización, el ISVD de la presente tecnología muestra reactividad cruzada mejorada, es decir, la relación de actividad de unión (tal como se expresa en términos de K_D o K_{off}) para la unión a TCR humano y de primate no humano es inferior en comparación con la misma relación para el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969), dicha K_D o K_{off} preferiblemente determinada por SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C.

Por ejemplo, el ISVD de la presente tecnología muestra una menor diferencia en la reactividad cruzada de ser humano-macaco cangrejero basándose en la K_D en comparación con la diferencia en la reactividad cruzada de ser humano-macaco cangrejero por el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969). Preferiblemente, la K_D se determina por SPR, preferiblemente realizada en un instrumento Proteon XPR36, preferiblemente a 25 °C.

5.4 Prolongación de la semivida (*in vivo*)

Como se divulga anteriormente en el presente documento, el polipéptido de acuerdo con la presente tecnología puede comprender además uno o más grupos, restos, fracciones o unidades de unión diferentes, opcionalmente unidos mediante uno o más enlazadores peptídicos, en el que dichos uno o más grupos, restos, fracciones o unidades de unión diferentes proporcionan al polipéptido una semivida (*in vivo*) aumentada, en comparación con el polipéptido correspondiente sin dichos uno o más grupos, restos, fracciones o unidades de unión diferentes. La prolongación de la semivida *in vivo* significa, por ejemplo, que el polipéptido presenta una semivida aumentada en un mamífero, tal como un sujeto humano, tras su administración. La semivida se puede expresar, por ejemplo, como $t_{1/2\beta}$.

El tipo de grupos, restos, fracciones o unidades de unión generalmente no está restringido y puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una porción Fc y pequeñas proteínas o péptidos que pueden unirse a proteínas séricas.

De manera más específica, dichos uno o más grupos, restos, fracciones o unidades de unión diferentes que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada pueden seleccionarse del grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana, o a una inmunoglobulina sérica, tal como IgG, y preferiblemente es una unidad de unión que puede unirse a seroalbúmina humana. La unidad de unión es preferiblemente un ISVD.

Por ejemplo, el documento WO 04/041865 describe ISVD que se unen a la seroalbúmina (y en particular a la seroalbúmina humana) que puede unirse a otras proteínas (tal como uno o más de otros ISVD que se unen a una diana deseada) con el fin de aumentar la semivida de dicha proteína.

La solicitud internacional WO 06/122787 describe una serie de ISVD contra la seroalbúmina (humana). Estos ISVD incluyen el ISVD denominado Alb-1 (SEQ ID NO: 52 en el documento WO 06/122787) y variantes humanizadas del mismo, tal como Alb-8 (SEQ ID NO: 62 en el documento WO 06/122787). Una vez más, pueden utilizarse para prolongar la semivida de proteínas y polipéptidos terapéuticos y otras entidades o moléculas terapéuticas.

Además, el documento WO2012/175400 describe una versión mejorada de Alb-1, denominada Alb-23.

En una realización de la presente tecnología, el polipéptido comprende una fracción de unión a la seroalbúmina seleccionada de Alb-1, Alb-3, Alb-4, Alb-5, Alb-6, Alb-7, Alb-8, Alb-9, Alb-10 y Alb-23, preferiblemente Alb-8 o Alb-23 o sus variantes, como se muestra en las páginas 7 a 9 del documento WO2012/175400 y los agentes de unión a albúmina descritos en los documentos WO2012/175741,

WO2015/173325, WO2017/080850, WO2017/085172, WO2018/104444, WO2018/134235 y WO2018/134234.

En otra realización, el polipéptido comprende una fracción de unión a seroalbúmina seleccionada de la tabla A-3.

5 **Tabla A-3: Secuencias de ISVD de unión a la seroalbúmina ("ID" se refiere a la SEQ ID NO tal y como se utiliza en el presente documento)**

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Alb8	118	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb8-A	119	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb23	120	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23-A	121	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb83	122	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT LYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb83-A	123	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT LYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	124	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS

5	Alb132-A	125	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
	Alb73	126	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSS
	Alb73-A	127	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
10	Alb82	128	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
15	Alb82-A	129	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
	Alb199	130	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSS
20	Alb199-A	131	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
25	Alb23002	132	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
	Alb223	133	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

Alb216	134	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSS
Alb216-A	135	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA

Cuando un ISVD de este tipo que se une a la seroalbúmina humana está en una posición carboxiterminal, puede presentar una prolongación carboxiterminal de alanina (A) o de glicina (G) (preferiblemente A). En algunas realizaciones de la presente tecnología, el ISVD que se une a la seroalbúmina humana tiene otra posición que la posición carboxiterminal (es decir, no es el ISVD carboxiterminal del polipéptido).

5.5 Moléculas de ácido nucleico

También se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica los ISVD o polipéptidos como se divulgan en el presente documento.

Una "molécula de ácido nucleico" (utilizado indistintamente con "ácido nucleico") es una cadena de monómeros de nucleótidos unidos entre sí a través de una cadena principal de fosfato para formar una secuencia de nucleótidos. Un ácido nucleico puede utilizarse para transformar/transfectar una célula hospedadora u organismo hospedador, por ejemplo, para la expresión y/o producción de un polipéptido. Los hospedadores o células hospedadoras adecuadas para fines de producción serán evidentes para el experto y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Un hospedador o célula hospedadora (no humana) que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido también está abarcado por la tecnología.

Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN, ARN o un híbrido de los mismos, y también puede comprender nucleótidos modificados (p. ej., químicamente), como el PNA. Puede ser monocatenario o bicatenario y está

preferiblemente en forma de ADN bicatenario. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden ser ADN genómico o ADNc.

Los ácidos nucleicos se pueden preparar u obtener de una manera conocida, y/o se pueden aislar de una fuente natural adecuada. Las secuencias de nucleótidos que codifican (poli)péptidos de origen natural pueden, por ejemplo, someterse a mutagénesis dirigida al sitio, a fin de proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido con variación de secuencia. Además, como quedará claro para el experto, para preparar un ácido nucleico, también pueden unirse de manera adecuada varias secuencias de nucleótidos, tales como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una fracción diana y, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican uno o más enlazadores.

Las técnicas para generar ácidos nucleicos serán evidentes para el experto y pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitación, síntesis automatizada de ADN; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más secuencias naturales y/o sintéticas (o dos o más partes de las mismas), introducción de mutaciones que conducen a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (p. ej., para crear casetes y/o regiones que puedan digerirse y/o ligarse fácilmente utilizando enzimas de restricción adecuadas) y/o introducción de mutaciones mediante una reacción de PCR utilizando uno o más cebadores "no coincidentes".

5.6 Vectores

También se proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica los ISVD y/o polipéptidos como se divulga en el presente documento.

Un "vector" como se utiliza en el presente documento es un vehículo adecuado para transportar material genético a una célula. Un vector incluye ácidos nucleicos no marcados, tales como plásmidos o ARNm, o ácidos nucleicos incrustados en una estructura más grande, tales como liposomas o vectores víricos.

En general, los vectores comprenden al menos un ácido nucleico que está opcionalmente unido a uno o más elementos reguladores, tal como, por ejemplo,

uno o más promotor(es), potenciador(es), terminador(es) adecuados, etc. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión, es decir, un vector adecuado para expresar un polipéptido o construcción codificado en condiciones adecuadas, por ejemplo, cuando el vector se introduce en una célula (por ejemplo, humana).

5 Para los vectores basados en ADN, estos incluyen normalmente la presencia de elementos para la transcripción (por ejemplo, un promotor y una señal PolyA) y la traducción (por ejemplo, secuencia Kozak).

Preferiblemente, en el vector, dicho al menos un ácido nucleico y dichos elementos reguladores están "operativamente unidos" entre sí, por lo que
10 generalmente se entiende que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, se considera que un promotor está "operativamente unido" a una secuencia codificante si dicho promotor es capaz de iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en cuyo caso debe entenderse que dicha secuencia codificante está "bajo el control de" dicho
15 promotor). Por lo general, cuando dos secuencias de nucleótidos están unidas operativamente, estarán en la misma orientación y, normalmente, también en el mismo marco de lectura. Por lo general, también serán esencialmente contiguas, aunque también es posible que esto no sea necesario.

Preferiblemente, cualquier elemento regulador del vector es tal que es capaz
20 de proporcionar su función biológica prevista en la célula hospedadora u organismo hospedador previsto.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debe ser "operable" en la célula hospedadora u organismo hospedador previsto, lo que significa que, por ejemplo, dicho promotor debe ser capaz de iniciar o controlar/regular de otro modo
25 la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia codificante, a la que está unido operativamente.

5.7 Composiciones

La tecnología también proporciona una composición que comprende al menos un ISVD o polipéptido como se divulga en el presente documento, al menos
30 una molécula de ácido nucleico que codifica un ISVD o polipéptido como se divulga

en el presente documento o al menos un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. La composición puede ser una composición farmacéutica. La composición puede comprender además al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprender uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

5.8 Organismos hospedadores

La tecnología también se refiere a células hospedadoras u organismos hospedadores que comprenden los ISVD o polipéptidos como se divulgan en el presente documento, el ácido nucleico que codifica los ISVD o polipéptidos como se divulgan en el presente documento y/o el vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica los ISVD o polipéptidos como se divulgan en el presente documento.

Las células hospedadoras u organismos hospedadores adecuados son evidentes para el experto y son, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Algunos ejemplos concretos son las células HEK293, CHO, *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*. El hospedador preferido es *Pichia pastoris*.

5.9 Métodos y usos de los ISVD y polipéptidos

La tecnología también proporciona un método para producir los ISVD o polipéptidos como se divulgan en el presente documento. El método puede comprender la transformación/transfección de una célula hospedadora u organismo hospedador con un ácido nucleico que codifica el ISVD o polipéptido, expresar el ISVD o polipéptido en el hospedador, opcionalmente seguido de una o más etapas de aislamiento y/o purificación. Específicamente, el método puede comprender:

a) expresar, en una célula hospedadora u organismo hospedador (no humano) adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, una secuencia de ácido nucleico que codifique el ISVD o polipéptido de acuerdo con la presente tecnología; opcionalmente seguido de:

B) aislar y/o purificar el polipéptido.

Las células hospedadoras u organismos hospedadores adecuados para fines de producción serán evidentes para el experto, y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Algunos ejemplos concretos son las células HEK293, CHO, *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*. El hospedador preferido es *Pichia pastoris*.

Normalmente, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos de la tecnología actual combinan el reconocimiento del antígeno de afinidad elevada en la célula diana con la activación de los linfocitos T, lo que da como resultado una activación que es independiente de la especificidad natural de los linfocitos T. El primer ISVD del polipéptido de la presente tecnología tiene afinidad elevada por una célula efectora o se une específicamente a ella, preferiblemente el TCR de dicha célula efectora, e incluso más preferiblemente el dominio constante del TCR.

Una célula efectora es una célula que comprende un complejo TCR, preferiblemente una célula inmunitaria, tal como un linfocito T, preferiblemente un linfocito T auxiliar CD4+ (también conocido como célula CD4, linfocito T auxiliar o linfocito T4), más preferiblemente un linfocito T citotóxico (también conocido como célula TC, CTL o linfocitos T CD8+) o linfocito T citolíticos naturales (células NKT). En algunas realizaciones, la célula está presente *in vivo*. En algunas realizaciones, la célula está presente *in vitro*. La célula efectora de la presente tecnología se refiere en particular a células de mamífero, preferiblemente a células de primate, e incluso más preferiblemente a células humanas.

La "activación de linfocitos T", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T citotóxico, tales como las seleccionadas de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica, expresión de marcadores de activación y lisis de células diana redirigida. Los polipéptidos multiespecíficos multivalentes de la presente tecnología son capaces de inducir la activación de linfocitos T. Los ensayos adecuados para medir la activación de linfocitos T son conocidos en la materia descrita en el presente

documento, por ejemplo, como se describe en el documento WO 99/54440 o por Schlereth *et al.* 2005 (Cancer Immunol. Immunother. 20: 1-12), o como se ilustra en los ejemplos o a continuación.

En una realización, la presente tecnología se refiere a un polipéptido multivalente multiespecífico como se describe en el presente documento, en donde dicho polipéptido induce la activación de linfocitos T. Preferiblemente, el polipéptido de la presente tecnología induce la activación de linfocitos T solo cuando dicho segundo y/u otro ISVD está unido a un antígeno en una célula diana.

En una realización, la presente tecnología se refiere a un polipéptido multivalente multiespecífico como se describe en el presente documento, en donde dicha activación de linfocitos T depende de presentar dicho polipéptido unido a dicho primer antígeno en una célula diana a un linfocito T.

La activación de linfocitos T por los polipéptidos de la presente tecnología puede controlarse mediante el aumento de CD69, CD25 y diversas moléculas de adhesión celular, la expresión *de novo* y/o la liberación de citocinas (p. ej., IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4 e IL-10), el aumento de la expresión de granzimas y perforinas, y/o la proliferación celular, la formación de vesículas en la membrana, la activación de las procaspasas 3 y/o 7, la fragmentación del ADN nuclear y/o la escisión del sustrato de la caspasa poli (ADPribosa) polimerasa. Preferiblemente, la lisis redirigida de células diana mediante polipéptidos multivalentes multiespecíficos es independiente de la especificidad del receptor de linfocitos T, la presencia de microglobulina MHC de clase I y/o $\beta 2$ y/o de cualquier estímulo coestimulador.

En una realización, la presente tecnología se refiere a un polipéptido multiespecífico multivalente como se describe en el presente documento, en donde dicha activación de linfocitos T es independiente del reconocimiento del MHC.

Los polipéptidos multivalentes multiespecíficos de la presente tecnología muestran lisis redirigida *in vitro* con linfocitos T policlonales periféricos positivos CD8⁺ y CD4⁺ previamente no estimulados. La lisis redirigida de células diana a través del reclutamiento de linfocitos T por los polipéptidos de la presente tecnología implica la formación de sinapsis citolíticas y el suministro de perforina y granzimas.

La lisis celular por los linfocitos T se ha descrito, por ejemplo, por Atkinson y Bleackley, 1995 (Crit. Rev. Immunol 15(3-4): 359-384). Preferiblemente, los linfocitos T activados son capaces de lisar células diana en serie y no se ven afectados por mecanismos de escape inmunitario que interfieren con el procesamiento y presentación de antígenos peptídicos, o la diferenciación de linfocitos T clonales (véase, por ejemplo, el documento WO 2007/042261). La lisis redirigida *in vitro* se observa a bajas concentraciones picomolares, lo que sugiere que se necesita que un número muy bajo de polipéptidos de la presente tecnología se una a células diana para activar linfocitos T. Por consiguiente, la presente tecnología se refiere a polipéptidos potentes. Preferiblemente, el polipéptido multiespecífico multivalente de la presente tecnología media en la destrucción de células diana, por ejemplo, células cancerosas, tal como en la estimulación de linfocitos T en la formación de poros y el suministro de componentes proapoptóticos de gránulos de linfocitos T citotóxicos.

En una realización, la presente tecnología se refiere a un polipéptido multiespecífico multivalente como se describe en el presente documento, en donde dicha activación de linfocitos T provoca una o más respuestas celulares de dicho linfocito T, en donde dicha respuesta celular se selecciona del grupo que consiste en proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica, expresión de marcadores de activación y lisis de células diana redirigida.

Como se utiliza en el presente documento, el término "potencia" es una medida de la actividad biológica de un agente, tal como un polipéptido o un ISVD. La potencia de un agente puede determinarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, como por ejemplo el descrito en la sección experimental. Los ensayos de potencia basados en cultivos celulares suelen ser el formato preferido para determinar la actividad biológica, ya que miden la respuesta fisiológica provocada por el agente y pueden generar resultados en un periodo de tiempo relativamente corto. Se pueden utilizar varios tipos de ensayos basados en células, basándose en el mecanismo de acción del producto, que incluye, pero sin

limitación, ensayos de proliferación, ensayos de citotoxicidad, ensayos de destrucción celular, ensayos de genes indicadores, ensayos de unión a receptores de la superficie celular y ensayos para medir la inducción/inhibición de proteínas funcionalmente esenciales u otras moléculas señal (tales como proteínas fosforiladas, enzimas, citocinas, AMPc y similares), modelo de agotamiento de linfocitos B de Ramos, ensayo de destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T, todos ellos bien conocidos en la técnica.

En una realización, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos de la presente tecnología mostraron una potencia y eficacia mejoradas en ensayos de destrucción mediada por linfocitos T tanto humanos como de macaco cangrejero, en comparación con el mismo formato, en donde el primer ISVD se reemplaza por T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969).

La "eficacia" (del polipéptido de la presente tecnología) mide la fuerza máxima del propio efecto, a la saturación de concentraciones de polipéptidos. La eficacia indica la respuesta máxima que puede conseguirse por el polipéptido de la presente tecnología. Se refiere a la capacidad de un polipéptido para producir el efecto (terapéutico) deseado.

Por consiguiente, en una realización, la presente tecnología se refiere a un polipéptido multivalente multiespecífico como se describe en el presente documento, en donde dicha activación de linfocitos T provoca inhibición de una actividad de dicha célula diana, tal como para retrasar o minimizar la dispersión de la célula diana, para inhibir o retrasar el crecimiento y/o la proliferación de la célula diana y/o para destruir la célula diana (por ejemplo, provoca regresión del trastorno y/o síntomas) en más de aproximadamente un 10 %, tal como el 20 %, el 30 % o el 40 %, o incluso más del 50 %, tal como más del 60 %, tal como el 70 %, el 80 % o incluso más del 90 %, tal como el 100 %. En una realización particular, la activación de linfocitos T provoca la lisis de la célula diana, por más de aproximadamente un 10 %, tal como el 20 %, el 30 % o el 40 %, o incluso más del 50 %, tal como más del 60 %.

En una realización, el polipéptido multivalente multiespecífico como se describe en el presente documento provoca que un linfocito T humano lise la célula diana con un valor de CE_{50} seleccionado del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-9} M, como máximo aproximadamente 10^{-10} M y como máximo aproximadamente 10^{-11} M, dicho valor de CE_{50} determinado en un ensayo de destrucción mediada por linfocitos T. Por ejemplo, la CE_{50} se determina en un ensayo basado en citometría de flujo como se expone en el ejemplo 8 o 9, o en un ensayo de citotoxicidad basado en impedancia como se expone en el ejemplo 10.

En una realización, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos como se describen en el presente documento provocan que un linfocito T de primate no humano lise la célula diana con un valor de CE_{50} seleccionado del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-9} M, como máximo aproximadamente 10^{-10} M y como máximo aproximadamente 10^{-11} M, dicho valor de CE_{50} como se determina en un ensayo de destrucción mediada por linfocitos T. Por ejemplo, la CE_{50} se determina en un ensayo basado en citometría de flujo como se expone en el ejemplo 8 o 9, o en un ensayo de citotoxicidad basado en impedancia como se expone en el ejemplo 10.

Los polipéptidos multivalentes multiespecíficos con un ISVD de unión a TCR de acuerdo con la presente tecnología con una E en la posición 61 e Y o S en la posición 99 mostraron una potencia particularmente elevada en un ensayo de destrucción mediada por linfocitos T basado en citometría de flujo. Como tal, en una realización, el polipéptido multivalente multiespecífico comprende un ISVD de unión a TCR con E en la posición 61 e Y o S en la posición 99. En una realización, el polipéptido multivalente multiespecífico provoca que un linfocito T humano lise la célula diana con un valor de CE_{50} de como máximo aproximadamente $5 \cdot 10^{-10}$ M, como máximo aproximadamente 10^{-10} M, tal como $5 \cdot 10^{-11}$ M, dicho valor de CE_{50} como se determina en un ensayo de destrucción mediada por linfocitos T basado en citometría de flujo o ensayo de destrucción mediada por linfocitos T basado en impedancia. En una realización, el polipéptido multivalente multiespecífico comprende unos ISVD de unión a TCR con una E en la posición 61 y una Y, Q, T o

S en la posición 99 y provoca que un linfocito T humano lise la célula diana con un valor de CE_{50} de como máximo aproximadamente $5 \cdot 10^{-10}$ M, como máximo aproximadamente 10^{-10} M, tal como máximo $5 \cdot 10^{-11}$ M, dicho valor de CE_{50} tal como se determina en un ensayo de destrucción mediada por linfocitos T basado en citometría de flujo o ensayo de destrucción mediada por linfocitos T basado en impedancia.

En una realización, el polipéptido multivalente multiespecífico como se describe en el presente documento, es capaz de activar linfocitos T humanos y/o de primate no humano para lisar una célula diana con un valor de CE_{50} mejorado (inferior) en comparación con el mismo polipéptido en donde el primer ISVD se reemplaza por el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969).

En una realización, el polipéptido multivalente multiespecífico de la presente tecnología provoca que un linfocito T humano lise la célula diana con un valor de CE_{50} mejorado (inferior) que el del mismo polipéptido en donde el primer ISVD se reemplaza por el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969), dicho valor CE_{50} como se determina en un ensayo de destrucción mediada por linfocitos T. Por ejemplo, la CE_{50} se determina como se expone en la sección de ejemplos.

En una realización, el polipéptido multivalente multiespecífico de la presente tecnología provoca que un linfocito T de primate no humano lise la célula diana con un valor de CE_{50} mejorado (inferior) que el del mismo polipéptido en donde el primer ISVD se reemplaza por el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969), dicho valor CE_{50} como se determina en un ensayo de destrucción mediada por linfocitos T. Por ejemplo, la CE_{50} se determina como se expone en la sección de ejemplos.

En una realización, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos como se describen en el presente documento, que comprenden un primer ISVD de la presente tecnología, muestran una unión mejorada al dominio constante de un TCR humano y/o de primate no humano, en comparación con el mismo polipéptido en

donde el primer ISVD se reemplaza por el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969), es decir, un polipéptido que comprende como primer ISVD un ISVD con las secuencias de CDR de T0170056G05.

5 Las características de unión de los ISVD de la presente tecnología se analizan con más detalle a continuación (sección 5.3; "especificidad").

En algunas realizaciones, los polipéptidos multiespecíficos-multivalentes de la presente tecnología tienen una constante de asociación (k_{on}) para la unión al TCR humano seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En algunas realizaciones, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos como se describen en el presente documento tienen una k_{on} para la unión al TCR de primate no humano seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y al menos aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En algunas realizaciones, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos de la presente tecnología tienen una constante de disociación (k_{off}) para la unión al TCR humano seleccionado del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-1} s^{-1} , como máximo aproximadamente 10^{-2} s^{-1} , como máximo aproximadamente 10^{-3} s^{-1} y como máximo aproximadamente 10^{-4} s^{-1} .

En algunas realizaciones, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos como se describen en el presente documento tienen una k_{off} para la unión al TCR de primate no humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-1} s^{-1} , como máximo aproximadamente 10^{-2} s^{-1} , como máximo aproximadamente 10^{-3} s^{-1} y como máximo aproximadamente 10^{-4} s^{-1} .

En algunas realizaciones, los polipéptidos multiespecíficos-multivalentes de la presente tecnología tienen una afinidad (K_D) para unirse al TCR humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-5} M ,

como máximo aproximadamente 10^{-6} M, como máximo aproximadamente 10^{-7} M, como máximo aproximadamente 10^{-8} M y como máximo aproximadamente 10^{-9} M.

En algunas realizaciones, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos de la presente tecnología tienen una K_D para la unión al TCR de primate no humano seleccionada del grupo que consiste en como máximo aproximadamente 10^{-5} M, como máximo aproximadamente 10^{-6} M, como máximo aproximadamente 10^{-7} M y como máximo aproximadamente 10^{-8} M.

En una realización, la k_{on} , k_{off} o K_D se mide mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR). Por ejemplo, la k_{on} , k_{off} o K_D se determina como se expone en la sección de ejemplos.

En otra realización, la k_{on} , k_{off} o K_D se mide mediante interferometría de biocapa (BLI).

En una realización, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos de la presente tecnología se unen al TCR humano con una K_D mejorada (inferior) que la del mismo polipéptido en donde el primer ISVD se reemplaza por el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969).

En una realización, los polipéptidos multivalentes multiespecíficos de la presente tecnología se unen al TCR de primate no humano con una K_D mejorada (inferior) que la del mismo polipéptido en donde el primer ISVD se reemplaza por el ISVD T0170056G05 (divulgado como la SEQ ID NO: 50 en el documento WO2016180969).

El polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector tal como se describe, o la composición que comprende el ISVD o polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector, preferiblemente el polipéptido o una composición que comprende el mismo, son útiles como medicamento.

Por consiguiente, la tecnología proporciona el polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe, o una composición que comprende el ISVD o polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector para su uso como medicamento.

También se proporciona el polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el ISVD o polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector para su uso en la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmunitaria.

Adicionalmente, se proporciona el polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el ISVD o polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector para su uso en el tratamiento del cáncer.

También se proporciona un método para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad, en donde dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa del polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el ISVD o polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector.

Además, se proporciona un método para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmunitaria, en donde dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa del polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el ISVD o polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector.

Adicionalmente, se proporciona un método para tratar el cáncer, en donde dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa del polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el ISVD o polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector.

Se proporciona además el uso del polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector en la preparación de un medicamento.

- 5 También se proporciona el uso del polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector en la preparación de un medicamento para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una
- 10 enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmunitaria.

- Se proporciona además el uso del polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o una composición que comprende el polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector en la preparación de
- 15 una composición farmacéutica, preferiblemente para tratar el cáncer.

- Un "sujeto" al que se hace referencia en el contexto de la tecnología puede ser cualquier animal, preferiblemente un mamífero. Entre los mamíferos, cabe distinguir entre los seres humanos y los mamíferos no humanos. Los animales no humanos pueden ser, por ejemplo, animales de compañía (p. ej., perros, gatos),
- 20 ganado (p. ej., bovino, equino, ovino, caprino o porcino) o animales utilizados generalmente con fines de investigación y/o para producir anticuerpos (p. ej., ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, caballos, cerdos, primates no humanos, como los macacos cangrejeros, o camélidos, como la llama o la alpaca).

- En el contexto de propósitos profilácticos y/o terapéuticos, el sujeto puede ser cualquier animal y, más específicamente, cualquier mamífero, pero
- 25 preferiblemente es un sujeto humano.

- Como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" en el contexto de administrar (una) terapia(s) a un sujeto se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno
- 30 asociado con un trastorno celular hiperproliferativo, por ejemplo, un cáncer, y/o a la

mejora de uno o más síntomas del mismo resultantes de la administración de una o más terapias (incluida, pero sin limitación, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). En realizaciones específicas, los términos "tratar", y "tratamiento", en el contexto de administrar una terapia/terapias a un sujeto, se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno celular hiperproliferativo, por ejemplo, un cáncer, se refieren a una reducción en las células cancerosas de al menos un 5 %, preferiblemente al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % en relación con un control (por ejemplo, un control negativo, tal como solución salina tamponada con fosfato). En otras realizaciones, los términos "tratar" y "tratamiento" en el contexto de administrar una terapia/terapias a un sujeto se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno celular hiperproliferativo, por ejemplo, un cáncer, a ningún cambio en el número de células cancerosas, una reducción en el tiempo de hospitalización, una reducción en la mortalidad o un aumento en el tiempo de supervivencia del sujeto con un cáncer.

Las sustancias (incluidos polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y vectores) o composiciones se pueden administrar a un sujeto mediante cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo, por administración enteral (tal como oral o rectal) o parenteral (tal como epicutánea, sublingual, yugal, nasal, intraarticular, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, transdérmica o transmucosa). Se prefiere la administración parenteral, tal como la administración intramuscular, subcutánea o intradérmica. Lo más preferido es la administración subcutánea.

Se puede administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido, una molécula de ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento, o

una composición que comprenda el ISVD o polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector con el fin de proporcionar los resultados de tratamiento previstos.

Pueden administrarse una o varias dosis. Si se administra más de una dosis, las dosis pueden administrarse en intervalos adecuados para maximizar el efecto del polipéptido, composición, molécula de ácido nucleico o vector.

Tabla A-4: Secuencias de ISVD

Nombre	SEQ ID NO	61	99	10 3	Secuencia
T0170007 00	1	D	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 37	2	N	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYANSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 38	3	P	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAPSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 39	4	K	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAKSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS

5

10

15

20

25

30

T0170009 40	5	R	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYARSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 41	6	I	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAIKGRFTISRDESKNTVYLQM NSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQ GTLVTVSS
T0170009 42	7	T	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYATSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 43	8	H	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAHSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 44	9	V	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAVSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 45	10	E	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQ

5

10

15

20

25

30

					MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 46	11	A	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAASAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 47	12	Y	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAASAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 48	13	L	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYALSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 49	14	Q	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAQSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 50	15	F	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAFAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 51	16	S	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG

5 <
--

5

10

15

20

25

30

T0170009 57	22	D	W	H	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYHG QGTLVTVSS
T0170009 58	23	D	W	I	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYIG QGTLVTVSS
T0170009 59	24	D	W	Q	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYQG QGTLVTVSS
T0170009 60	25	D	W	V	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYVG QGTLVTVSS
T0170009 61	26	D	W	K	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYKG QGTLVTVSS
T0170009 62	27	D	W	S	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ

5

10

15

20

25

30

					MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYSG QGTLVTVSS
T0170009 63	28	D	W	G	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYGG QGTLVTVSS
T0170009 64	29	D	W	P	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYPG QGTLVTVSS
T0170009 65	30	D	W	F	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYFG QGTLVTVSS
T0170009 66	31	D	W	T	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYTG QGTLVTVSS
T0170009 67	32	D	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 74	33	E	Y	W	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG

5

5

10

15

20

25

30

T0170009 80	39	Q	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAQSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 81	40	S	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYASSAKGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 82	41	E	Y	Y	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYYG QGTLVTVSS
T0170009 91	42	E	Y	W	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 92	43	E	A	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIAPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 93	44	E	P	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISRDESKNTVYLQ

5

10

15

20

25

30

					MNSLRPEDTAAYYCRALSRIPPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 94	45	E	D	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESAAGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIDPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 95	46	E	Q	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESAAGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIQPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 96	47	E	E	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESAAGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIEPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 97	48	E	R	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESAAGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIQPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 98	49	E	F	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESAAGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIQPYDYWG QGTLVTVSS
T0170009 99	50	E	S	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG

						DQTDYAESA KGRFTISR DESKNTVY LQMNSLR PEDTAAYY CRALSRIS PYDYWG QGTLVTVSS
5	T0170010 00	51	E	G	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISR DESKNTVY LQMNSLR PEDTAAYY CRALSRIG PYDYWG QGTLVTVSS
10	T0170010 01	52	E	T	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISR DESKNTVY LQMNSLR PEDTAAYY CRALSRIT PYDYWG QGTLVTVSS
15	T0170010 02	53	E	H	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISR DESKNTVY LQMNSLR PEDTAAYY CRALSRIH PYDYWG QGTLVTVSS
20	T0170010 03	54	E	V	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISR DESKNTVY LQMNSLR PEDTAAYY CRALSRIV PYDYWG QGTLVTVSS
25	T0170010 04	55	E	K	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESA KGRFTISR DESKNTVY LQMNSLR PEDTAAYY CRALSRIK PYDYWG QGTLVTVSS

5	T0170010 05	56	E	L	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESAAGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRILPYDYWG QGTLVTVSS
	T0170010 06	57	E	I	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASG YVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG DQTDYAESAAGRFTISRDESKNTVYLQ MNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPYDYWG QGTLVTVSS

Tabla A-5: Secuencias de la región CDR (de acuerdo con la definición de Kabat) de las variantes de ISVD

ISVD TCE	CDR1		CDR2		CDR3	
	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO	Secuencia
15	1	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	2	INFYG	152	HISIGDQTDYANSAKG	167	LSRIWPYDY
	3	INFYG	153	HISIGDQTDYAPSAKG	167	LSRIWPYDY
	4	INFYG	154	HISIGDQTDYAKSAKG	167	LSRIWPYDY
	5	INFYG	155	HISIGDQTDYARSAKG	167	LSRIWPYDY
20	6	INFYG	156	HISIGDQTDYAISAKG	167	LSRIWPYDY
	7	INFYG	157	HISIGDQTDYATSAKG	167	LSRIWPYDY
	8	INFYG	158	HISIGDQTDYAHSAKG	167	LSRIWPYDY
	9	INFYG	159	HISIGDQTDYAVSAKG	167	LSRIWPYDY
	10	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	167	LSRIWPYDY
25	11	INFYG	161	HISIGDQTDYAASAKG	167	LSRIWPYDY
	12	INFYG	162	HISIGDQTDYAYSAG	167	LSRIWPYDY

5	13	79	INFYG	163	HISIGDQTDYALSAKG	167	LSRIWPYDY
	14	79	INFYG	164	HISIGDQTDYAQSAKG	167	LSRIWPYDY
	15	79	INFYG	165	HISIGDQTDYAFSAKG	167	LSRIWPYDY
	16	79	INFYG	166	HISIGDQTDYASSAKG	167	LSRIWPYDY
	17	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
10	18	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	19	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	20	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	21	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	22	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
15	23	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	24	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	25	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	26	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	27	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
20	28	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	29	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	30	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	31	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	32	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	168	LSRIYPYDY
25	33	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	168	LSRIYPYDY
	34	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
	35	79	INFYG	155	HISIGDQTDYARSAKG	168	LSRIYPYDY
	36	79	INFYG	159	HISIGDQTDYAVSAKG	168	LSRIYPYDY
	37	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	168	LSRIYPYDY
30	38	79	INFYG	161	HISIGDQTDYAASAAG	168	LSRIYPYDY
	39	79	INFYG	164	HISIGDQTDYAQSAKG	168	LSRIYPYDY
	40	79	INFYG	166	HISIGDQTDYASSAKG	168	LSRIYPYDY
	41	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	168	LSRIYPYDY

5	42	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	168	LSRIYPYDY
	43	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	169	LSRIAPYDY
	44	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	170	LSRIIPPYDY
	45	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	171	LSRIDPYDY
	46	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	172	LSRIQPYDY
10	47	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	173	LSRIEPYDY
	48	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	174	LSRIRPYDY
	49	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	175	LSRIFPYDY
	50	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	176	LSRISPYDY
	51	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	177	LSRIGPYDY
15	52	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	178	LSRITPYDY
	53	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	177	LSRIHPYDY
	54	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	178	LSRIVPYDY
	55	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	179	LSRIKPYDY
	56	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	180	LSRILPYDY
	57	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAAG	181	LSRIIPYDY

A menos que se indique o defina lo contrario, todos los términos utilizados tienen su significado habitual en la técnica, que resultará claro para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, como Sambrook *et al.* (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.^a Ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press), F. Ausubel *et al.* (1987, Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, New York), Lewin (1985, Genes II, John Wiley & Sons, New York, N. Y.), Old *et al.* (1981, Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2.^a Ed.) University of California Press, Berkeley, CA), Roitt *et al.* (2001, Immunology (6.^a Ed.) Mosby/Elsevier, Edinburgh), Roitt *et al.* (2001, Roitt's Essential Immunology (10.^a Ed.) Blackwell Publishing, Reino Unido) y Janeway *et al.* (2005, Immunobiology (6.^a Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York), así como también la técnica general anterior citada en el presente documento.

A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera en sí misma conocida, como quedará claro para el experto. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales estándar y a los antecedentes generales de la técnica mencionados en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en los mismos; así como, por ejemplo, a las siguientes revisiones: Presta (2006, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (5-6): 640-56), Levin y Weiss (2006, *Mol. Biosyst.* 2(1): 49-57), Irving *et al.* (2001, *J. Immunol. Methods* 248(1-2): 31-45), Schmitz *et al.* (2000, *Placenta* 21 Suppl. A: S106-12), Gonzales *et al.* (2005, *Tumor Biol.* 26(1): 31-43), que describen técnicas de modificación de proteínas por ingeniería genética, tales como la maduración por afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas, tales como inmunoglobulinas.

El término "secuencia", tal como se utiliza en el presente documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia VHH" o "secuencia de proteína"), debe entenderse en general que incluye tanto la secuencia de aminoácidos pertinente como los ácidos nucleicos o las secuencias de nucleótidos que codifican la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Se interpreta que las "secuencias de aminoácidos" significan un solo aminoácido o una secuencia no ramificada de dos o más aminoácidos, según el contexto. Se interpreta que las secuencias de nucleótidos significan una secuencia no ramificada de 3 o más nucleótidos.

Los aminoácidos son los L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas de origen natural y se enumeran en la tabla B-1. Las secuencias de aminoácidos que contienen D-aminoácidos no están abarcadas por esta definición. Cualquier secuencia de aminoácidos que contenga aminoácidos modificados postraduccionalmente puede describirse como la secuencia de aminoácidos que se traduce inicialmente utilizando los símbolos mostrados en la tabla B-1 con las

posiciones modificadas, p. ej., hidroxilaciones o glucosilaciones, pero estas modificaciones no se mostrarán explícitamente en la secuencia de aminoácidos. Esta definición abarca cualquier péptido o proteína que pueda expresarse como enlaces modificados de secuencia, entrecruzamientos y protecciones terminales, enlaces no peptídico, etc.

Los términos "proteína", "péptido", "proteína/péptido" y "polipéptido" se utilizan indistintamente a lo largo de la divulgación y todos ellos tienen el mismo significado para los propósitos de esta divulgación. Cada término se refiere a un compuesto orgánico formado por una cadena lineal de dos o más aminoácidos. El compuesto puede tener diez o más aminoácidos; veinticinco o más aminoácidos; cincuenta o más aminoácidos; cien o más aminoácidos, doscientos o más aminoácidos e incluso trescientos o más aminoácidos. El experto en la materia apreciará que los polipéptidos generalmente comprenden menos aminoácidos que las proteínas, aunque no existe un límite reconocido en la técnica para el número de aminoácidos que distingue un polipéptido de una proteína; esos polipéptidos pueden prepararse mediante síntesis química o métodos recombinantes; y esas proteínas generalmente se fabrican *in vitro* o *in vivo* mediante métodos recombinantes conocidos en la técnica.

A menos que el contexto requiera claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, los términos "comprender", "que comprende" y similares deben interpretarse en un sentido inclusivo en oposición a un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de "que incluye, pero no se limita a".

Por ejemplo, cuando se dice que una secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o polipéptido "comprende" otra secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o polipéptido, respectivamente, o que "consiste esencialmente en" otra secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o polipéptido, puede significar que esta última secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o polipéptido se ha incorporado a la primera secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o polipéptido, respectivamente, mencionada, pero, por lo general, esto significa que la primera secuencia de

nucleótidos, secuencia de aminoácidos o polipéptido mencionada comprende dentro de su secuencia un tramo de nucleótidos o de restos de aminoácidos, respectivamente, que tiene la misma secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que esta última secuencia, independientemente de cómo se haya generado u obtenido realmente la primera secuencia mencionada (que puede ser, por ejemplo, mediante cualquier método adecuado descrito en el presente documento). A modo de ejemplo no limitante, cuando se dice que un polipéptido de la presente tecnología comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, esto puede significar que dicha secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina se ha incorporado a la secuencia del polipéptido de la presente tecnología, pero más habitualmente esto significa en general que el polipéptido de la presente tecnología contiene dentro de su secuencia la secuencia de los dominios variables únicos de inmunoglobulina independientemente de cómo se haya generado u obtenido dicho polipéptido de la presente tecnología. Asimismo, cuando se dice que un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos comprende otra secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos mencionada es preferiblemente tal que, cuando se expresa en un producto de expresión (p. ej., un polipéptido), la secuencia de aminoácidos codificada por la última secuencia de nucleótidos forma parte de dicho producto de expresión (en otras palabras, que la última secuencia de nucleótidos está en el mismo marco de lectura que la primera secuencia de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos mayor mencionada).

Cuando se dice que una secuencia de aminoácidos o un polipéptido "consiste esencialmente en" un dominio variable único de inmunoglobulina, quiere decir que dicha secuencia de aminoácidos o polipéptido es exactamente igual al dominio variable único de inmunoglobulina o corresponde a un polipéptido o secuencia de aminoácidos que tiene un número limitado de restos de aminoácidos, tales como 1 a 20 restos de aminoácidos, por ejemplo 1 a 10 restos de aminoácidos y preferiblemente 1 a 6 restos de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos de aminoácidos, añadidos en el extremo aminoterminal, en el extremo carboxiterminal,

o tanto en el extremo aminoterminal como en el extremo carboxiterminal del dominio variable único de inmunoglobulina. Cuando se utiliza "consiste en", significa que la secuencia de aminoácidos o polipéptido es exactamente igual que el dominio variable único de inmunoglobulina.

5 Cabe señalar que, tal como se utilizan en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la", incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la materia que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

10 A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando tan solo experimentación habitual, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la presente tecnología descritas en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes queden abarcados por la presente tecnología.

15 El término "y/o" dondequiera que se utilice en el presente documento incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

20 Como se utilizan en el presente documento, las expresiones "alrededor de" o "aproximadamente" significan en un 20 %, preferiblemente en un 15 %, más preferiblemente en un 10 %, y lo más preferiblemente en un 5 %, de un valor o intervalo dado.

25 **6 Ejemplos**

6.1 Ejemplo 1: Generación y determinación de la disociación de los ISVD de activación de linfocitos T (TCE)

Generación de variantes

30 Se sustituyeron los aminoácidos en las posiciones 61, 99 y 103 (numeración de Kabat) en el ISVD T017000700 (SEQ ID NO: 1) para generar diferentes

variantes, que mantuvieron la función y la capacidad de desarrollo global, pero tenían isomerización reducida o nula en la posición 61 y oxidación reducida o nula en las posiciones 99 y/o 103 (numeración de Kabat).

El ISVD T017000700 y los ISVD variantes generados se muestran en la tabla A-4 anterior. Todos los ISVD se marcaron con un marcador FLAG-HIS (FLAG3-HIS6, SEQ ID NO: 77) de modo que pudieran analizarse en experimentos adicionales.

Determinación de la velocidad de disociación respecto a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana

La unión a TCR $\alpha\beta$ por las variantes de ISVD TCE se evaluó mediante la determinación de la constante de velocidad de disociación (k_d) respecto a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana recombinante, mediante ensayos basados en SPR en un instrumento Proteon XPR36 (BioRad Laboratories, Inc.) o un instrumento SPR-32 (Bruker Daltonics SPR).

Configuración en Proteon XPR36

La unión de construcciones ISVD TCE-FLAG3-HIS6 monovalentes de extracto en bruto a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana (huTCR(2XN9)-cremallera, producida internamente) se probó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) (Bio-rad Laboratories, Inc., Proteon XPR36). La diana se inmovilizó en un chip sensor GLC (matriz corta, capacidad normal) utilizando la química de acoplamiento de aminos convencional. Se inyectaron extractos en bruto de construcciones ISVD (por duplicado) a una dilución 1:10 para evaluar los parámetros de unión. Se inyectó cada ISVD durante 120 s y se evaluó la disociación durante 600 s.

Se hizo doble referencia a los datos restando un carril de analito de referencia y una inyección de tampón de blanco. La constante de disociación (k_d) para cada interacción se calculó mediante la aplicación del modelo de interacción Langmuir 1:1 utilizando Proteon Manager 3.1.0 (Bio-rad Laboratories, Inc., versión 3.1.0.6).

Configuración en SPR-32

La unión de construcciones ISVD TCE-FLAG3-HIS6 monovalentes de extracto en bruto a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana (huTCR(2XN9)-cremallera, producida internamente) se probó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) (Bruker Daltonics SPR, SPR-32). La diana se inmovilizó en un chip sensor de amina de alta capacidad (HCA, del inglés *high-capacity amine*) usando la química de acoplamiento de amina convencional. Se inyectaron extractos en bruto de construcciones ISVD a una dilución 1:10 para evaluar los parámetros de unión. Se inyectó cada ISVD durante 120 s y se evaluó la disociación durante 600 s.

Se hizo doble referencia a los datos restando un punto de referencia y una inyección de tampón en blanco. Se calculó la constante de velocidad de disociación (kd) para cada interacción mediante la aplicación del modelo de interacción Langmuir 1:1 usando el programa informático analizador SPR-32 (Bruker Daltonics SPR, versión 3.2.0.19).

Los resultados de las mediciones se pueden observar en la tabla 1-3.

Tabla 1 Determinación de la disociación basada en SPR de variantes ISVD TCE en la posición 61 (numeración de Kabat) y construcción ISVD TCE de referencia para la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana

				cremallera TCR $\alpha\beta$ humana	
ID del ISVD	Res 61	Res 99	Res 103	kd (1/s)	relación de kd frente a referencia
T017000946	A	W	W	3.8E-04	1.0
T017000945	E	W	W	3.6E-04	1.0
T017000950	F	W	W	3.5E-04	0.9
T017000943	H	W	W	3.3E-04	0.9
T017000941	I	W	W	3.4E-04	0.9
T017000939	K	W	W	3.5E-04	1.0

T017000948	L	W	W	3.3E-04	0.9
T017000937	N	W	W	3.3E-04	0.9
T017000938	P	W	W	3.6E-04	1.0
T017000949	Q	W	W	3.8E-04	1.0
T017000940	R	W	W	3.8E-04	1.0
T017000951	S	W	W	3.9E-04	1.0
T017000942	T	W	W	3.4E-04	0.9
T017000944	V	W	W	3.8E-04	1.0
T017000947	Y	W	W	3.5E-04	0.9
T017000700 (referencia)	D	W	W	3.7E-04	1.0

Tal como puede observarse a partir de la tabla 1, la unión de variantes ISVD TCE con una sustitución en la posición 61 (numeración de Kabat) respecto a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana, como se evalúa mediante determinación de la constante de disociación basada en SPR, se mantiene a niveles muy similares a la referencia (T017000700) para todas las construcciones probadas, es decir, construcciones que tienen los restos de aminoácidos A, E, F, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, Y en la posición 61.

Tabla 2: Determinación de la disociación basada en SPR de variantes ISVD TCE en la posición 99 y la posición 61 (numeración de Kabat) fijadas como E, y construcción ISVD TCE de referencia para proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana

cremallera TCR $\alpha\beta$ humana					
ID del ISVD	Res 61	Res 99	Res 103	kd (1/s)	relación de kd frente a referencia
T01700978	E	Y	W	4.3E-04	1.4
T017000992	E	A	W	7.0E-03	23
T017000994	E	D	W	7.6E-03	24

5	T017000996	E	E	W	1.1E-02	37
	T017000998	E	F	W	6.8E-04	2
	T017001000	E	G	W	3.1E-03	10
	T017001002	E	H	W	1.0E-03	3
	T017001006	E	I	W	1.5E-02	49
10	T017001004	E	K	W	2.5E-03	8
	T017001005	E	L	W	2.3E-03	8
	T017000993	E	P	W	3.4E-02	109
	T017000995	E	Q	W	1.9E-02	61
	T017000997	E	R	W	1.9E-03	6
15	T017000999	E	S	W	3.8E-03	12
	T017001001	E	T	W	4.2E-03	14
	T017001003	E	V	W	6.3E-03	20
	T017000700					
	(referencia)	D	W	W	3.1E-04	1.0

Tal como puede observarse de la tabla 2, se sometió a prueba la unión de variantes ISVD TCE con una sustitución en la posición 99 (numeración de Kabat), respecto a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana, en construcciones donde el resto 61 se fijó como ácido glutámico (E). En la determinación de la disociación basada en SPR, todas las variantes probadas, es decir, con los restos Y, A, D, E, F, G, H, I, K, L, P, Q, R, S, T, V en la posición 99, mantuvieron niveles detectables de unión a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana, sin embargo, con un intervalo de disociaciones hasta aproximadamente 100 veces más rápidas en comparación con el T017000700 de referencia.

Tabla 3: Determinación de la disociación basada en SPR de variantes ISVD TCE en la posición 103 (numeración de Kabat) y construcción ISVD TCE de referencia para la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana

					cremallera TCR $\alpha\beta$ humana
ID del ISVD	Res 61	Res 99	Res 103	kd (1/s)	relación de kd frente a referencia
T017000953	D	W	A	2.0E-04	0.5
T017000954	D	W	E	3.7E-04	1.0
T017000965	D	W	F	3.8E-04	1.0
T017000963	D	W	G	Sin unión	Sin unión
T017000957	D	W	H	2.7E-04	0.7
T017000958	D	W	I	2.5E-04	0.7
T017000961	D	W	K	3.4E-04	0.9
T017000956	D	W	L	2.4E-04	0.6
T017000964	D	W	P	Sin unión	Sin unión
T017000959	D	W	Q	2.6E-04	0.7
T017000952	D	W	R	4.7E-04	1.3
T017000962	D	W	S	3.6E-04	1.0
T017000966	D	W	T	3.1E-04	0.8
T017000960	D	W	V	2.5E-04	0.7
T017000955	D	W	Y	4.4E-04	1.2
T017000700 (referencia)	D	W	W	3.8E-04	1.0

Tal como puede observarse en la tabla 3, la unión de variantes ISVD TCE con una sustitución en la posición de Kabat 103 a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana, tal como se evalúa mediante determinación de la constante de disociación basada en SPR, se mantiene a niveles muy similares a T017000700 de referencia para las construcciones que tienen los restos de aminoácidos A, E, F, H, I, K, L, Q,

R, S, T, V, Y en la posición 103, mientras que no se observó unión para las construcciones que tenían los restos de aminoácido G o P en la posición 103.

En función de los resultados de los análisis de SPR, puede concluirse que cuando se sustituyen aminoácidos en una o más de las posiciones 61, 99 y 103 (numeración de Kabat) en la secuencia de referencia T017000700, pueden obtenerse ISVD funcionales que se unen a TCR.

Se seleccionó un cierto número de los ISVD generados y se analizaron adicionalmente en experimentos adicionales, que se comentarán en el presente documento a continuación.

6.2 Ejemplo 2: Determinación de las propiedades biofísicas (T_m , Tagg y oligomerización) de variantes ISVD TCE

Determinación de la temperatura de fusión en un ensayo de desplazamiento térmico (TSA)

El ensayo de desplazamiento térmico (TSA, del inglés *thermal shift assay*) se realizó en una placa de 96 pocillos en la máquina LightCycler 480II (Roche). Por fila, se analizó un ISVD al siguiente pH: 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Por pocillo, se añadieron 5 μ l de muestra ISVD (0.8 mg/ml en PBS) a 5 μ l de Sypro Orange (40 $\times$ en agua milliQ; n.º de cat. de Invitrogen S6551) y 10 μ l de tampón (fosfato 100 mM, borato 100 mM, citrato 100 mM y NaCl 115 mM, intervalo de pH de 3.5 a 9). El gradiente de temperatura aplicado (de 37 a 99 °C a una velocidad de 0.03 °C/s) induce el despliegue de los ISVD, por lo que quedan expuestos los parches hidrófobos. Sypro Orange se une a esos parches hidrófobos, dando como resultado un aumento en la intensidad de la fluorescencia (Ex/Em = 465/580 nm). El punto de inflexión de la primera derivada de la curva de intensidad de fluorescencia a pH 7 sirve como medida de la temperatura de fusión.

Determinación de la temperatura de inicio de agregación (ensayo Tagg)

Se determinó la temperatura a la que una proteína ISVD comienza a agregarse (= temperatura de inicio de la agregación = Tagg) mediante dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*) usando el lector de placas DynaPro (Wyatt). Para esto, se utilizaron ISVD con un marcador 3xFLAG-

HIS6 (SEQ ID NO: 77), producidos en *E. coli*, purificados mediante IMAC seguido de SEC preparativa, filtrados (0.22 μ m), a una concentración de 1 mg/ml (D-PBS). Después de descongelar, la muestra se filtró sobre una membrana de 0.1 μ m y se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm. Se calentaron muestras de 30 μ l (4 réplicas) de 40 a 80 °C a una velocidad constante de 0.25 °C/minuto con registro continuo de las intensidades de dispersión de la luz. El radio hidrodinámico derivado de las intensidades medidas se representó frente a la temperatura para determinar la temperatura a la que el radio comenzó a aumentar (= Tagg, °C).

Ensayo de oligomerización

Se investigó la propensión a la oligomerización de ISVD monovalentes en condiciones de estrés (1 semana a 45 °C) mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SE-HPLC). Para esto, se utilizaron ISVD con un marcador 3xFLAG-HIS6, producidos en *E. coli*, purificados mediante IMAC seguido de SEC preparativa, filtrados (0.22 μ m), a una concentración de 1 mg/ml (DPBS). Se compararon los perfiles de SE-HPLC de dos alícuotas de 100 μ l: se incubó una muestra durante 1 semana a -20 °C y la otra muestra durante 1 semana a 45 °C. Las muestras se aclararon por centrifugación durante 5 minutos a 20000 FCR y posteriormente se analizaron en un Acquity UPLC BEH200 SEC (fase móvil L-arginina 750 mM). HCL + fosfato 10 mM pH 7.0, caudal 0.4 ml/minuto). La diferencia en las áreas relativas de pico previo de las muestras sometidas a estrés (+45 °C) y no sometidas a estrés (-20 °C) se calculó y se informó como $\Delta\%$ de oligo (= % de oligo 1S 45 °C - % de oligo T0).

Resultados

Las variantes purificadas de los ISVD TCE que albergan sustituciones de aminoácidos seleccionadas en las posiciones 61, 99 y 103 (numeración de Kabat) (véase la tabla A-4) se caracterizaron en términos de temperatura de fusión (T_m), inicio de agregación (Tagg) y oligomerización después de 1 semana a 45 °C como se ilustra en las tablas 4 y 5.

En la posición 61 del ISVD TCE, las variantes de restos de aminoácidos A, E, P, Q, R, S, V se seleccionaron debido a que estos son los restos que se producen con mayor frecuencia en esta posición en los genes de VH humanos.

En la posición 99 del ISVD TCE, se seleccionaron las variantes de restos de aminoácidos A, H, Q, S, T e Y. Y se seleccionó debido a que era el resto que afectaba a la disociación de la variante ISVD respectiva para la unión al TCR $\alpha\beta$ al menos (Tabla 2). Se seleccionaron los restos A, H, Q, S, T porque los respectivos ISVD TCE representaban un intervalo de diferentes velocidades de disociación para la unión a TCR $\alpha\beta$.

En aproximadamente un 95 % de los genes VH humanos y de los ISVD de origen natural [análisis interno de las secuencias] el triptófano (W) se encuentra en la posición de Kabat 103. Otros restos que se pueden encontrar en la posición 103 de los ISVD de origen natural son Y, R y S. Por lo tanto, Y, R y S se seleccionaron para las variantes de restos de aminoácidos en la posición 103.

Tabla 4: Propiedades biofísicas (T_m, Tagg y oligomerización) de variantes ISVD TCE en la posición 61 y 99, y la referencia TC017000700

ID del ISVD	T _m	ΔT_m (°C) frente a ref	Tagg	$\Delta tagg$ frente a ref (°C)	$\Delta\%$ de oligo	$\Delta\%$ de oligo frente a ref
T017000700	72.0	-	68	-	0.2	-
T017000938	72.0	0.0	66	-2	1.0	0.8
T017000940	68.6	-3.4	60	-8	0.9	0.7
T017000944	72.0	0.0	61	-7	0.9	0.7
T017000945	72.5	0.5	68	0	0.6	0.4
T017000946	70.0	-2.0	64	-4	0.7	0.5
T017000949	69.6	-2.4	64	-4	1.1	0.9
T017000951	70.0	-2.0	63	-5	1.0	0.8
T017000967	72.0	0.0	73	5	0.4	0.2
T017000975	73.4	1.4	71	3	1.5	1.3
T017000976	69.6	-0.4	64	-4	0.9	0.7

T017000977	70.5	-1.5	65	-3	1.6	1.4
T017000978	73.0	1.0	71	3	0.0	-0.2
T017000979	71.5	-0.5	68	0	1.7	1.5
T017000980	70.5	-1.5	67	-1	0.1	-0.1
T017000981	70.5	-1.5	68	0	1.3	1.1
T017000992	73.0	1.0	73	5	0.2	0.0
T017000995	71.0	-1.0	73	5	0.1	-0.1
T017000999	72.0	0.0	72	4	0.1	-0.1
T017001001	71.0	-1.0	68	0	0.3	0.1
T017001002	72.0	0.0	69	1	0.2	0.0

Tabla 5: Propiedades biofísicas (T_m, Tagg y oligomerización) de variantes ISVD TCE en la posición 103, y la referencia TC017000700

ID del ISVD	T _m (°C)	ΔT _m (°C) frente a ref	Tagg (°C)	ΔTagg frente a ref (°C)	Δ% de oligo
T017000982	64.7	-7.3	61	7	0.1
T017000955	63.2	-8.8	57	11	0.3
T017000952	56.9	-15.1	48	20	0.2
T017000962	59.3	-12.7	53	15	0.3

Como puede verse en la tabla 4, T017000978, T017000992, T017000999 y T017001002 han mantenido o mejorado las tres propiedades en comparación con la referencia T017000700. Para la T_m se observó un aumento de 0 °C a 1 °C, para Tagg se observó un aumento de 1 °C a 5 °C y se observó una reducción en la fracción oligomérica del 0.2 % para la referencia al 0.0 % o al 0.1 % para los ISVD de acuerdo con la presente tecnología.

Sorprendentemente, como puede observarse en la tabla 5, aunque la unión a TCR de las variantes ISVD en la posición 103 no se vio afectada, la sustitución en esta posición dio lugar a una reducción de la temperatura de fusión de 7.3 °C a 15.1 °C, y una reducción de la temperatura de inicio de la agregación de 7 °C a

20 °C en comparación con el ISVD de referencia. Esto sugiere que W103 puede ser importante para la estabilidad biofísica de los ISVD TCE.

Por consiguiente, para avanzar se decidió mantener un triptófano en la posición 103, variando al mismo tiempo los restos de aminoácidos en las posiciones 61 y 99.

6.3 Ejemplo 3: Determinación de la afinidad de las variantes ISVD TCE frente a la proteína TCR $\alpha\beta$ humana y de macaco cangrejero

La unión de construcciones ISVD TCE-FLAG3-HIS6 y TCE-HIS6 monovalentes purificadas a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana (huTCR(2XN9)-cremallera, producida internamente) y proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ de macaco cangrejero (cyTCR(AEA41865)-cremallera, producida internamente) se probó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) (Bio-rad Laboratories, Inc., Proteon XPR36). Ambas dianas se inmovilizaron en un chip sensor GLC (matriz corta, capacidad normal) utilizando la química de acoplamiento de aminos convencional. Se inyectaron construcciones ISVD a 6 concentraciones diferentes en un experimento cinético de múltiples ciclos (MCK, del inglés *multi-cycle kinetics*). Se inyectó cada concentración de los ISVD durante 120 s y se evaluó la disociación durante 600 s.

Se hizo doble referencia a los datos restando un carril de analito de referencia y una inyección de tampón de blanco. Las constantes de afinidad (k_a , k_d y K_D) se calcularon mediante la aplicación del modelo de interacción Langmuir 1:1 utilizando Proteon Manager 3.1.0 (Bio-rad Laboratories, Inc., versión 3.1.0.6).

Los resultados de la medición de afinidad de variantes de aminoácidos ISVD TCE por la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana y de macaco cangrejero se resumen en las tablas 6 y 7 a continuación. Como referencia, se utilizó T017000700.

Tabla 6: Determinación cinética basada en SPR de variantes ISVD TCE y T017000700 de referencia para la unión a proteínas de fusión de cremallera TCR $\alpha\beta$ humanas

		cremallera TCRαβ humana			
	ID del ISVD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Relación K _D frente a ref
5	T017000700	1.3E+05	3.7E-04	2.5E-09	1.0
	T017000938	1.7E+05	3.6E-04	2.1E-09	0.9
	T017000940	2.0E+05	3.8E-04	1.9E-09	0.8
10	T017000944	1.6E+05	3.8E-04	2.3E-09	0.9
	T017000945	1.6E+05	3.6E-04	2.3E-09	0.9
	T017000946	1.7E+05	3.8E-04	2.3E-09	0.9
	T017000949	1.8E+05	3.8E-04	2.1E-09	0.9
15	T017000951	1.6E+05	3.9E-04	2.5E-09	1.0
	T017000967	1.1E+05	4.8E-04	4.4E-09	1.8
	T017000975	1.4E+05	5.5E-04	3.8E-09	1.5
	T017000976	1.5E+05	5.7E-04	3.9E-09	1.6
	T017000977	1.1E+05	5.2E-04	4.5E-09	1.8
20	T017000978	1.1E+05	5.2E-04	5.0E-09	2.0
	T017000979	1.1E+05	5.6E-04	4.9E-09	2.0
	T017000980	1.3E+05	5.5E-04	4.1E-09	1.7
	T017000981	1.2E+05	5.3E-04	4.4E-09	1.8
25	T017000995	3.3E+04	3.3E-02	1.0E-06	404
	T017000999	3.8E+04	5.3E-03	1.4E-07	56
	T017001001	2.5E+04	8.6E-03	3.5E-07	141

Tabla 7: Determinación cinética basada en SPR de variantes ISVD TCE y referencia T017000700 para la unión a proteínas de fusión de cremallera TCR $\alpha\beta$ de macaco cangrejero

		Cremallera TCR $\alpha\beta$ de macaco cangrejero				
	ID del ISVD	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Relación K _D frente a ref	Relación K _D de TCR cy/hu
5	T017000700	2.2E+05	1.8E-03	8.0E-09	1.0	3.3
10	T017000938	2.8E+05	1.9E-03	6.7E-09	0.8	3.2
	T017000940	3.2E+05	1.9E-03	6.1E-09	0.8	3.2
	T017000944	2.8E+05	1.9E-03	7.0E-09	0.9	3.0
15	T017000945	2.6E+05	1.8E-03	7.1E-09	0.9	3.1
20	T017000946	2.7E+05	1.9E-03	7.0E-09	0.9	3.1
	T017000949	2.8E+05	1.9E-03	6.8E-09	0.8	3.2
	T017000951	2.6E+05	2.0E-03	7.4E-09	0.9	3.0
25	T017000967	2.0E+05	2.8E-03	1.4E-08	1.7	3.1
	T017000975	2.3E+05	3.4E-03	1.5E-08	1.8	3.9
	T017000976	2.3E+05	3.5E-03	1.5E-08	1.9	3.9

5	T01700097 7	1.8E+05	3.5E-03	1.9E-08	2.4	4.3
	T01700097 8	1.7E+05	3.3E-03	2.0E-08	2.5	4.0
	T01700097 9	1.8E+05	3.5E-03	1.9E-08	2.3	3.8
	T01700098 0	2.1E+05	3.4E-03	1.7E-08	2.1	4.0
10	T01700098 1	2.1E+05	3.5E-03	1.7E-08	2.1	3.8
	T01700099 5	4.7E+04	9.3E-02	2.0E-06	246	2.0
15	T01700099 9	5.1E+04	1.8E-02	3.5E-07	43	2.5
	T01700100 1	3.2E+04	3.4E-02	1.1E-06	133	3.1

Tal como puede observarse a partir de las tablas 6 y 7, la afinidad de las variantes ISVD TCE sigue siendo comparable con la de ISVD TCE de referencia (valores de K_D dentro de 2.5 veces), para todas las construcciones probadas, con la excepción de T017000995, T017000999 y T017001001.

Cada ISVD muestra una K_D 2 a 4 veces mayor en la proteína TCR $\alpha\beta$ de macaco cangrejero que en la proteína TCR $\alpha\beta$ humana. Esto muestra que los ISVD de acuerdo con la presente tecnología tienen potencial de desarrollarse y utilizarse en aplicaciones terapéuticas humanas.

6.4 Ejemplo 4: Unión de ISVD TCE monovalentes a linfocitos T humanos primarios purificados

Se probaron los ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología para determinar su unión a linfocitos T humanos en citometría de flujo. Se evaluaron los siguientes ISVD: T017000700 (referencia), T017000978, T017000995, T017000999 y T017001001. También se añadieron controles negativos. Las células no teñidas

(US, del inglés *Unstained*), las células teñidas únicamente con GAM-PE y las células teñidas únicamente con el anticuerpo ANTI-FLAG® M2 y GAM-PE (a-FLAG + GAM-PE) se incluyeron como controles negativos.

En resumen, se recogieron las células y se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo en V (5×10^4 células por pocillo en 50 μ l) y se incubaron con una dilución en serie de ISVD TCE durante 3.5 horas a 4 °C en tampón FACS (D-PBS (Gibco, 14190) con FBS al 2 % (Sigma, F7524) y azida sódica al 0.05 % (Acros organic, 19038)).

A continuación, las células se lavaron 3 veces con tampón FACS y se incubaron con 1 μ g/ml de anticuerpo monoclonal ANTI-FLAG® M2 (Sigma F1804) durante 30 min a 4 °C, se lavaron de nuevo y se incubaron durante 30 min a 4 °C con 1/100 de fragmento F(ab')₂ AffiniPure IgG de cabra antirratón conjugado con R-ficoeritrina, Fc y fragmento específico (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071; denominado GAM-PE).

Posteriormente, se resuspendieron las células en tampón FACS complementado con yoduro TO-PRO®-3 5 nM (642-661) (Life Technologies - Molecular Probes, T3605) para distinguir células vivas de muertas. Después de la tinción, las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo MACSQuant® (Miltenyi) utilizando el programa informático FlowLogic. En primer lugar, se seleccionó una población P1 que representaba más del 80 % de la población celular total basándose en la distribución de FSC-SSC. De esta población (P1) se excluyeron las células positivas (muertas) para yoduro TO-PRO®-3, y se calculó el valor de PE de intensidad de fluorescencia media.

Los resultados de las mediciones pueden observarse en la figura 1. Como se esperaba, no se observó tinción de los linfocitos T humanos para las condiciones de control sin los ISVD TCE. Adicionalmente, como se puede ver en esta figura, en función de la intensidad de fluorescencia media medida, T017000978 tiene una tinción comparable a la de T017000700 de referencia. Las variantes T017000995, T017000999 y T017001001 tienen una tinción mucho menor, lo que corresponde a

las afinidades de unión determinadas en la proteína de cremallera, como se muestra en la tabla 6.

6.5 Ejemplo 5: Generación de construcciones TCE-CD123-ALB

Las variantes ISVD TCE se formatearon en construcciones ISVD multiespecíficas con un componente básico de ISVD de anclaje tumoral dirigido contra CD123 y un componente básico de ISVD dirigido contra la seroalbúmina humana unida por enlazadores 9GS. El componente básico de la variante TCE se colocó en la posición aminoterminal (posición 1) o en la segunda posición (posición 2); a continuación, el componente básico anti-CD123 se colocó en la posición 2, o la posición 1, respectivamente. En todos las construcciones, el componente básico antiseroalbúmina humana se colocó en la posición carboxiterminal 3. Además de las sustituciones en el componente básico de TCE en las posiciones 61 y 99 (numeración de Kabat), el primer resto de dicho componente básico de TCE se mantuvo como E o se cambió por D, cuando el componente básico de TCE se colocó en la posición 1 en la construcción multiespecífica. La mutación E1D se introduce comúnmente para evitar la formación de piroglutamato. Las construcciones generadas se enumeran en la tabla 8 a continuación. La construcción de referencia T017001017 comprendía el ISVD T017000700 de unión a TCR de referencia.

Tabla 8: Lista de construcciones TCE-CD123-ALB y CD123-TCE-ALB

CD123-TCE-ALB/TCE-CD123-ALB		ISVD anti-TCR en la construcción		Variante de posición de Kabat de TCE en la construcción			
ID de la muestra	SEQ ID NO	Nombre	Posición de TCE en la construcción	Res1	Res61	Res99	Res103
T017001017	58	T017000700	1	E	D	W	W
T017001018	59	T017000978	1	E	E	Y	W
T017001019	60	T017001001	1	E	E	T	W

5	T017001020	61	T017000999	1	E	E	S	W
	T017001021	62	T017000995	1	E	E	Q	W
	T017001022	63	T017000975	1	D	D	W	W
	T017001023	64	T017000991	1	D	E	Y	W
	T017001024	65	T017001001 (E1D)	1	D	E	T	W
10	T017001025	66	T017000999 (E1D)	1	D	E	S	W
	T017001026	67	T017000995 (E1D)	1	D	E	Q	W
	T017001027	68	T017000700	2	E	D	W	W
	T017001028	69	T017000978	2	E	E	Y	W
	T017001029	70	T017001001	2	E	E	T	W
15	T017001030	71	T017000999	2	E	E	S	W
	T017001031	72	T017000995	2	E	E	Q	W

Se utilizaron los siguientes componentes básicos de ISVD TCE en las construcciones enumeradas anteriormente:

Para T017001017 y T017001027, se utilizó el ISVD TCE de referencia T017000700 (SEQ ID NO: 1).

Para T017001018 y T017001028, se utilizó T017000978 (SEQ ID NO: 37).

Para T017001019, T017001024 y T017001029, se utilizó T017001001 (SEQ ID NO: 52). T017001024 contenía además la mutación E1D en el ISVD TCE.

Para T017001020, T017001025 y T017001030, se utilizó T017000999 (SEQ ID NO: 50). T017001025 contenía además la mutación E1D en el ISVD TCE.

Para T017001021, T017001026 y T017001031, se utilizó T017000995 (SEQ ID NO: 46). T017001026 contenía además la mutación E1D en el ISVD TCE.

Para T017001022, se utilizó T017000975 (SEQ ID NO: 34). Este es T017000700 con una mutación E1D.

Para T017001023, se utilizó T017000991 (SEQ ID NO: 42). Este es T017000978 con una mutación E1D.

6.6 Ejemplo 6: Determinación de la afinidad de las construcciones TCE-CD123-ALB respecto a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana y de macaco cangrejero

La unión de construcciones ISVD TCE-CD123-ALB y CD123-TCE-ALB purificadas a la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana (huTCR(2XN9)-cremallera, producida internamente) y proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ de macaco cangrejero (cyTCR(AEA41865)-cremallera, producida internamente) se probó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) (Cytiva, Biocore 8K+). Ambas dianas se inmovilizaron en un chip sensor CM5 utilizando química de acoplamiento de amina convencional. En total, se inyectaron 15 construcciones ISVD (Tabla 8) a 12 concentraciones diferentes (dilución en serie de 20 μ ; a 0.84 nM) en un experimento cinético de múltiples ciclos. Se inyectó cada concentración de los ISVD durante 180 s y se evaluó la disociación durante 600 s.

Se hizo doble referencia a los datos restando una celda de flujo (CF) de referencia y una inyección de tampón de blanco. Las constantes de afinidad (k_a , k_d y K_D) se calcularon mediante la aplicación del modelo de interacción Langmuir 1:1 usando el programa informático de evaluación Biacore Insight (Cytiva, versión 3.0.12.15655). Los resultados de la medición de afinidad de las 15 construcciones ISVD multivalentes (Tabla 8) por la proteína TCR $\alpha\beta$ humana se resumen en la tabla 9 y por la proteína TCR $\alpha\beta$ de macaco cangrejero en la tabla 10.

Tabla 9: Determinación de la afinidad de las construcciones TCE-CD123-ALB por la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ humana

Cinética en la proteína de cremallera TCR humana				
ID de la muestra	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Cambio en veces de K_D a T017001017
T017001017	7.7E+04	3.3E-04	4.3E-09	1

5	T017001018	6.1E+04	4.6E-04	7.6E-09	2
	T017001019	1.4E+04	6.9E-03	5.0E-07	116
	T017001020	2.3E+04	4.6E-03	2.0E-07	47
	T017001021	1.8E+04	2.7E-02	1.5E-06	360
	T017001022	8.5E+04	4.4E-04	5.2E-09	1
10	T017001023	7.2E+04	6.6E-04	9.1E-09	2
	T017001024	1.8E+04	1.5E-02	8.7E-07	205
	T017001025	2.5E+04	7.0E-03	2.8E-07	65
	T017001026	2.5E+04	4.3E-02	1.8E-06	412
	T017001027	1.3E+04	5.9E-04	4.5E-08	11
15	T017001028	1.1E+04	6.9E-04	6.3E-08	15
	T017001029	3.6E+03	1.4E-02	3.8E-06	897
	T017001030	6.0E+03	5.6E-03	9.2E-07	216
	T017001031	5.5E+03	3.9E-02	7.0E-06	1654

Tabla 10: Determinación de la afinidad de las construcciones TCE-CD123-ALB por la proteína de cremallera TCR $\alpha\beta$ de macaco cangrejero

Cinética en la proteína de cremallera TCR de macaco cangrejero					
ID de la muestra	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Cambio en veces de K_D a T017001017	Relación K_D de TCR cy/hu
T017001017	1.2 ^E +05	1.5 ^E -03	1.3 ^E -08	1	2.9
T017001018	1.2 ^E +05	3.9 ^E -03	3.2 ^E -08	3	4.2
T017001019	1.7 ^E +04	2.8 ^E -02	1.6 ^E -06	129	3.3
T017001020	2.8 ^E +04	1.6 ^E -02	5.5 ^E -07	44	2.8
T017001021	2.4 ^E +04	8.2 ^E -02	3.4 ^E -06	274	2.2
T017001022	1.5 ^E +05	2.3 ^E -03	1.5 ^E -08	1	2.9
T017001023	1.9 ^E +05	7.0 ^E -03	3.7 ^E -08	3	4.1
T017001024	2.2 ^E +04	5.1 ^E -02	2.4 ^E -06	189	2.7

T017001025	3.0 ^E +04	2.3 ^E -02	7.8 ^E -07	63	2.8
T017001026	2.9 ^E +04	1.1 ^E -01	3.9 ^E -06	313	2.2
T017001027	3.0 ^E +04	5.8 ^E -03	1.9 ^E -07	15	4.3
T017001028	1.6 ^E +04	6.5 ^E -03	4.0 ^E -07	32	6.4
T017001029	5.3 ^E +03	4.8 ^E -02	9.1 ^E -06	728	2.4
T017001030	7.5 ^E +03	2.7 ^E -02	3.6 ^E -06	286	3.9
T017001031	18.7E+03	1.5E-01	1.8E-05	1402	2.5

En las tablas 9 y 10 se muestran que las variantes ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología, cuando se utilizan en una construcción, conservan su capacidad para unirse al TCR. Esto demuestra que las variantes ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología se pueden utilizar en combinación con un ISVD de direccionamiento. Por lo tanto, son adecuados para el desarrollo y uso en aplicaciones terapéuticas específicas de diana.

6.7 Ejemplo 7: Determinación de la unión de construcciones ISVD TCE-CD123-ALB a linfocitos T humanos primarios purificados

Se determinó la unión dependiente de la dosis mediante las construcciones ISVD TCE-CD123-ALB de acuerdo con la presente tecnología en linfocitos T humanos primarios utilizando citometría de flujo. Se utilizaron las siguientes construcciones: T017001017 (referencia), T017001018, T017001019, T017001020 y T017001021. Las células no teñidas (US), las células teñidas solo con GAM-PE y las células teñidas solo con ABH0074 y GAM-PE (ABH0074 + GAM-PE) se incluyeron como controles negativos.

En resumen, se recogieron las células y se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo en V (5×10^4 células por pocillo en 50 μ l) y se incubaron con una dilución en serie de construcciones ISVD TCE-CD123-ALB durante 2.5 horas a 4 °C en tampón FACS (D-PBS (Gibco, 14190) con FBS al 2 % (Sigma, F7524) y azida sódica al 0.05 % (Acros organic, 19038)).

A continuación, las células se lavaron 3 veces con tampón FACS y se incubaron con 10 μ g/ml de mAb anti-VHH (preparado internamente) durante 30 min a 4 °C, se lavaron de nuevo y se incubaron durante 30 min a 4 °C con 1/100 de

fragmento F(ab')₂ de Affinure de IgG de cabra antirratón conjugado con R-ficoeritrina, Fc y fragmento específico (Jackson Immunoresearch, 115-116-071). Posteriormente, se resuspendieron las células en tampón FACS complementado con yoduro TO-PRO®-3 5 nM (642/661) (Life Techn. - Molecular Probes, T3605) para distinguir células vivas de muertas. Después de la tinción, las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo MACSQuant® (Miltenyi) utilizando el programa informático FlowLogic. En primer lugar, se seleccionó una población P1 que representaba más del 80 % de la población celular total basándose en la distribución de FSC-SSC. De esta población (P1) se excluyeron las células positivas (muertas) para yoduro TO-PRO®-3, y se calculó el valor de PE de intensidad de fluorescencia media.

Los resultados de las mediciones se muestran en la figura 2. Como se esperaba, no se observó tinción de los linfocitos T humanos para las condiciones de control sin los ISVD TCE. Adicionalmente, como puede observarse a partir de esta figura, T017001018 (que comprende ISVD TCE T017000978) y el T017001017 de referencia (que comprende el ISVD TCE T017000700) se unen con una CE₅₀ similar a la de los linfocitos T humanos. T017001019 (que comprende el ISVD TCE T017000995), T017001020 (que comprende el ISVD TCE T017000999) y T017001021 (que comprende el ISVD TCE T017001001), por otro lado tienen afinidades de unión más bajas por linfocitos T humanos. Esto corresponde a la unión observada en las proteínas de cremallera, como se muestra en la tabla 9.

6.8 Ejemplo 8: Las construcciones TCE-CD123-ALB multiespecíficas inducen la destrucción de células diana mediada por linfocitos T humanos

Ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo

Las construcciones ISVD de acuerdo con la presente tecnología se caracterizaron adicionalmente por la destrucción mediada por linfocitos T redirigidos en un ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo usando linfocitos T primarios humanos como células efectoras y células diana no adherentes. Las células diana se marcaron con colorante de membrana PKH26 4 µM utilizando el kit enlazador celular fluorescente rojo PKH26 (Sigma, PKH26GL-1KT) de acuerdo con

las instrucciones del fabricante. Se incubaron de manera conjunta las células efectoras (2.5×10^5 células/pocillo) y células diana marcadas con PKH26 (2.5×10^4 células/pocillo) en placas de fondo en V de 96 pocillos (Greiner Bio-one, n.º 651 180) (relación efector frente a diana de 10:1) en medio de ensayo de la línea celular diana (medio de crecimiento diana con penicilina/estreptomicina al 1 % (Life Technologies, 15140) y Alburex HSA 30 μ M (CSL Behring, 2160-679)). Para el análisis de lisis celular dependiente de la concentración, se añadieron diluciones en serie de construcciones ISVD en medio de ensayo diana a las células y se incubaron durante 18 h en una atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. Después de la incubación, las células se sedimentaron mediante centrifugación y se lavaron con tampón FACS (D-PBS (Gibco, 14190) con FBS al 10 % (Sigma, F7524) y azida sódica al 0.05 % (Acros organic, 19038)). Posteriormente, se resuspendieron las células en 100 μ l de tampón de FACS complementado con yoduro TO-PRO®-3 5 nM (642/661) (ThermoFisher Scientific, T3605) para distinguir las células vivas de las muertas. Las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo MACSQuant X (Milenyi Biotec). Por muestra, se adquirió un volumen total de muestra de 70 μ l. La selección se estableció en células positivas para PKH26, y dentro de esta población, se determinaron las células positivas para TO-PRO®-3. El porcentaje de lisis específica = ((% de TO-PRO-3+sin construcción – % de TO-PRO-3+con construcción)/ % de TO-PRO-3+sin construcción)) $\times$ 100. El ensayo se llevó a cabo en presencia de una cantidad en exceso de HSA, para que los ISVD estuvieran completamente saturados con HSA tal como se ha descrito anteriormente.

Resultados

Para evaluar la funcionalidad de las variantes ISVD TCE como activadores de linfocitos T, se evaluaron los formatos TCE-CD123-ALB enumerados en la tabla 8 en un ensayo de destrucción de células MOLM-13 mediada por linfocitos T basado en citometría de flujo utilizando linfocitos T primarios humanos (dos donantes) en combinación con la línea de células diana MOLM-13 humana que expresa CD123 en presencia de HSA 30 μ M como se describió anteriormente. La ilustración gráfica

de estos resultados se muestra en las figuras 3A a F. Los valores de CE_{50} calculados para la destrucción de células diana se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: CE_{50} (M) de construcciones TCE-CD123-ALB en el ensayo de destrucción de células MOLM-13 mediada por linfocitos T humanos basado en citometría de flujo utilizando una relación de efector respecto a diana de 10 a 1 en presencia de HSA 30 μ M

		Agotamiento de MOLM-13	
ID de la muestra	Posición de TCE en la construcción	CE_{50} (M) del donante n.º 1	CE_{50} (M) del donante n.º 2
T017001017	1	4.5E-11	9.2E-11
T017001018	1	3.3E-11	1.0E-10
T017001019	1	1.5E-10	5.2E-10
T017001020	1	4.7E-11	2.3E-10
T017001021	1	2.3E-10	2.1E-09
T017001022	1	1.5E-11	1.4E-10
T017001023	1	2.4E-11	1.1E-10
T017001024	1	1.8E-10	9.8E-10
T017001025	1	6.6E-11	3.4E-10
T017001026	1	3.4E-10	4.4E-09
T017001027	2	5.7E-10	2.8E-09
T017001028	2	6.7E-10	3.2E-09
T017001029	2	Negativa	Negativa
T017001030	2	5.8E-09	Negativa
T017001031	2	Negativa	Negativa

Como puede observarse de la tabla 11 y la figura 3, todas las construcciones en las que el componente básico TCE estaba en la posición aminoterminal (posición 1) mediaron una potente destrucción celular de las células diana. Adicionalmente, la mutación en la primera posición del ISVD TCE del ácido glutámico al ácido aspártico no afectó significativamente a la potencia de destrucción de la

construcción. Además, parece que tener el ISVD TCE en la posición aminoterminal de la construcción da como resultado una potencia aumentada en comparación con colocar el mismo ISVD TCE en la segunda posición en la construcción.

Sorprendentemente, las construcciones ISVD T017001019, T017001020 y T017001021, que contienen los ISVD TCE, T017001001, T01700999 y T017000995 respectivamente, con una menor afinidad por la proteína de cremallera TCR y linfocitos T humanos que las otras construcciones, tienen una potencia elevada para la destrucción de células diana. De hecho, aunque la afinidad observada en la proteína de cremallera TCR humana así como en linfocitos T humanos fue más de 40 veces menor que la referencia (véanse las tablas 6 y 9 y las figuras 1 y 2), la potencia para la destrucción de células diana no fue significativamente diferente.

Se ha informado que una baja afinidad por el receptor de linfocitos T, en comparación con la afinidad por la diana asociada a tumor, es importante para la distribución en el tejido tumoral frente a los tejidos linfoides secundarios ricos en linfocitos T. Se desea el direccionamiento preferencial del tejido tumoral para reducir la eliminación de la diana mediada por linfocitos T.

Estas construcciones ISVD particulares con baja afinidad por el TCR y alta potencia para la destrucción de células diana pueden ofrecer, por tanto, una posibilidad única de generar agentes bioterapéuticos activadores de linfocitos T que mantienen una potencia elevada, pero que pueden dosificarse a niveles más bajos debido a una mayor exposición al tejido tumoral, lo que a su vez puede reducir los riesgos de toxicidad.

En conclusión, las variantes ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología son muy adecuadas para su uso en una construcción para aplicación terapéutica específica de diana en seres humanos.

6.9 Ejemplo 9: La construcción TCE-CD123 multiespecífica induce la destrucción de células diana mediada por linfocitos T humanos y de macaco cangrejero de células KG-1a

Con el fin de evaluar si las construcciones ISVD TCE-CD123-ALB eran capaces de destruir células tumorales, se realizaron ensayos de citotoxicidad con

linfocitos T humanos o de macaco cangrejero aislados como células efectoras. Se probaron las construcciones ISVD T017001017, T017001018, T017001019, T017001020 y T017001021. T017000968 (SEQ ID NO: 75) se incluyó como control negativo. T017000968 comprende el ISVD T017000975 anti-TCR y un ISVD de unión a albúmina, pero no un ISVD anti-CD123.

Destrucción mediada por linfocitos T redirigidos de células diana CD123 por construcciones TCE-CD123-ALB en un ensayo basado en citometría de flujo

Se recogieron linfocitos T humanos de la capa leucoplaquetaria de voluntarios sanos (Blood bank Gent) usando RosetteSep (StemCell Technologies, 15061) seguido por enriquecimiento en Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se comprobó la calidad y pureza de los linfocitos T humanos purificados con anticuerpos marcados con fluorescencia anti-CD3 (eBioscience, 12-0037-73), anti-CD8 (BDBiosciences, 555367), anti-CD4 (BD Biosciences, 345771), anti-CD45RO (BD Biosciences, 555493), anti-CD45RA (BDBiosciences, 550855), anti-CD19 (BDBiosciences, 555413), anti-CD25 (BDBiosciences, 557138) y anti-CD69 (BDBiosciences, 557050) en un ensayo de citometría de flujo. Las células se congelaron en nitrógeno líquido.

Se aislaron linfocitos T de macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) en el laboratorio (Sanofi, Montpellier, Francia) a partir de PBMC (aisladas mediante centrifugación de densidad Ficoll) usando el kit de aislamiento de linfocitos pan T (Miltenyi, 130-091-993) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se congelaron en nitrógeno líquido.

Las células KG1a que expresan CD123 humanas se marcaron con colorante de membrana PKH-26 4 µM utilizando el kit enlazador de células fluorescente rojo PKH26 (Sigma, PKH26GL-1KT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se utilizaron como células diana. Se incubaron de manera conjunta 2.5×10^5 células efectoras (es decir, linfocitos T primarios humanos o de macaco cangrejero) y 2.5×10^4 células diana (es decir, células KG1a marcadas con PKH) en placas de fondo en V de 96 pocillos (relación efector frente a diana de 10:1). Para medir la lisis

celular dependiente de la concentración, se añadieron diluciones en serie de las construcciones TCE-CD123-ALB en medio de ensayo con HSA 30 μ M (CSL Behring, seroalbúmina humana Alburex 20) a las células y se incubaron durante 18 horas en una atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C.

Después de la incubación, las células se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en tampón FACS complementado con yoduro TO-PRO®-3 5 nM (642/661) (Life Techn. - Molecular Probes, T3605) para distinguir células vivas de muertas. Las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo MACSQuant® (Miltenyi). La selección se estableció en células diana positivas para PKH26, y dentro de esta población se determinó el porcentaje de células positivas para yoduro TO-PRO®-3.

Resultados

Los resultados se pueden observar a continuación en la tabla 12 y en la figura 4.

Tabla 12: Construcciones de TCE-CD123-ALB en el ensayo de destrucción de células KG-1a mediada por linfocitos T basado en citometría de flujo

ID de la muestra	Potencia (M) – linfocitos T humanos	Potencia (M) – linfocitos T de macaco cangrejero
T017001017	2.1E-10	3.9E-11
T017001018	2.7E-10	4.0E-11
T017001019	2.3E-09	7.4E-10
T017001020	7.6E-10	2.3E-10
T017001021	5.7E-09	9.4E-10
T017000689	-	-

Como puede observarse a partir de la tabla 12 y la figura 4, todas las construcciones ISVD TCE eran potentes en la destrucción de células KG-1a tanto con linfocitos T humanos como de macaco cangrejero. Como se esperaba, la construcción de control negativo T017000689 no mostró destrucción celular.

Los ISVD TCE de baja afinidad T017001019, T017001020 y T017001021 también tenían potencia elevada en el ensayo de destrucción de células KG1-A. Esto respalda además que estas construcciones TCE con componentes básicos anti-TCR de baja afinidad tienen un potencial significativo como agentes bioterapéuticos activadores de linfocitos T, como se ha mencionado en el ejemplo 8.

Además, para todos los formatos TCE-CD123-ALB probados, la actividad citotóxica mediada observada para cada uno de los formatos usando linfocitos T humanos como células efectoras fue muy similar a la actividad mediada por linfocitos T de macaco cangrejero.

Por tanto, este ensayo de destrucción celular respalda además que las variantes ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología son muy adecuadas para su uso en una construcción para aplicación terapéutica específica de diana en seres humanos.

6.10 Ejemplo 10: Funcionalidad de la fusión TCE-GPC3-GPC3-ALB

Generación de una fusión TCE-GPC3-GPC3-ALB

Las variantes ISVD TCE se formatearon en construcciones ISVD multiespecíficas con dos componentes básicos ISVD de anclaje a tumores dirigidos contra el glipicano-3 (GPC3) y un componente básico ISVD dirigido contra seroalbúmina humana unida por enlazadores 5GS y 9GS. El primer resto del componente básico TCE se cambió por D. Las construcciones generadas se enumeran en la tabla 13 a continuación. La construcción de referencia (A022600427) comprendía el ISVD T017000975 de unión a TCR de referencia (T017000700 con la mutación E1D; SEQ ID NO: 34), dos componentes básicos ISVD de anclaje a tumores dirigidos contra el glipicano-3 (GPC3) y un ISVD de unión a seroalbúmina humana. El control negativo (T017000698) no comprendía los componentes básicos ISVD anti-GPC3.

Ensayo de citotoxicidad basado en impedancia

Las construcciones ISVD se caracterizaron por la destrucción mediada por linfocitos T redirigidos en un ensayo de citotoxicidad basado en impedancia (por

ejemplo, como se describe en el documento WO2018091606A1) usando linfocitos T efectores primarios humanos o de macaco cangrejero y células diana adherentes. Los cambios en la impedancia inducidos por la adherencia de células diana a la superficie de un electrodo se midieron utilizando el instrumento xCELLigence (Roche). Los linfocitos T no son adherentes y, por lo tanto, no afectan a las mediciones de impedancia. El instrumento xCELLigence® RTCA MP cuantifica los cambios en la impedancia eléctrica, mostrándolos como un parámetro dimensional denominado índice celular, que es directamente proporcional al área total del pocillo de cultivo tisular que está cubierto por las células. A cada pocillo de una placa E de 96 (ACEA Biosciences; 05 232 368 001) se añadieron 50 µl de Alburex HSA 120 µM (CSL Behring, 2160-679) para tener una concentración final de 30 µM en medio de ensayo (medio de crecimiento celular diana + penicilina/estreptomicina al 1 % (Life technologies, n.º de cat. 15140)). No se utilizaron los pocillos externos y se llenaron con 200 µl de medio o D-PBS. La placa E de 96 se colocó en la estación xCELLigence® (en la incubadora a 37 °C en CO₂ al 5 %) y se realizó una única medición para medir la impedancia de fondo del medio de ensayo, en ausencia de células. Posteriormente, se sembraron 50 µl de células diana (2×10^4 células/pocillo) en medio de ensayo en la placa E de 96, y se añadieron 50 µl de soluciones de construcción ISVD diluidas en serie (concentración 4×) en medio de ensayo. (Volumen final = 200 µl). Después de 30 min a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl de células T 5 primarias (3×10^5 células/pocillo) en medio de ensayo por pocillo para conseguir una relación de efector respecto a la diana de 15:1. La placa se colocó en la estación xCELLigence® y se midió la impedancia cada 15 min durante 4 días. Los datos se analizaron en un punto temporal fijo (60 horas).

Las construcciones generadas se muestran a continuación en la tabla 13.

Tabla 13: Lista de construcciones TCE-GPC3-GPC3-ALB y de control

ID de la construcción	ID de ISVD TCE	SEQ ID
A022600427	T017000975	73

A022600462	T017000991	74
T017000698	T017000975	75

Resultados

La variante ISVD TCE T017000991 (SEQ ID NO: 42) se comparó con la referencia T017000975 (SEQ ID NO: 34) en una construcción de fusión con dos componentes básicos ISVD contra el anclaje tumoral GPC3 (glipicano-3) y un componente básico ISVD dirigido contra albúmina unida por enlazadores GS. Como control negativo, se generó una construcción sin los ISVD de unión a GPC3 (T017000698, tabla 13). Como control positivo, se generó un anticuerpo biespecífico que se une a GPC3. Un brazo de este anticuerpo se une a GPC3 y el otro se une a CD3. En las figuras 5A a D se muestra una ilustración gráfica de los resultados. Los valores de CI_{50} calculados para la destrucción de células diana se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. CI_{50} (M) de las construcciones TCE-GPC3-GPC3-ALB en el ensayo de destrucción de células HuH-7 mediada por linfocitos T humanos y de macaco cangrejero basado en impedancia utilizando una relación efector-diana de 15 a 1 en presencia de HSA 30 μ M

Agotamiento de HuH-7 mediado por TCE-GPC3-GPC3-ALB				
ID de la muestra	CI_{50} (M) del donante humano n.º 1	CI_{50} (M) del donante humano n.º 2	CI_{50} (M) del donante macaco cang. n.º 1	CI_{50} (M) del donante macaco cang. n.º 2
A022600427	3.0E-10	1.1E-10	2.3E-08	2.5E-10
A022600462	2.8E-10	1.0E-10	3.9E-09	2.2E-10
T017000698	Negativa	mal ajuste a la curva	Negativa	Negativa
Control positivo	1.0E-10	1.5E-10	6.0E-11	2.5E-11

Los valores de CI_{50} para las dos construcciones con los componentes básicos TCE fusionados a los ISVD de unión a GPC3 son comparables cuando se utilizan

linfocitos T humanos o de macaco cangrejero. Como se esperaba, la construcción sin los ISVD de unión a GPC3, es decir, solo los ISVD de unión a TCR $\alpha\beta$ fusionados a los ISVD de unión a seroalbúmina humana, no mediaron ningún nivel, o solo bajos, de destrucción celular.

5 **6.11 Ejemplo 11: Evaluación de la estabilidad química de los ISVD TCE**

Para evaluar la estabilidad química de los ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología, se realizó un estudio de degradación forzada con T017000991 (SEQ ID NO: 42) y se comparó con la referencia T017000975 (SEQ ID NO: 34) a los cuales se les unió un marcador HIS6 (SEQ ID NO: 78).

10 El estudio consistió en una oxidación forzada con 10 mM de H₂O₂ y un periodo de incubación de cuatro semanas a 25 °C y 40 °C, imitando condiciones aceleradas y condiciones de estrés, respectivamente. Después de la prueba de estrés, se analizó la estabilidad de T017000991 mediante mapeo de péptidos usando digestión con tripsina, una separación de péptidos por cromatografía de fase inversa y espectrometría de masas, detección MS/MS. Se exploraron las siguientes

15 modificaciones de la molécula para: desamidación, isomerización/racemización y oxidación de metionina o triptófano. Para evaluar el valor de la optimización de secuencia de T017000991, se comparó la estabilidad química del ISVD con las modificaciones químicas con la referencia T017000975.

20 Resultados

Los resultados del análisis de mapeo de péptidos para las diferentes condiciones de temperatura se presentan a continuación en la tabla 15.

25

30

Tabla 15: Comparación del análisis del mapa de péptidos tripticos de T017000991 y T017000975 (control) después de estrés por temperatura.

					% de péptido en T017000975			% de péptido en T017000991		
Marcad or del fragmen to	Péptido	SEQ ID NO	Modificadores (numeración de Kabat)	T0	Δ 4sem 25 °C	Δ 4sem 40 °C	T0	Δ 4sem 25 °C	Δ 4sem 40 °	
T7	VAHISIG DQTDYA DSAK	182	Isomerización D61	1.0	+0.3	+2.1	N.D.	N.D.	N.D.	
T11	NTVYLQ MNSLRP EDTAAYY CR	183	Desamidación N82a	1.1	0.0	+0.4	1.1	+0.1	+0.2	
T11	NTVYLQ MNSLRP EDTAAYY CR	183	Desamidación N82a	0.5	+0.2	+1.0	0.7	+0.1	+0.7	
T11	NTVYLQ MNSLRP EDTAAYY CR	183	Oxidación M82	1.6	+1.2	+0.5	1.4	-0.1	+2.8	
T13	IWPYDY WGQGTL VTVSSAA AHHHHH HH	184	Oxidación W99	0.6	+0.2	+0.3	N.D.	N.D.	N.D.	

No se observaron cambios significativos en condiciones de oxidación forzada. La cobertura de secuencia fue de aproximadamente un 85% para ambas

moléculas. En combinación con la digestión de AspN se obtuvo cobertura de secuencia del 100 % para ambas moléculas. No se detectó ninguna modificación adicional.

Se identificaron dos inconvenientes químicos en T017000975: D61 es propenso a la isomerización y W99 a la oxidación (numeración de Kabat). Como se mencionó anteriormente, estos dos aminoácidos sensibles se sustituyeron en T017000991 (D61E, W99Y) dando como resultado la eliminación completa de estos dos inconvenientes en el ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología en las condiciones evaluadas.

En consecuencia, la estabilidad química de los ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología se ha mejorado con respecto al ISVD TCE de referencia.

6.12 Ejemplo 12: Estabilidad química de ISVD TCE como parte de una construcción ISVD formateada

Para demostrar adicionalmente la mejora de la estabilidad de los ISVD TCE de acuerdo con la presente tecnología, se analizó la estabilidad química de T017000991 como parte de una construcción ISVD formateada.

Se realizó un estudio de almacenamiento a corto plazo. Se formatearon T017000991 así como T017000975 (como control) con dos ISVD anti-GPC3 y un ISVD que se unía a la seroalbúmina humana. Las construcciones se indican a continuación en la Tabla 16.

Tabla 16

ID de la construcción ISVD	SEQ ID NO	Formato
A022600424	76	T017000975-GPC3-GPC3-ALB
A022600462	74	T017000991-GPC3-GPC3-ALB

La oxidación del triptófano y la isomerización del ácido aspártico se han observado durante el almacenamiento cuando se almacenó una molécula formateada como un líquido con un tampón de formulación adecuado.

En ese momento, se descubrió que la tasa de oxidación del triptófano dependía del pH, la temperatura, la concentración de ISVD, el metal de transición y

el polisorbato 20. Por lo tanto, con el fin de acelerar cualquier posible acontecimiento de oxidación, se realizó un estudio de estrés. Las condiciones de estrés consistieron en una incubación a 40 °C/humedad relativa (HR) del 75 % $\pm$ HR del 5 %, más la adición de 100 ppm de Fe(II), como oxidante, durante 3 meses en tubos de plástico.

5 Para este estudio, ambas construcciones ISVD se formularon a 1 mg/ml en histidina-HCl 25 mM, sacarosa al 8 % (p/v), tampón a pH 6.5 al 0.01 % (p/v) y la estabilidad a 25 °C/HR del 60 % $\pm$ HR del 5 % también se supervisó durante un periodo de 3 meses.

10 El perfil de estabilidad se controló mediante cromatografía de fase inversa tras los máximos con un tiempo de retención relativo (TRR) <1.0 como indicación de la oxidación del triptófano y mediante mapeo de péptidos tras la digestión con tripsina y LC-MS/MS en fase inversa.

Resultados

15 La ilustración gráfica de los resultados se puede observar en la figura 6, la cual muestra los perfiles de estabilidad a 25 °C siguiendo el máximo con TRR <1.0 mediante cromatografía de fase inversa. Se observó una reducción en la tasa de oxidación de A022600462 en comparación con A022600424, con una reducción de 5 veces de la oxidación de triptófano.

20 Puede observarse una tendencia similar durante la evaluación de los perfiles de estabilidad en condiciones de estrés (Figura 7). La adición de Fe(II) a la solución de formulación catalizó la tasa de oxidación de las construcciones ISVD en presencia de polisorbato 20 e histidina. Después de un día de incubación a 40 °C, la tasa de oxidación de A022600462 fue aproximadamente cuatro veces menor en comparación con el control A022600424. La tasa de oxidación más baja todavía era
25 visible después de 14 días de condiciones de degradación forzada.

30 Se usó mapeo de péptidos para determinar con precisión dónde estaban teniendo lugar los diferentes acontecimientos de oxidación en la secuencia de aminoácidos. Se analizaron las muestras para determinar la estabilidad frente al estrés térmico y se compararon con este fin. Después de la digestión con tripsina, casi un 85 % de la secuencia pueden cubrirse por los péptidos producidos. Con el

programa informático Biopharma Finder (BPF; versión 3.2) en el espectrómetro de masas (MS) se pudieron identificar los diferentes péptidos y dilucidarse las modificaciones químicas en ellos. Los resultados mostraron que había diferentes sitios de oxidación de triptófano en los formatos seleccionados, siendo el del ISVD TCE ubicado en el número de péptido 13, de forma más precisa en W99 (A022600424) y W103 (A022600424 y A022600462). Los resultados se muestran en la figura 8.

El análisis de mapeo de péptidos de las muestras de los estudios de estabilidad de almacenamiento mostró que la tasa de oxidación global en A022600462 era mucho menor en comparación con A0022600424, ya que el triptófano W99 se eliminó de la secuencia anterior. La tasa de oxidación en el segundo triptófano parece permanecer estable, mientras que la oxidación del triptófano en otros componentes básicos presentes en el formato no parece verse afectada por las sustituciones de aminoácidos introducidas. Como se esperaba, la eliminación del resto D61 dio como resultado la eliminación del inconveniente de isomerización en el formato final.

En conclusión, los problemas asociados con la oxidación e isomerización del triptófano en los ISVD se han superado mediante a sustitución de los aminoácidos en las posiciones en cuestión, mientras que se ha mantenido la funcionalidad del ISVD.

7 Aplicabilidad industrial

Los ISVD, polipéptidos, moléculas de ácido nucleico que codifican los mismos, vectores que comprenden los ácidos nucleicos y composiciones descritas en el presente documento pueden utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de sujetos que padecen cáncer.

Tabla A-6: Listado de secuencias

Nombre	SEQ ID	Secuencia
	NO	

5	T017000700	1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
	T017000937	2	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYANSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
	T017000938	3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAPSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
10			
15	T017000939	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAKSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
	T017000940	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYARSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
20			
25	T017000941	6	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAIKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
	T017000942	7	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYATSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS

5	T017000943	8	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAHSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
	T017000944	9	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAVSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
10	T017000945	10	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
15	T017000946	11	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAASAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
	T017000947	12	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAYS AKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
20	T017000948	13	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYALSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
25	T017000949	14	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAQSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS

5	T017000950	15	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAFSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
	T017000951	16	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYASSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
10	T017000952	17	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYRGQGTLVTVSS
15	T017000953	18	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYAGQGTLVTVSS
	T017000954	19	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYESQGTLVTVSS
20	T017000955	20	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYYGQGTLVTVSS
25	T017000956	21	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYLGGTLVTVSS

5	T017000957	22	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYHGQGTLVTVSS
	T017000958	23	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYIGQGTLVTVSS
	T017000959	24	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYQGQGTLVTVSS
10			
15	T017000960	25	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYVGQGTLVTVSS
	T017000961	26	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYKGQGTLVTVSS
20			
25	T017000962	27	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYSGQGTLVTVSS
	T017000963	28	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYGGQGTLVTVSS

5	T017000964	29	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYPGQGTLVTVSS
	T017000965	30	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYFGQGTLVTVSS
	T017000966	31	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYTGQGTLVTVSS
10			
15	T017000967	32	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000974	33	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSS
20			
25	T017000975	34	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAPSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000976	35	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYARSAKGRFTI SRDESKNTVYVLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPY DYWGQGTLVTVSS

5	T017000977	36	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAVSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000978	37	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000979	38	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAASA KGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYWGQGTLVTVSS
10			
15	T017000980	39	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAQSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000981	40	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYASSAKGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYWGQGTLVTVSS
20			
25	T017000982	41	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYYGQGTLVTVSS
	T017000991	42	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYWGQGTLVTVSS

5	T017000992	43	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIAPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000993	44	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000994	45	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIDPY DYWGQGTLVTVSS
10			
15	T017000995	46	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIQPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000996	47	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIEPY DYWGQGTLVTVSS
20			
25	T017000997	48	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIRPY DYWGQGTLVTVSS
	T017000998	49	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIFPY DYWGQGTLVTVSS

5	T017000999	50	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRISPY DYWGQGTLVTVSS
	T017001000	51	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIGPY DYWGQGTLVTVSS
10	T017001001	52	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRITPY DYWGQGTLVTVSS
15	T017001002	53	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIHPY DYWGQGTLVTVSS
	T017001003	54	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIVPY DYWGQGTLVTVSS
20	T017001004	55	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYASAGRFTIS RDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIKPYD YWGQGTLVTVSS
25	T017001005	56	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRILPY DYWGQGTLVTVSS

5	T017001006	57	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYWGQGTLVTVSS
	T017001017	58	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGK EREGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDNKNT VYLMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADY EYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAP GKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTL VTVSS
	T017001018	59	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPY DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKE REGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDNKNTV YLMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYE YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS

5

10

15

20

25

30

T017001019	60	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLYQMNSLRPEDTAAYYCRALSRITPY DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKE REGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDNKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYE YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTV TLYLYQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS
T017001020	61	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLYQMNSLRPEDTAAYYCRALSRISPY DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKE REGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDNKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYE YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTV TLYLYQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS
T017001021	62	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLYQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIQPY DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKE

5			REGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDNKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYE YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSS
10	T017001022	63	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGK EREGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDNKNT VYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADY EYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAP GKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN S KNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT L VTVSS
15			
20	T017001023	64	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPY DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKE REGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDNKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYE YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN
25			

5

10

15

20

25

30

		TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSS
T017001024	65	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVY LQMNSLRPEDTAAYYCRALS RITPY DYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKE REGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDN AKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYE YDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSS
T017001025	66	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVY LQMNSLRPEDTAAYYCRALS RISP Y DYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKE REGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDN AKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYE YDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSS
T017001026	67	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVY LQMNSLRPEDTAAYYCRALS RIQPY

5			DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKE REGVSCISSSDGYTTYADSVKGRFTISRDNKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYE YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTV TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVT VSS
10	T017001027	68	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVI GWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTTYADSVKGRF TISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSS SCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTV TLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVT VSS
15			
20			
25	T017001028	69	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVI GWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTTYADSVKGRF TISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSS SCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPY DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG
30			

			VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTV SS
5	T017001029	70	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVI GWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTTYADSVKGRF TISRDN AKNTVY LQMNSLRPEDTALYYCATDPYYS SCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY 10 GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVY LQMNSLRPEDTAAYYCRALSRITPY DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT 15 LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTV SS
20	T017001030	71	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVI GWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTTYADSVKGRF TISRDN AKNTVY LQMNSLRPEDTALYYCATDPYYS SCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESA KGRFTI SRDESKNTVY LQMNSLRPEDTAAYYCRALSRISPY DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG 25 VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTV SS

T017001031	72	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVI GWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTTYADSVKGRF TISRDNKNTVYLMNSLRPEDTALYYCATDPYYS SCHPFFADYEYDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIQPY DYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNT LYLMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLTV SS
A022600427	73	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAAGRFTI SRDESKNTVYLMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTTLTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPG GGSLRLSCAASGFTFSSFAMTWVRRPPGKGLEW VATITNAGVTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLM NSLRPEDTALYICANARRTGPRAPTDIGSYRGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAASGSIFRSVFSSSTMEWYRQAPGKKREL VARIAPGEGTYYGALYADSVKGRFTISRDNKNTVY LMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTTLTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSA
A022600462	74	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAAGRFTI

5			SRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPY DYWGQGTLTVTVSSGGGGGSEVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAASGFTFSSFAMTWVRRPPGKGLEW VATITNKGVT SYADSVKGRFTISRDNANTLYLQM NSLRPEDTALYICANARRTGPRAPTDIGSYRGQGT LTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAASGSIFRSVFSSSTMEWYRQAPGKKRELV ARIAPGEGTYYGALYADSVKGRFTISRDNANTVY LQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGT LTVTVSSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGT LTVTVSSA
15	T017000698	75	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTI SRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWP YDYWGQGTLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LTV TVSSA
25	A022600424	76	VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTIS RDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPY DYWGQGTLTVTVSSGGGGGSEVQLVESGGGVVQP GGSLRLSCAASGFTFSSFAMTWVRRPPGKGLEW VATITNKGVT SYADSVKGRFTISRDNANTLYLQM NSLRPEDTALYICANARRTGPRAPTDIGSYRGQGT LTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL

5			RLSCAASGSIFRSVFSSSTMEWYRQAPGKKRELV ARIAPGEGTYYGALYADSVKGRFTISRDNANTVY LQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSA
10	Marcador FLAG3-HIS6	77	AAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHH H
	Marcador HIS6	78	HHHHHH
15	CDR1 de ISVD TCE (Kabat)	79	INFYG
	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	80	HISIGDQTDYAX ₁ SAKG
20	CD3 de ISVD TCE (Kabat)	81	LSRIX ₂ PYDY
	CDR1 de ISVD TCE (Abm)	82	GYVHKINFYG
25	CDR2 de ISVD TCE (Abm)	83	HISIGDQTD
	CDR3 de ISVD TCE (Abm)	84	LSRIX ₂ PYDY

5	ISVD TCE	85	X ₀ VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFY GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAX ₁ SAKGRFT ISRDESKNTVY ₂ LQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIX ₂ P YDYX ₃ GQGTLTVSS
	Enlazador 5GS	86	GGGGS
	Enlazador 9GS	87	GGGGSGGGS
10	ISVD carboxitermin al	88	VTVSS
	ISVD carboxitermin al	89	VKVSS
15	ISVD carboxitermin al	90	VQVSS
	ISVD carboxitermin al	91	VTVKS
20	ISVD carboxitermin al	92	VTVQS
	ISVD carboxitermin al	93	VKVKS
25	ISVD carboxitermin al	94	VKVQS
	ISVD carboxitermin al		
30			

5	ISVD carboxitermin al	95	VQVKS
	ISVD carboxitermin al	96	VQVQS
	ISVD carboxitermin al	97	VTVSSA
10	ISVD carboxitermin al	98	VKVSSA
15	ISVD carboxitermin al	99	VQVSSA
	ISVD carboxitermin al	100	VTVKSA
20	ISVD carboxitermin al	101	VTVQSA
25	ISVD carboxitermin al	102	VKVKSA
	ISVD carboxitermin al	103	VKVQSA

5	ISVD carboxitermin al	104	VQVKSA
	ISVD carboxitermin al	105	VQVQSA
10	Dominio constante de TCR alfa humano (derivado de P01848)	106	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF ETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWS S
15	Dominio constante de TCR beta humano (derivado de P01850)	107	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSV SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMV KRKDF
20	TCR alfa de macaco de la India (AEA41863)	108	MLLLLVLVLEVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVSVSEG VPVLLRCNYSSSFSPYLFWYVQYPNQGLQLLLKYT SGTTLVKGINGFEAEFKKSETSFHLTKASAHVSDA AEYFCALARGALVFGKGTRLSVIPNIQNPDPAVYQ LRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHIT DKTVLDMRSMDFKSNGAVAWSNKSDFACTSAFK DSVIPADTFFPGTESVCDANLVEKSFETDMNLFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
25	TCR beta de macaco de la	109	MGFWTLCCVSFCILVAKHTDAGVIQLPRHEVTEMG KEVTLRCEPISGHSSLFWYRQTM MRGLEFLIYFNN KSPIDDSGMPKDRFSATMPDASFSTLKIQPSEPRD
30			

5

10

15

20

25

30

India (AEA41864)		SAVYFCASTPGQGREGKLFSGTQLSVLEDLKKVF PPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVE LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALEDSRYC LSSRLRVSATFWHNPРНHFRСQVQFYGLSEDDE WTEDRDKPITQKISAEVWGRADCGFTSVSYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVLVСALMLMAMVKRKDF
Cremallera TCR humana: cadena alfa	110	MNMRPVTSSVLVLLLMLRRSNGQLLEQSPQFLSIQ EGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPVLLVT VVTGGEVKKKRLTFQFGDARKDSSLHITAAQPGD TGLYLCAGAGSQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDPА VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDV YITDKSVLDMRSMDFKSNSАVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPЕSSCSSLVPRGSTTAPSAQ LKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQEQLISE EDL
Cremallera TCR humana: cadena beta	111	MSNTVLADSAWGITLLSWWTVFLLGTSSADGGITQ SPKYLFRKEGQNVTLSCЕQNLNHDAMYWYRQDP GQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESF PLTVTSAQKNPTAFYLCASSSRSSYEQYFGPGTRL TVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYSLSSRLRVSATFWQNPRНHFRСQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCSS ADLVPRGSTTAPSAQLEKELQALEKENAQLEWEL QALEKELAQTGHHHHHHHHHHH
Cremallera TCR de macaco cangrejero:	112	MLLITSVLVLWMQLSQVNGQQIMQIPQYQHVGEG EDFTTYCNSSTTLСNIQWYKQRPGGHPVFLIMLVK SGEVKKQKRLIFQFGEAKKNSSLHITATQTТDVGТ YFCATTGVNNLFFGTGTRLTVLPYIQNPDPАVYQL

5	cadena alfa (derivada de AEA41865)		RGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITD KTVLDMRSMDFKSNGAVAWSNKSDFACTSAFKD SVIPADTFFPSPESSCSSADLVPRGSTTAPSAQLK KKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQEQLISEED L
10	Cremallera TCR de macaco cangrejero: cadena beta (derivada de AEA41866 y AEA41868)	113	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTG QSMTLQCAQDMNHDYMYWYRQDPGMGLRLIHYS VGEGSTEKGEVPDGYNVTRSNTEDFPLRLESAAP SQTSVYFCASSYWTGRSIEQYFGPGTRLTVIEDL KKVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALED SRYSLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFYGLSE DDEWTEDRDKPITQKISAEAWGRADCSSADLVPR GSTTAPSAQLEKELQALEKENAQLEWELQALEKEL AQTGHHHHHHHHHH
20	Dominio constante de TCR alfa humano (derivado de P01848)	114	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC
25	Dominio constante de TCR beta humano (derivado de P01850)	115	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC

5	Dominio constante de TCR-alfa de macaco cangrejero (derivado de AEA41865)	116	PYIQNPDPVYQLRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMN VSQSKDSDVHITDKTVLDMRSMDFKSNNGAVAWSN KSDFACTSAFKDSVIPADTFFPSPESSC
10	Dominio constante de TCR-beta de macaco cangrejero (derivado de AEA41868)	117	EDLKKVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL EDSRYSLSRLRVSATFWHNPРНHFRСQVQFYGL SEDDEWTEDRDKPITQKISAEAWGRADC
15	Alb8	118	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLVTVSS
20	Alb8-A	119	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLVTVSSA
25	Alb23	120	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGM SWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS SRSSQGTLVTVSS
30	Alb23-A	121	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGM SWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGR

5			FTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL SRSSQGTLVTVSSA
	Alb83	122	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSR SSQGTLVTVSS
	Alb83-A	123	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSR SSQGTLVTVSSA
10			
15	Alb132	124	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGS LSRSSQGTLVTVSS
	Alb132-A	125	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGS LSRSSQGTLVTVSSA
20	Alb73	126	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLVKVSS
25	Alb73-A	127	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLVKVSSA
	Alb82	128	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF

5			TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGTLVTVSS
	Alb82-A	129	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGTLVTVSSA
10	Alb199	130	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGTLVKVSS
	Alb199-A	131	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGTLVKVSSA
15	Alb23002	132	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTLVTVSS
20	Alb223	133	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTLVTVSSA
	Alb216	134	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTLVKVSS
25	Alb216-A	135	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKG

5			RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSL SRSSQGTLVKVSSA
	Enlazador 3A	136	AAA
	Enlazador 7GS	137	SGGSGGS
	Enlazador 8GS	138	GGGGSGGS
10	Enlazador 10GS	139	GGGGSGGGGS
	Enlazador 15GS	140	GGGGSGGGGSGGGGS
	Enlazador 18GS	141	GGGGSGGGGSGGGGSGGS
	Enlazador 20GS	142	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
15	Enlazador 25GS	143	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
	Enlazador 30GS	144	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
	Enlazador 35GS	145	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGS
	Enlazador 40GS	146	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGS
20	Bisagra G1	147	EPKSCDKTHTCPPCP
	Bisagra 9GS-G1	148	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
	Región bisagra larga	149	EPKTPKPQAAA

	superior de llama		
5	Bisagra G3	150	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEP KSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	151	HISIGDQTDYADSAKG
10	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	152	HISIGDQTDYANSAKG
	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	153	HISIGDQTDYAPSAKG
15	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	154	HISIGDQTDYAKSAKG
	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	155	HISIGDQTDYARSAKG
20	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	156	HISIGDQTDYAISAKG
	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	157	HISIGDQTDYATSAKG
25	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	158	HISIGDQTDYAHSAKG

5	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	159	HISIGDQTDYAVSAKG
	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	160	HISIGDQTDYAESAAG
	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	161	HISIGDQTDYAASAAG
10	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	162	HISIGDQTDYAYSAG
15	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	163	HISIGDQTDYALSAAG
	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	164	HISIGDQTDYAQSAAG
20	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	165	HISIGDQTDYAFSAAG
25	CDR2 de ISVD TCE (Kabat)	166	HISIGDQTDYASSAG
	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	167	LSRIWPYDY

5	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	168	LSRIYPYDY
	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	169	LSRIAPYDY
	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	170	LSRIPPYDY
10	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	171	LSRIDPYDY
15	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	172	LSRIQPYDY
	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	173	LSRIEPYDY
20	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	174	LSRIRPYDY
25	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	175	LSRIFPYDY
	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	176	LSRISPYDY

5	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	177	LSRIGPYDY
	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	178	LSRITPYDY
	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	179	LSRIHPYDY
10	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	180	LSRIVPYDY
15	CDR3 de ISVD TCE (Kabat)	181	LSRIKPYDY
20	Fragmento peptídico T7	182	VAHISIGDQTDYADSAK
	Fragmento peptídico T11	183	NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCR
	Fragmento peptídico T13	184	IWPYDYWGQGTLVTVSSAAHHHHHHH
25	Fragmento peptídico T14	185	LSCAASGFTFSSFAMTWVR
	Fragmento peptídico T16	186	GLEWVATITNK
	Fragmento peptídico T27	187	SVFSSSTMEWYR
30	Fragmento peptídico T36	188	NTVYLQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLVTV SSGGGGSGGGSEVQLVESGGGWQPGGS

Fragmento peptídico T40	189	GPEWVSSISGSGSDTLYLADSVK
----------------------------	-----	-------------------------

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

5

10

15

20

25

30