

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 937**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 47/68	(2007.01)
A61P 1/04	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01)
A61P 13/12	(2006.01)
A61P 15/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2015 E 22183523 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 4141032**

54 Título: **Politerapia de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y antagonistas de la unión al eje de PD-1**

30 Prioridad:

20.11.2014 EP 14194136
22.01.2015 EP 15152141
11.05.2015 EP 15167173

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2024

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KLEIN, CHRISTIAN;
KARANIKAS, VAIOS;
UMAÑA, PABLO;
ZIPPELIUS, ALFRED;
THOMMEN, DANIELA y
SCHREINER, JENS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 984 937 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Politerapia de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y antagonistas de la unión al eje de PD-1

5

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII.

10 Dicha copia en ASCII, creada el 11 de noviembre de 2015, se denomina 32401_SL.txt y tiene un tamaño de 527.137 bytes.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a politerapias que emplean una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y un antagonista de la unión al eje de PD-1 y, opcionalmente, un antagonista de TIM3, y al uso de estas politerapias para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

20

Los anticuerpos monoclonales son agentes terapéuticos poderosos en el tratamiento del cáncer que se dirigen selectivamente a antígenos que se expresan diferencialmente en las células cancerosas.

25

Los anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse con un resto de unión a antígeno a un antígeno de superficie en células diana, y con el segundo resto de unión a antígeno a un componente invariante activador del complejo receptor de linfocitos T (TCR), se han vuelto de interés en los últimos años. La unión simultánea de un anticuerpo de este tipo a ambas de sus dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y el linfocito T, provocando la activación de cualquier linfocito T citotóxico y la posterior lisis de la célula diana. Por tanto, la respuesta inmunitaria se redirige a las células diana y es independiente de la presentación antigénica de péptidos por la célula diana o la especificidad del linfocito T como sería pertinente para la activación restringida para MHC normal de CTL. En este contexto, es crucial que los CTL solo se activen cuando una célula diana les presente el anticuerpo biespecífico, es decir, se imite la sinapsis inmunológica. Son en particular deseables anticuerpos biespecíficos que no requieren precondicionamiento o coestimulación de linfocitos para provocar lisis eficaz de células diana. No se comprende bien cómo afectan las TCB al propio linfocito T más allá de la activación de determinada función efectora.

35

La activación de los linfocitos T en reposo, o linfocitos T, por las células presentadoras de antígeno (APC) parece requerir dos entradas de señal. Lafferty *et al.*, Aust. J. Exp. Biol. Med. ScL 53: 27-42 (1975). La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transduce a través del receptor de linfocitos T (TCR) después del reconocimiento del péptido del xenoantígeno presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La segunda señal o señal coestimuladora se envía a los linfocitos T a través de moléculas coestimuladoras expresadas en las células presentadoras de antígeno (APC), y promueve la expansión clonal, la secreción de citocinas y la función efectora de linfocitos T. Lenschow *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996). En ausencia de coestimulación, los linfocitos T se pueden volver resistentes a la estimulación antigénica, no generar una respuesta inmunitaria eficaz y pueden dar como resultado el agotamiento o la tolerancia a xenoantígenos.

45

Los linfocitos T pueden recibir tanto señales coestimuladoras secundarias positivas como negativas. El equilibrio entre las señales positivas y las negativas es importante para provocar respuestas inmunitarias eficaces, mientras se mantiene la tolerancia inmunológica y se previene la autoinmunidad. Las señales secundarias negativas parecen necesarias para la inducción de la tolerancia de linfocitos T, mientras que las señales positivas promueven la activación de linfocitos T.

50

Recientemente se ha descubierto que la disfunción de los linfocitos T o anergia se produce simultáneamente con una expresión inducida y mantenida del receptor inhibitorio, el polipéptido de muerte programada 1 (PD-1). Uno de sus ligandos, PD-L1, se sobreexpresa en muchos cánceres y, a menudo, se asocia con un mal pronóstico (Okazaki T *et al.*, Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson RH *et al.*, Cancer Res 2006, 66(7):3381). De forma interesante, la mayoría de los linfocitos T infiltrantes de tumor expresan predominantemente PD-1, en contraste con los linfocitos T en tejidos normales y los linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que la regulación por incremento de PD-1 en linfocitos T reactivos al tumor puede contribuir a respuestas inmunitarias antitumorales deficientes (Blood 2009 114(8): 1537).

60

La molécula 3 que contiene el dominio de mucina e inmunoglobulina de linfocitos T (TIM3) es importante en la regulación inmunitaria. Esta proteína de la superficie celular se expresa, preferentemente, por linfocitos T auxiliares de tipo 1 y se ha implicado en la regulación de la activación de macrófagos, afecciones inflamatorias y cáncer (Majeti R *et al.*, PNAS, 106 (2009) 3396-3401 y documento WO2009/091547). La unión de TIM3 a uno de sus ligandos (por ejemplo, galectina-9) puede suprimir la respuesta de Th1 al inducir la muerte celular programada, sustentando de este

65

modo la tolerancia periférica. El tratamiento con ARNip de TIM3 o con un anticuerpo antagonista anti-TIM3 incrementa la secreción de interferón alfa de los linfocitos T CD4 positivos, lo que sustenta el papel inhibitor de TIM3 en linfocitos T humanos. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-TIM3 incluyen los divulgados en los documentos WO2013/06490 y US2012/189617 (Ngiow *et al.*, Cancer Res 7:6567 (2011)).

FOLR1 se expresa en células tumorales de diversos orígenes, por ejemplo, cáncer de ovario y de pulmón. Se han descrito varios enfoques para actuar sobre FOLR1 con anticuerpos terapéuticos, tales como farletuzumab, conjugados anticuerpo-fármaco o tratamiento adoptivo con linfocitos T para la formación de imágenes de tumores (Kandalaf *et al.*, J Transl Med. 3 de ago. de 2012; 10:157. doi: 10.1186/1479-5876-10-157; van Dam *et al.*, Nat Med. 18 de sep. de 2011; 17(10):1315-9. doi: 10.1038/nm.2472; Clifton *et al.*, Hum Vaccin. Feb. de 2011; 7(2): 183-90. Publicación electrónica 1 de febrero de 2011; Kelemen *et al.*, Int J Cancer. 15 de jul. de 2006; 119(2):243-50; Vaitilingam *et al.*, J Nucl Med. jul. de 2012; 53(7); Teng *et al.*, ago. de 2012; 9(8):901-8. doi: 10.1517/17425247.2012.694863. Publicación electrónica 5 de junio de 2012. Se han realizado algunas tentativas de actuar sobre tumores que expresan el receptor de folato con construcciones dirigidas al receptor de folato y CD3 (Kranz *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 26 de sep. de 1995; 92(20): 9057-9061; Roy *et al.*, Adv Drug Deliv Rev. 29 de abr. de 2004; 56(8): 1219-31; Huiting Cui *et al.*, Biol Chem. 17 de ago. de 2012; 287(34): 28206-28214; Lamers *et al.*, Int. J. Cancer. 60(4):450 (1995); Thompson *et al.*, MAbs. Jul-ago. de 2009;1(4):348-56. Publicación electrónica 19 de julio de 2009; Mezzanzanca *et al.*, Int. J. Cancer, 41, 609-615 (1988).

Sigue existiendo la necesidad de un tratamiento óptimo para tratar, estabilizar, prevenir y/o retrasar el desarrollo de diversos cánceres.

Sumario

En términos generales, la presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que combinan un sitio de unión a antígeno dirigido al receptor de folato 1 (FolR1) con un segundo sitio de unión a antígeno que se dirige a CD3 y su uso en combinación con un antagonista de la unión al eje de PD-1, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer. En un modo de realización, la combinación comprende además un antagonista de TIM3. Los procedimientos y combinaciones de la presente invención permiten una inmunoterapia potenciada. La ventaja con respecto al tratamiento convencional es la especificidad de inducir la activación de linfocitos T solo en el sitio donde se expresa FolR1, así como la reducción y/o reversión de la baja actividad mediada por linfocitos T, también denominada agotamiento de linfocitos T debido a la combinación con un antagonista de la unión al eje de PD-1 y, opcionalmente, un antagonista de TIM3.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de un cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y un antagonista de la unión al eje de PD-1. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 y un segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1). En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34. En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un tercer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FolR1. En un modo de realización, el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR1 comprenden secuencias idénticas de región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y de CDR de la cadena ligera. En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno. En un modo de realización, al menos uno del primer, segundo y tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 y una

cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 50 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FolR1 comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 1 de región determinante de la complementariedad (CDR-H1) de SEQ ID NO: 8;

(b) una secuencia de aminoácidos de CDR-H2 de SEQ ID NO: 9;

(c) una secuencia de aminoácidos de CDR-H3 de SEQ ID NO: 50;

(d) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 1 de región determinante de la complementariedad (CDR-L1) de SEQ ID NO: 52;

(e) una secuencia de aminoácidos de CDR-L2 de SEQ ID NO: 53; y

(f) una secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de SEQ ID NO: 54.

En un modo de realización de este tipo, el resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FolR1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une a un FolR1 humano, un FolR1 de macaco cangrejero y un FolR1 murino.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la proliferación de un linfocito T humano CD3 positivo *in vitro*.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la destrucción mediada por leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica humana de una célula tumoral humana que expresa FolR1 *in vitro*.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la destrucción mediada por linfocitos T de una célula tumoral humana que expresa FolR1 *in vitro*. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la destrucción mediada por linfocitos T de la célula tumoral humana que expresa FolR1 *in vitro* con una CE50 de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 39573 pM después de 24 horas. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la regulación por incremento de la expresión en la superficie celular de al menos uno de CD25 y CD69 en el linfocito T, medida por citometría de flujo. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 5,36 pM a aproximadamente 4 nM. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une a FolR1 humano y de macaco cangrejero con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une a FolR1 murino con una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une a FolR1 que se expresa en una célula tumoral humana. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une a un epítipo conformacional de FolR1 humano. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no se une al receptor de folato 2 (FolR2) humano ni al receptor de folato 3 (FolR3) humano. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno se une a un polipéptido de FolR1 que comprende los aminoácidos 25 a 234 de FolR1 humano (SEQ ID NO: 227). En un modo de realización, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 227, 230 y 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 228 y 229. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende a) un primer sitio de unión a antígeno que compite por la unión a FolR1 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio de la cadena pesada variable (VH) de SEQ ID NO: 49 y una variable dominio de la cadena ligera de SEQ ID NO: 51; y b) un segundo sitio de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio de la cadena pesada variable (VH) de SEQ ID NO: 36 y un dominio de la cadena ligera variable de SEQ ID NO: 31, en el que la competición por la unión se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una

- primera, una segunda, una tercera, una cuarta y una quinta cadena polipeptídica que forman un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, en la que el primer resto de unión a antígeno se puede unir a CD3 y el segundo y tercer resto de unión a antígeno se pueden unir cada uno al receptor de folato 1 (FolR1), en la que a) la primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden, en la dirección desde el extremo amino (N) hacia el extremo carboxilo (C), VLD1 y CLD1; b) la tercera cadena polipeptídica comprende, en la dirección desde el extremo N hacia el extremo C, VLD2 y CH1D2; c) la cuarta cadena polipeptídica comprende, en la dirección desde el extremo N hacia el extremo C, VHD1, CH1D1, CH2D1 y CH3D1; d) la quinta cadena polipeptídica comprende VHD1, CH1D1, VHD2, CLD2, CH2D2 y CH3D2; en la que
- 5 VLD1 es un primer dominio variable de la cadena ligera
- VLD2 es un segundo dominio variable de la cadena ligera
- 15 CLD1 es un primer dominio constante de la cadena ligera
- CLD2 es un segundo dominio constante de la cadena ligera
- VHD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada
- 20 VHD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada
- CH1D1 es un primer dominio constante 1 de la cadena pesada
- CH1D2 es un segundo dominio constante 1 de la cadena pesada
- 25 CH2D1 es un primer dominio constante 2 de la cadena pesada
- CH2D2 es un segundo dominio constante 2 de la cadena pesada
- 30 CH3D1 es un primer dominio constante 3 de la cadena pesada
- CH3D2 es un segundo dominio 3 constante de la cadena pesada.
- En un modo de realización de este tipo,
- 35 a. la tercera cadena polipeptídica y VHD2 y CLD2 de la quinta cadena polipeptídica forman el primer resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3;
- b. la primera cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la cuarta cadena polipeptídica forman el segundo resto de unión que se puede unir a FolR1; y
- 40 c. la segunda cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la quinta cadena polipeptídica forman el tercer resto de unión que se puede unir a FolR1.
- 45 En un modo de realización de este tipo, la primera y segunda cadena polipeptídica comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 399. En un modo de realización de este tipo, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En un modo de realización de este tipo, la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 394. En un modo de realización de este tipo, la quinta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 397. En un modo de realización,
- 50 a. la primera y segunda cadena polipeptídica comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 399;
- b. la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86;
- 55 c. la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 394; y
- d. la quinta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 397.
- En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico es bivalente tanto para FolR1 como para CD3.
- 60 En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende uno o más fragmentos Fab que comprenden un sitio de unión a antígeno específico para CD3, en el que se intercambian las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera.
- 65 En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc, al menos un fragmento Fab que comprende el sitio de unión a antígeno específico para FolR1 y al menos un fragmento Fab que comprende el

sitio de unión a antígeno específico para CD3, en el que se intercambian las regiones variables o bien las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de al menos un fragmento Fab.

En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende:

a) un dominio Fc,

b) un primer y segundo fragmento Fab que comprende cada uno un sitio de unión a antígeno específico para FolR1,

c) un tercer fragmento Fab que comprende un sitio de unión a antígeno específico para CD3, en el que el tercer fragmento Fab se conecta en el extremo C de la cadena pesada variable (VH) a la segunda subunidad del dominio Fc y en el que el tercer fragmento Fab se conecta en el extremo N de la cadena pesada variable al extremo C del segundo fragmento Fab.

En un modo de realización, al menos uno de dichos fragmentos Fab se conecta al dominio Fc por medio de un conector peptídico.

En un modo de realización, dicho anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc, que comprende la sustitución de uno o más aminoácidos que reduce la unión a los receptores de Fc y/o la función efectora. En un modo de realización, dicha una o más sustituciones aminoacídicas están en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329. En un modo de realización, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones aminoacídicas que suprimen la unión a un receptor de Fc activador o inhibidor y/o la función efectora, en la que dichas sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329G.

En algunos modos de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de la unión a PD-1, un antagonista de la unión a PDL1 o un antagonista de la unión a PDL2.

En algunos modos de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es un antagonista de la unión a PD-1. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión ligandos. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PDL1. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PDL2. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PDL1 como a PDL2. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es nivolumab, pembrolizumab, CT-011 o AMP-224.

En algunos modos de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es un antagonista de la unión a PDL1. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PDL1 inhibe la unión de PDL1 a PD-1. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PDL1 inhibe la unión de PDL1 a B7-1. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PDL1 inhibe la unión de PDL1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PDL1 es un anticuerpo anti-PDL1. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PDL1 se selecciona del grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736.

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO: 289, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO: 290 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO: 291; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO: 292, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO: 293 y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO: 294. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 280 o SEQ ID NO: 281 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 383. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 278 y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 279.

En algunos modos de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es un antagonista de la unión a PDL2. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PDL2 es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL2 es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo anti-PDL2 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PDL2 es una inmunoadhesina.

En un modo de realización, el procedimiento de cualquiera de los modos de realización anteriores comprende además administrar al individuo un antagonista de la molécula 3 que contiene el dominio de mucina e inmunoglobulina de

ES 2 984 937 T3

linfocitos T (TIM3). En un modo de realización, el antagonista de TIM3 es un anticuerpo anti-TIM3. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 induce la internalización de TIM3 en una célula que expresa TIM3 de al menos un 45 % después de 120 minutos a 37 °C, en el que la internalización se mide mediante análisis de FACS. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 posee una o más de las siguientes propiedades:

5 a) compite por la unión a TIM3 con un anticuerpo anti-Tim3 que comprende el VH de SEQ ID NO: 7 y el VL de SEQ ID NO: 8

10 b) se une a una TIM3 humana y de macaco cangrejero

c) muestra como inmunoconjugado una actividad citotóxica en células que expresan TIM3

d) induce la liberación de interferón-gamma.

15 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 posee una o más de las siguientes propiedades:

a. compite por la unión a TIM3 con un anticuerpo anti-Tim3 que comprende el VH de SEQ ID NO: 7 y el VL de SEQ ID NO: 8

20 b. se une a una TIM3 humana y de macaco cangrejero

c. muestra como inmunoconjugado una actividad citotóxica en células que expresan TIM3

d. induce la liberación de interferón-gamma.

25 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 es un fragmento de anticuerpo que se une a TIM3. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 es un fragmento Fab. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende:

30 A) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 306; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 307; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309; o

40 B) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 306; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309; o

45 C) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 306; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 315; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309; o

50 D) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 316, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 317 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 318; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 319; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 320 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 321; o

55 E) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 324, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 325 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 326; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 327; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 328 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 329; o

60 F) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 332, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 333 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 334; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 335; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 336 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 337; o

- 5 G) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 340, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 342; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 343; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 344 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 345; o
- 10 H) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 348, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 349 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 350; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 352 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 353; o
- 15 I) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 356, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 358; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 359; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 360 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 361; o
- 20 J) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 364, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 365 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 366; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 367; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 368 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 369.
- 25 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 es un anticuerpo IgG1 de longitud completa con mutaciones S228P, L235E y P329G de acuerdo con numeración del índice EU de Kabat. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 es uno cualquiera de los anticuerpos descritos en los documentos WO 2011/155607, WO 2013/006490, WO 03/063792, WO 2009/097394 y WO 2011/159877. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 es F38-2E2.
- 30 En un modo de realización, el cáncer contiene un gen KRAS natural. En un modo de realización, el cáncer contiene una mutación activadora de KRAS.
- 35 En un modo de realización, el tratamiento da como resultado una respuesta mantenida en el individuo después de la interrupción del tratamiento. En un modo de realización, al menos uno de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra de forma continua. En un modo de realización, al menos uno de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra de forma intermitente. En un modo de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra antes que la TCB anti-FoIR1. En un modo de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra de forma simultánea a la TCB anti-FoIR1. En un modo de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra después de la TCB anti-FoIR1. En un modo de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio. En un modo de realización, al menos uno de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra por vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía tópica, vía oral, vía transdérmica, vía intraperitoneal, vía intraorbitaria, por implantación, por inhalación, vía intratecal, vía intraventricular o vía intranasal.
- 40 En un modo de realización, los linfocitos T en el individuo tienen una activación, proliferación y/o función efectora potenciadas con respecto a antes de la administración de la combinación. En un modo de realización, los linfocitos T en el individuo tienen una activación, proliferación y/o función efectora potenciadas con respecto a la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T sola. En un modo de realización, la función efectora de los linfocitos T es la secreción de al menos uno de IL-2, IFN- γ y TNF- α . En un modo de realización, el individuo comprende menos de aproximadamente un 15 % de linfocitos T infiltrantes de tumores con expresión de PD-1^{alta}.
- 50 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para potenciar la función inmunitaria en un individuo que tiene un cáncer que expresa FoIR1 que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una combinación de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FoIR1) y para CD3, y un antagonista de la unión al eje de PD-1. En un modo de realización, los linfocitos T en el individuo tienen una activación, proliferación y/o función efectora potenciadas con respecto a antes de la administración de la combinación. En un modo de realización, los linfocitos T en el individuo tienen una activación, proliferación y/o función efectora potenciadas con respecto a la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T sola. En un modo de realización, la función efectora de los linfocitos T es la secreción de al menos uno de IL-2, IFN- γ y TNF- α .
- 60 En un modo de realización, el individuo comprende menos de aproximadamente un 15 % de linfocitos T infiltrantes de tumores con expresión de PD-1^{alta}.
- 65

5 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para seleccionar un paciente para el tratamiento con una combinación de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FolR1) y para CD3 y un antagonista de la unión al eje de PD-1, que comprende medir la nivel de expresión de PD-1, en el que se selecciona un paciente que tiene menos de aproximadamente un 15 % de linfocitos T con expresión de PD-1^{alta} para el tratamiento con la combinación.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FolR1) y para CD3, y un prospecto del envase que comprende instrucciones para usar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con un antagonista de la unión al eje de PD-1 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En un modo de realización, el kit comprende además instrucciones para usar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con un antagonista de TIM3.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FolR1) y para CD3 y un antagonista de la unión al eje de PD-1, y un prospecto del envase que comprende instrucciones para usar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y el antagonista de la unión al eje de PD-1 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En un modo de realización, el kit comprende además un antagonista de TIM3. En un modo de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PDL1. En un modo de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es una inmunoadhesina anti-PD-1.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FolR1) y para CD3, un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización, la composición farmacéutica comprende además un antagonista de TIM3.

25 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una combinación de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FolR1) y para CD3 y un antagonista de la unión al eje de PD-1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento del cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio.

30 En determinados modos de realización de todos los aspectos de la presente invención, de forma ventajosa, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y/o dicho antagonista de la unión al eje de PD-1 son humanos o humanizados.

35 En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc, al menos un fragmento Fab que comprende el sitio de unión a antígeno específico para FolR1 y al menos un fragmento Fab que comprende el sitio de unión a antígeno específico para CD3.

40 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de un cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y un antagonista de TIM3. En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un dominio Fc, dos fragmentos Fab que comprenden cada uno un sitio de unión a antígeno específico para FolR1 y un fragmento Fab que comprende un sitio de unión a antígeno específico para CD3.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una combinación de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica que se une a FolR1 y a CD3 y un antagonista de la unión al eje de PD-1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una combinación de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica que se une a FolR1 y a CD3, un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un antagonista de TIM3 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

55 Los modos de realización de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo y no de limitación con referencia a las figuras adjuntas. Sin embargo, a los expertos en la técnica les resultarán evidentes diversos aspectos y modos de realización adicionales de la presente invención a la vista de la presente divulgación.

60 "Y/o", donde se usa en el presente documento, se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de los dos rasgos característicos o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se estableciera individualmente en el presente documento.

65 A menos que el contexto lo indique de otro modo, las descripciones y definiciones de los rasgos característicos

expuestos anteriormente no se limitan a ningún aspecto o modo de realización particular de la invención en particular y se aplican por igual a todos los aspectos y modos de realización que se describen.

Breve descripción de las figuras

5 Las **figuras 1A-I** ilustran configuraciones ejemplares de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T (TCB) de la invención. Todas las construcciones, excepto el formato kappa-lambda en (fig. 1I) tienen mutaciones P329G LALA y comprenden fragmentos Fc de botón en ojal con modificaciones de botón en ojal. (Fig. 1A) Ilustración de la "TCB anti-FoIR1 2+1, invertida (cadena ligera común)". La molécula de unión a FoIR1 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de botón. Estas construcciones no se cruzan y tienen tres veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1B) Ilustración de la "TCB anti-FoIR1 1+1, cabeza a cola (cadena ligera común)". Estas construcciones no se cruzan y tienen dos veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1C) Ilustración de la "TCB anti-FoIR1 1+1, clásica (cadena ligera común)". Estas construcciones no se cruzan y tienen dos veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1D) Ilustración de la "TCB anti-FoIR1 2+1, clásica (cadena ligera común)". La molécula de unión a CD3 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de botón. Estas construcciones no se cruzan y tienen tres veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1E) Ilustración de la "TCB anti-FoIR1 2+1 crossfab, clásica". Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en lugar de la cadena CH1-VH convencional. La molécula de unión a CD3 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de botón. (Fig. 1F) Ilustración de la "TCB anti-FoIR1 2+1 crossfab, invertida". Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en lugar de la cadena CH1-VH convencional. La molécula de unión a FoIR1 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de botón. (Fig. 1G) Ilustración de la "TCB anti-FoIR1 1+1 crossfab, cabeza a cola". Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en lugar de la cadena CH1-VH convencional. (Fig. 1H) Ilustración de la "TCB anti-FoIR1 1+1 crossfab, clásica". Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en lugar de la cadena CH1-VH convencional. La figura 1I ilustra el formato de anticuerpo CD3/FoIR1 kappa-lambda. Estas construcciones comprenden una cadena ligera común cruzada VLCH1 y una cadena VHCL cruzada específica para CD3 y una cadena VHCL cruzada específica para FoIR1.

10 Las **figuras 2A-C** representan gráficos que resumen la unión de moléculas de unión IgG anti-FoIR1 en células HeLa. La unión de las moléculas de unión a FoIR1 generadas recientemente a FoIR1 expresado en células HeLa se determinó por citometría de flujo. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo contra anticuerpo humano secundario marcado con fluorescencia.

15 Las **figuras 3A-B** representan gráficos que resumen la especificidad de moléculas de unión a FoIR1 por FoIR1. La unión de las IgG anti-FoIR1 a las células HEK transfectadas de forma transitoria con FoIR1 o FoIR2 se analizó por citometría de flujo para identificar clones que se unen específicamente a FoIR1 y no a FoIR2. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo contra anticuerpo humano secundario marcado con fluorescencia.

20 Las **figuras 4A-B** representan gráficos que resumen la reactividad cruzada de moléculas de unión a FoIR1 contra cyFoIR1. La reactividad cruzada de los anticuerpos anti-FoIR1 contra FoIR1 de macaco cangrejero se examinó en células HEK transfectadas de forma transitoria con cyFoIR1 por citometría de flujo. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo contra anticuerpo humano secundario marcado con fluorescencia.

25 La **figura 5** representa un gráfico que ilustra la internalización de las TCB anti-FoIR1 después de la unión. La internalización de las cuatro TCB anti-FoIR1 después de la unión a FoIR1 se sometió a prueba en células HeLa. Las TCB anti-FoIR1 que quedaban en la superficie se detectaron con un anticuerpo contra anticuerpo humano secundario marcado con fluorescencia después de los tiempos de incubación indicados a 37 °C. Se calculó el porcentaje de internalización.

30 Las **figuras 6A-E** representan gráficos que resumen la unión de IgG anti-FoIR1 a células con diferentes niveles de expresión de FoIR1. La unión de las IgG 9D11, 16D5 y Mov19 a células tumorales con diferentes niveles de expresión de FoIR1 se analizó por citometría de flujo. La IgG DP47 se incluyó como control de isotipo y MKN-45 se incluyó como línea celular negativa para FoIR1. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo contra anticuerpo humano secundario marcado con fluorescencia.

35 Las **figuras 7A-L** representan gráficos que resumen la destrucción mediada por linfocitos T de células HT-29 y SKOV3. Se usaron TCB anti-FoIR1 para someter a prueba la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales HT-29 y SKOV3 y la regulación por incremento del marcador de activación en linfocitos T tras la destrucción. (Figs. 7A-D) La destrucción mediada por linfocitos T de células HT-29 y SKOV3 en presencia de TCB 9D11 anti-FoIR1 y TCB 16D5 anti-FoIR1 se midió por liberación de LDH después de 24 h y 48 h. La TCB DP47 se incluyó como control negativo. Después de 48 h de incubación, la regulación por incremento de los marcadores de activación CD25 y CD69 en linfocitos T CD8 y linfocitos T CD4 tras la destrucción de células tumorales SKOV3 (fig. 7E-H) o HT-29 (fig. 7I-L) se evaluó por citometría de flujo.

La **figura 8** representa un gráfico que muestra la ausencia de unión de anticuerpos anti-FoIR1 a eritrocitos. Los eritrocitos se seleccionaron como población con expresión de CD235a y la unión de IgG 9D11, IgG 16D5, IgG Mov19 e IgG DP47 a esta población se determinó por citometría de flujo. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo contra anticuerpo humano secundario marcado con fluorescencia.

Las **figuras 9A-D** representan gráficos que resumen la regulación por incremento del marcador de activación en sangre completa. La regulación por incremento de los marcadores de activación CD25 y CD69 de linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8 24 h después de la adición de TCB 9D11 anti-FoIR1, TCB 16D5 anti-FoIR1, TCB Mov19 anti-FoIR1 y TCB DP47 se analizó por citometría de flujo.

Las **figuras 10A-C** representan la destrucción por linfocitos T inducida por TCB 36F2, TCB 16D5, TCB 16D5 clásicas, TCB 16D5 1+1 y TCB 16D5 HT de células tumorales humanas HeLa (expresión alta de FoIR1) (fig. 24A), Skov-3 (expresión media de FoIR1) (fig. 24B) y HT-29 (expresión baja de FoIR1) (fig. 24C) (E:T = 10:1, PBMC efectores humanos, tiempo de incubación 24 h). La TCB DP47 se incluyó como control sin propiedades de unión.

Las **figuras 11A-B** muestran la expresión de receptores inhibidores en linfocitos T infiltrantes de tumores. Los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ en muestras tumorales se caracterizaron mediante citometría de flujo para determinar su expresión de receptores inhibidores.

Las **figuras 12A-O** muestran la activación de linfocitos T CD8⁺ en hidrolizados tumorales y derrames neoplásicos tras la exposición a TCB anti-FoIR1. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1 o de TCB DP-47 como control. La expresión de marcadores de activación o marcadores de la función de los linfocitos T en linfocitos T CD8⁺ se determinó mediante citometría de flujo (fig. 12A-M). Las figuras 12J-K muestran gráficos de FACS representativos que muestran la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 en un paciente con alta respuesta (BS-269) o baja respuesta (BS-212). La figura 12L representa gráficos de FACS que muestran la expresión del marcador de activación inducida por TCB anti-FoIR1 en linfocitos T de un paciente representativo. Los gráficos de la fig. 12M representan el incremento en la expresión del marcador después del tratamiento con TCB anti-FoIR1 con la media y las desviaciones estándar. Como comparación, se cultivaron PBMC de donantes sanos conjuntamente con la línea de células tumorales Skov3 y se estimularon con TCB anti-FoIR1. La figura 12N representa IFN- γ , IL-2, TNF y perforina en los sobrenadantes de cultivo celular como se determinan por matriz citométrica de microesferas o ELISA y se normalizaron a la cantidad de 1×10^5 linfocitos T CD3⁺ (IFN- γ , TNF, IL-2) o linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ (perforina) en el cultivo. La figura 12O muestra que la destrucción de células tumorales inducida por TCB anti-FoIR1 varía enormemente en hidrolizados tumorales y los derrames neoplásicos. Se cultivaron hidrolizados tumorales positivos y negativos para FoIR1, derrames neoplásicos o PBMC de donantes sanos conjuntamente con células Skov3 FoIR1⁺ marcadas fluorescentemente añadidas exógenamente en una proporción E:T de 1:1 durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1. La destrucción específica inducida por TCB anti-FoIR1 de las células Skov3 se determinó por citometría de flujo midiendo la caspasa 3 activada y el marcador vivo/muerto LIVE/DEAD[®]-near-IR. La destrucción mediada por TCB anti-FoIR1 se calculó como sigue: % de destrucción específica = $100 - [(\% \text{ de células Skov3 vivas en la muestra tratada con TCB anti-FoIR1} / \% \text{ de células Skov3 vivas en la muestra sin tratar}) \times 100]$. Los gráficos de FACS muestran la destrucción inducida por TCB anti-FoIR1 en un paciente representativo. Los valores de p se calcularon usando la prueba de Mann-Whitney para datos independientes.

Las **figuras 13A-C** muestran que la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 no muestra correlación con la proporción E:T (fig. 13A) ni con la cantidad de células tumorales FoIR1⁺ (fig. 13B). Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1. La expresión de CD25 inducida por TCB anti-FoIR1 se correlacionó con la proporción E:T o la cantidad de células diana. MFI: media de la intensidad de fluorescencia.

Las **figuras 14A-L** muestran que la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 está inversamente correlaciona con la expresión de PD-1 y Tim-3. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1. La expresión de marcadores de activación o marcadores de la función de los linfocitos T en linfocitos T CD8⁺ se determinó mediante citometría de flujo. La expresión inducida por TCB anti-FoIR1 de CD25 (fig. 4A-C), CD137 (fig. 14D-F), ICOS (fig. 14G-I) y granzima B (fig. 14J-L) se correlacionó con el valor de referencia de expresión simple o coexpresión de los receptores inhibidores PD-1 y Tim-3.

Las **figuras 15A-C** muestran que la secreción de IL-2 inducida por TCB anti-FoIR1 está inversamente correlaciona con la coexpresión de PD-1 y Tim-3. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1. La IL-2 en los sobrenadantes del cultivo celular se determinó mediante ELISA y se normalizó a la cantidad de linfocitos T. La secreción de IL-2 inducida por TCB anti-FoIR1 se correlacionó con el valor de referencia de expresión simple o coexpresión de los receptores inhibidores PD-1 y Tim-3.

Las **figuras 16A-F** muestran que la destrucción de células tumorales inducida por TCB anti-FoIR1 está inversamente correlacionada con la coexpresión de PD-1 y Tim-3. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos conjuntamente con células Skov3 marcadas con fluorescencia añadidas exógenamente hasta una proporción entre linfocitos T y células diana de 1:1 durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1. La destrucción específica

inducida por TCB anti-FoIR1 de las células Skov3 se determinó por citometría de flujo midiendo la caspasa 3 activada y el marcador vivo/muerto Live/Dead-near-IR. La destrucción específica se correlacionó con el valor de referencia de expresión simple o coexpresión de los receptores inhibidores PD-1, Tim-3 y CTLA-4.

5 Las **figuras 17A-H** muestran la activación de linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores tras la exposición a catumaxomab. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de catumaxomab. (Fig. 17A-D) La expresión de marcadores de activación o marcadores de la función de los linfocitos T en linfocitos T CD8⁺ se determinó mediante citometría de flujo. (Fig. 17E-H) Gráficos que muestran el valor de referencia de expresión de receptores inhibidores.

10 Las **figuras 18A-R** muestran que la activación de linfocitos T inducida por catumaxomab está inversamente correlacionada con la coexpresión de receptores inhibidores. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de catumaxomab. La activación y las funciones efectoras de los linfocitos T se correlacionaron con la expresión de PD-1 (fig. 18A-F), de Tim-3 (fig. 18G-L) o de la combinación de PD-1 y Tim-3 (fig. 18M-R).

15 Las **figuras 19A-H** muestran la expresión de receptores inhibidores en linfocitos T infiltrantes de tumores en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico. Los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ en muestras tumorales se caracterizaron mediante citometría de flujo para determinar su expresión de receptores inhibidores (fig. 19A-F). La figura 19G muestra la estrategia de selección de poblaciones celulares para un donante representativo. La figura 19H muestra los resultados del análisis y obtención de matriz cromática de los subconjuntos de células indicados en base al porcentaje de expresión, con el uso de un programa de formateado condicional de Excel.

20 Las **figuras 20A-E** muestran la activación y las funciones efectoras de linfocitos T tras la estimulación policlonal por anticuerpos contra CD3/CD28. La expresión de CD25 y granzima B (fig. 20A-B), así como de IL-2, IFN- γ y TNF- α (fig. 20C-E), como marcadores para la activación y la función efectora de linfocitos T, respectivamente, se analizó en linfocitos T de muestras tumorales hidrolizadas después de la estimulación de hidrolizados tumorales completos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 agonistas.

25 Las **figuras 21A-N** muestran la expresión de receptores inhibidores y la disfunción de los linfocitos T. La expresión de CD25 y granzima B (fig. 21A-B), así como de IL-2, IFN- γ y TNF- α (fig. 21C-E), tras la estimulación policlonal por anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 se correlaciona con la expresión acumulada de receptores inhibidores indicada por la puntuación iR. La figura 21F muestra un cálculo ejemplar de puntuaciones iR. Se analizó el porcentaje de expresión de PD-1, Tim-3, CTLA-4, LAG-3 y BTLA en todas las muestras de CPNM y se determinaron la mediana y las amplitudes intercuartílicas. Para el cálculo de la puntuación iR, cada paciente recibió puntos por la expresión de cada uno de los receptores inhibidores determinados en función del cuartil dentro del que coincidió la expresión. Se podía alcanzar un máximo de 15 puntos; la puntuación calculada de cada muestra se normalizó a esta cantidad máxima de puntos. Las figuras 21G-K muestran que la expresión de receptores inhibidores se incrementa con el estadio del tumor. La expresión de receptores inhibidores en linfocitos T infiltrantes de tumores CD8⁺ se correlacionó con el estadio TNM.

30 Las figuras 21L-N muestran un incremento de la expresión acumulada de receptores inhibidores con la progresión del tumor. La expresión acumulada de los receptores inhibidores PD-1, Tim-3, CTLA-4, LAG-3 y BTLA, representada por la puntuación iR, se correlacionó con el estado ganglionar y el estadio TNM.

35 Las **figuras 22A-I** muestran que la expresión de PD-1 y Tim-3 se correlaciona con la disfunción de los linfocitos T. La expresión de CD25 y granzima B (fig. 22A-C), así como de IL-2, IFN- γ y TNF- α (fig. 22D-F), tras la estimulación policlonal por CD3/CD28 se correlaciona con la expresión de PD-1 (fig. 22A-C), Tim-3 (fig. 22D-F) o PD-1/Tim-3 (fig. 22G-I) en linfocitos T infiltrantes de tumores.

40 Las **figuras 23A-E** muestran que el efecto del bloqueo de PD-1 o de PD-1/Tim-3 combinado varía entre los pacientes. Los hidrolizados se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 agonistas con la adición de anticuerpos bloqueantes a PD-1 solo o en combinación con Tim-3. La secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-2 se determinó mediante ELISA y se normalizó a 1×10^6 linfocitos T. Las figuras 23A-C muestran linfocitos T de un paciente en el que la función de los linfocitos T se puede recuperar mediante la adición de anticuerpos bloqueantes (BS-268) y linfocitos T de un paciente que no presente respuesta al bloqueo de PD-1 o PD-1/Tim-3. Se muestra la diferencia en la expresión ([% expresión en pacientes tratados con Ac] - [% expresión en pacientes sin tratar]). La figura 23D muestra los respectivos gráficos de citometría de flujo con subconjuntos con expresión de PD-1^{alta} y PD-1^{int}. La figura 23E muestra un resumen de la secreción de IL-2, TNF- α e IFN- γ por linfocitos T de seis pacientes, determinada por ELISA y normalizada a 1×10^6 linfocitos T CD3⁺.

45 Las **figuras 24A-F** muestran que el efecto del bloqueo de PD-1 o de PD-1/Tim-3 combinado difiere entre los subconjuntos con expresión de PD-1^{alta} y PD-1^{int}. La correlación del incremento en la producción de citocinas por bloqueo de PD-1 o de PD-1/Tim-3 combinado en subconjuntos con expresión de PD-1^{alta} y PD-1^{int} se indica mediante la proporción PD-1^{alta}/PD-1^{int}.

50 Las **figuras 25A-I** muestran la activación de linfocitos T CD4⁺ en hidrolizados tumorales y derrames neoplásicos tras la exposición a TCB anti-FoIR1. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en

presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1 o de TCB DP-47 como control. La expresión de marcadores de activación o marcadores de la función de los linfocitos T en linfocitos T CD8⁺ se determinó mediante citometría de flujo.

5 Las **figuras 26A-C** muestran que la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 es independiente de la expresión de CTLA-4, Lag-3 y BTLA. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1. La expresión de CD25 en linfocitos T CD8⁺ se determinó mediante citometría de flujo. La expresión de CD25 inducida por TCB anti-FoIR1 se correlacionó con el valor de referencia de expresión de CTLA-4, Lag-3 y BTLA.

10 Las **figuras 27A-C** muestran que TCB anti-FoIR1 induce la secreción de citocinas solo en pacientes con un bajo porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con expresión de PD-1^{alta}. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FoIR1. La secreción de IFN- γ , TNF e IL-2 en los sobrenadantes de cultivo celular se determinó y se normalizó a la cantidad de 1×10^5 linfocitos T en el cultivo. La secreción de citocinas inducida por TCB anti-FoIR1 se correlacionó con el valor de referencia de expresión de PD-1^{alta}.

15 Las **figuras 28A-F** muestran que el tratamiento con un anticuerpo bloqueante de PD-1 no induce la secreción de citocinas en hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos de pacientes con cáncer de pulmón y de ovario con un bajo porcentaje de células con expresión de PD-1^{alta}. Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos durante 24 h con TCB anti-FoIR1 en presencia o ausencia de anticuerpo bloqueante de PD-1 (fig. 28A-C) o la combinación de anticuerpos bloqueantes de PD-1 y Tim-3 (fig. 28D-F). La secreción de IFN- γ , TNF e IL-2 en los sobrenadantes de cultivo celular se determinó y se normalizó a la cantidad de 1×10^5 linfocitos T en el cultivo. La secreción de citocinas inducida por los anticuerpos bloqueantes en comparación con el tratamiento con TCB anti-FoIR1 solo se correlacionó con el valor de referencia de expresión de PD-1^{alta}.

25 Las **figuras 29A-B** muestran los resultados de un ensayo de internalización basado en FACS. Los datos muestran que el fragmento Fab (Fab anti-TIM-3) del anticuerpo anti-TIM3 Tim3_0022 (abreviado como Ab anti-TIM3 (022)) se internaliza en células CHO-K1 recombinantes que expresan huTIM3 después de la incubación a 37 °C con una cinética similar a la del anticuerpo en el formato de IgG completa.

30 Las **figuras 30A-B** muestran la unión de anticuerpos anti-TIM3 a células RPMI-8226 (la designación de anticuerpo clon 0016 se refiere al anticuerpo Tim3_0016, clon 0016 se refiere a la variante de anticuerpo Tim3_0016 (anticuerpo Tim3_0018), clon 0022 se refiere al anticuerpo Tim3_00122, etc.). La figura 30B muestra la unión de anticuerpos anti-TIM3 a células Pfeiffer (la designación de anticuerpo clon 0016 se refiere al anticuerpo Tim3_0016, clon 0016 se refiere a la variante de anticuerpo Tim3_0016 (anticuerpo Tim3_0018), clon 0022 se refiere al anticuerpo Tim3_00122, etc.).

35 La **figura 31** muestra el nivel de expresión de TIM-3 en diferentes muestras de células de pacientes con LMA mediante FACS usando mAb anti-TIM-3.

40 La **figura 32** muestra una matriz cromática de la expresión de receptores inhibidores en TIL asociados con CPNM. La coexpresión de receptores inhibidores en linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores positivos para el punto de control inmunitario indicado se muestra como una matriz cromática que muestra el porcentaje de expresión para los receptores adicionales.

45 La **figura 33** muestra un trazado de radar de la expresión de receptores inhibidores en TIL asociados con CPNM. La coexpresión de receptores inhibidores en linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores positivos para el punto de control inmunitario indicado se muestra como un trazado de radar que indica la expresión media y la desviación estándar de los otros cuatro receptores.

50 Las **figuras 34A-D** muestran el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con expresión de PD-1^{alta} o PD-1^{int} que expresan puntos de control inmunitario adicionales. Cada punto representa una muestra de paciente. Los valores de p se calcularon usando la prueba de Wilcoxon para datos independientes.

55 Las **figuras 35A-F** muestran la expresión del receptor inhibidor de linfocitos T intratumoral y la función de los linfocitos T. La figura 35A muestra la estrategia de selección de poblaciones celulares para la identificación de subconjuntos de linfocitos T CD8⁺ con expresión de PD-1^{alta}, PD-1^{int} y PD-1^{neg} de dos pacientes representativos. La figura 35B muestra la distribución de los subconjuntos de linfocitos T indicados en las muestras de tumor analizadas. La figura 35C muestra que las funciones de los linfocitos T inducidas por la estimulación con anti-CD3/anti-CD28 dependen del nivel de expresión de PD-1 de los linfocitos T CD8⁺. Se cultivaron hidrolizados tumorales y derrames neoplásicos durante 24 h en presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD3/CD28 agonistas. El incremento en la expresión de CD25 en linfocitos T CD8⁺ (fig. 35C) y el incremento de las citocinas efectoras IFN- γ , IL-2 y TNF (fig. 35D) se determinaron en tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa y abundante. Los valores de p se calcularon usando la prueba de Mann-Whitney para datos independientes. Las muestras de tumor se dividieron de acuerdo con el porcentaje de células CD8⁺ con expresión de PD-1^{alta} en dos grupos con expresión de PD-1^{alta} escasa y abundante, respectivamente (fig. 35E). El nivel de expresión de los receptores inhibidores PD-1, Tim-3, CTLA-4, Lag-3 y BTLA se determinó mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8⁺ de hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos (fig. 35F).

Las **figuras 36A-E** muestran patrones de expresión de receptores inhibidores y el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con expresión escasa y abundante. Las figuras 36A-D muestran la coexpresión de Tim-3, CTLA-4, Lag-3 y BTLA en linfocitos T CD8⁺ con expresión de PD-1^{alta}, PD-1^{int} y PD-1^{neg}. Los valores de p se calcularon usando ANOVA unidireccional con la prueba *a posteriori* de Bonferroni. Fig. 36E: Las muestras de tumor FolR1⁺ se dividieron de acuerdo con el porcentaje de células CD8⁺ con expresión de PD-1^{alta} en dos grupos con expresión de PD-1^{alta} escasa y abundante, respectivamente.

Las **figuras 37A-H** muestran que las funciones de los linfocitos T inducidas por TCB anti-FolR1 dependen del nivel de expresión de PD-1 de los linfocitos T CD8⁺. Se cultivaron hidrolizados tumorales y derrames neoplásicos FolR1⁺ durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FolR1. El incremento en la expresión de marcadores de activación en los linfocitos T CD8⁺ (fig. 37A-C) y el incremento de las citocinas efectoras IFN- γ , IL-2, TNF y perforina (fig. 37D-G) se determinó en tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa y abundante. La figura 37H muestra la destrucción de las células diana. Se ajustaron ambas muestras tumorales positivas y negativas para FolR1 mediante la adición de la línea celular Skov3 FolR1⁺ a una proporción E:T de 1:1 y la destrucción se comparó en tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa y abundante. Los valores de p se calcularon usando la prueba de Mann-Whitney para datos independientes.

Las **figuras 38A-E** muestran que el bloqueo de PD-1 incrementa la producción de citocinas, pero no su función citolítica en los linfocitos T de tumores con escasa expresión de PD-1^{alta} solo. Fig. 38A-D: Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos FolR1⁺ durante 24 h con TCB anti-FolR1 en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante de PD-1. Se determinaron los niveles IFN- γ , IF-2, TNF y perforina en los sobrenadantes de cultivo celular por matriz citométrica de microesferas o ELISA y se normalizaron a la cantidad de 1×10^5 linfocitos T CD3⁺ (IFN- γ , IL-2, TNF, fig. 38A-C) o linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ (perforina, fig. 38D). El incremento en la secreción de citocinas en el tratamiento combinado con TCB anti-FolR1 y anti-PD-1 en comparación con TCB anti-FolR1 solo se determinó en tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa y abundante. Fig. 38E: Se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos conjuntamente con células Skov3 marcadas con fluorescencia añadidas exógenamente en una proporción E:T de 1:1 durante 24 h en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante de PD-1 y TCB anti-FolR1. El incremento en la destrucción específica por el anticuerpo anti-PD-1 se comparó en tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa y abundante. Los valores de p se calcularon usando la prueba de Mann-Whitney para datos independientes.

La **figura 39** muestra características detalladas de los pacientes.

Las **figuras 40A-C** muestran la activación de linfocitos T CD8⁺ tras la exposición a concentraciones crecientes de TCB anti-FolR1. Se cultivaron PBMC conjuntamente con células Skov3 durante 24 h en presencia o ausencia de TCB anti-FolR1 o del control no específico TCB DP-47. La figura 40A muestra la expresión de FolR1 en células Skov3. Histograma sombreado: control de isotipo; histograma blanco: anticuerpo anti-FolR1. Fig. 40B: La expresión de los marcadores de activación CD25, CD137 e ICOS en linfocitos T CD8⁺ se determinó mediante citometría de flujo. Fig. 40C: La secreción de IFN- γ , TNF e IL-2 en los sobrenadantes de cultivo celular se determinó por ELISA y se normalizó a la cantidad de 1×10^5 linfocitos T CD3⁺.

Descripción detallada de modos de realización de la invención

I. DEFINICIONES

Una "región estructural humana aceptadora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptadora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios aminoacídicos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptadora de VL tiene una secuencia idéntica a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

Un anticuerpo "de afinidad madurada" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones

hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Los términos "un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al receptor de folato 1 (FolR1) y a CD3", "molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para FolR1 y para CD3" y "TCB anti-FolR1" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un anticuerpo biespecífico que se puede unir a FolR1 y a CD3 con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigir linfocitos T CD3⁺ a células diana FolR2⁺.

Los términos "anticuerpo anti-TIM3" y "anticuerpo TIM3" se usan como sinónimos en el presente documento para referirse a un anticuerpo que se une específicamente a TIM3. Un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se puede unir a TIM3, especialmente un polipéptido de TIM3 expresado en una superficie celular, con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo que une específicamente TIM3 a una proteína distinta de TIM3 no relacionada es menor de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a TIM3 como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA) o citometría de flujo (FACS). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une específicamente a TIM3 tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une específicamente a TIM3 se une a un epítipo de TIM3 que se conserva entre DR5 de especies diferentes. Preferentemente, dicho anticuerpo se une a TIM3 humana y de macaco cangrejero. La expresión "un anticuerpo que se une específicamente a TIM3" también engloba anticuerpos biespecíficos que se pueden unir a TIM3 y a un segundo antígeno.

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

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, fragmentos cross-Fab; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de un dominio VH, a saber, que se pueden ensamblar conjuntamente con un dominio VL, o de un dominio VL, a saber, que se pueden ensamblar conjuntamente con un dominio VH a un sitio de unión a antígeno funcional y que proporcionan, de este modo, la propiedad de unión a antígeno de los anticuerpos de longitud completa.

Como se usa en el presente documento, "fragmento Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. En un modo de realización, los anticuerpos biespecíficos de la invención comprenden al menos un fragmento Fab, en los que se intercambian las regiones variables o bien las regiones constantes de la cadena pesada y ligera. Debido al intercambio de las regiones variables o bien de las regiones constantes, dicho fragmento Fab también se denomina "fragmento cross-Fab" o "fragmento xFab" o "fragmento Fab de entrecruzamiento". Son posibles dos composiciones de cadena diferentes de una molécula Fab de entrecruzamiento y están comprendidas en los anticuerpos biespecíficos de la invención: por un lado, se intercambian las regiones variables de la cadena pesada y ligera de Fab, es decir, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada (CH1), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL). Esta molécula Fab de entrecruzamiento también se denomina CrossFab_(VLVH). Por otro lado, cuando se intercambian las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de Fab, la molécula Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena ligera (CL), y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena pesada (CH1). Esta molécula Fab de entrecruzamiento también se denomina CrossFab_(CLCH1). Formatos de anticuerpos biespecíficos que comprenden fragmentos Fab de entrecruzamiento se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080251, WO 2009/080254, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2013/026831.

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

a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1 o d) VL-CH1-conector-VH-CL; y

- en el que dicho conector es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente de entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1 y d) VL-CH1-conector-VH-CL se estabilizan por medio del enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. Además, se podrían estabilizar adicionalmente estas moléculas Fab monocatenarias mediante la generación de enlaces disulfuro intercatenarios por medio de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, en la posición 44 de la cadena pesada variable y la posición 100 de la cadena ligera variable de acuerdo con la numeración de Kabat). El término "extremo N" indica el último aminoácido del extremo N. El término "extremo C" indica el último aminoácido del extremo C.
- Por "fusionados" o "conectados" se entiende que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad del dominio Fc) se unen mediante enlaces peptídicos, directamente o bien por medio de uno o más conectores peptídicos.
- El término "conector", como se usa en el presente documento, se refiere a un conector peptídico y es preferentemente un péptido con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 5 aminoácidos, preferentemente con una longitud de 5 a 100, más preferentemente de 10 a 50 aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector peptídico es $(G_xS)_n$ (SEQ ID NO: 384 y 385) o $(G_xS)_nG_m$ (SEQ ID NO: 429 y 430), siendo G = glicina, S = serina, y $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ o } 6, \text{ y } m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$ o $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ o } 5 \text{ y } m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, preferentemente $x = 4$ y $n = 2 \text{ o } 3$, más preferentemente $x = 4, n = 2$. En un modo de realización, dicho conector peptídico es $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 386).
- El término "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se unen con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio variable pesado o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados regiones constantes de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio variable ligero o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio constante ligero (CL), también llamado región constante de la cadena ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de cinco tipos, llamados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales se pueden dividir además en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena ligera de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, unidos por medio de la región bisagra de inmunoglobulina.
- Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más. En el presente documento se proporciona un ensayo de competencia ejemplar.
- El término "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de una molécula de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, una molécula de unión a antígeno solo se puede unir a una parte particular del antígeno, denominándose dicha parte epítipo. Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, por uno o más dominios variables de anticuerpo (también llamados regiones variables de anticuerpo). Preferentemente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH).
- El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie diferente, normalmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Son preferentes los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable de conejo y una región constante humana. Otras formas preferentes de "anticuerpos quiméricos" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación con la unión a C1q y/o unión al receptor de Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN recombinante y de transfección génica convencionales y son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; las patentes de EE. UU. n.º 5.202.238 y 5.204.244.
- El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o provoca la muerte o destrucción de las células. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros

agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas micromoleculares o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antineoplásicos o antitumorales divulgados a continuación.

"Funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión a receptor de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Como se usan en el presente documento, se considera que los términos "genomanipular, genomanipulado, genomanipulación" incluyen cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La genomanipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

El término "mutación aminoacídica", como se usa en el presente documento, pretende englobar sustituciones, deleciones, inserciones y modificaciones aminoacídicas. Cualquier combinación de sustitución, deleción, inserción y modificación se puede realizar para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc o asociación incrementada con otro péptido. Las deleciones e inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen deleciones e inserciones de aminoácidos amino y/o carboxiterminales. Mutaciones aminoacídicas particulares son sustituciones aminoacídicas. Con el propósito de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, son en particular preferentes las sustituciones aminoacídicas no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones aminoacídicas incluyen el reemplazo por aminoácidos no naturales o por derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxi prolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxisilina). Se pueden generar mutaciones aminoacídicas usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida al sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles procedimientos de alteración del grupo de cadena lateral de un aminoácido por procedimientos distintos de genomanipulación, tales como modificación química. Se pueden usar diversas designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación aminoacídica. Por ejemplo, se puede indicar una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "dominio Fc" o "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG podrían variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente para que se extienda desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxiterminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos de aminoácido en la región Fc o región constante está de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD, 1991. Una "subunidad" de un dominio Fc, como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, que se pueden autoasociar de manera estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y uno CH3 de IgG.

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de una subunidad del dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad del dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación que promueve la asociación, como se usa en el presente documento, en particular incluye modificaciones separadas realizadas en cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desean asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en la que las modificaciones son complementarias entre sí para promover la asociación de las dos subunidades del dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas subunidades del dominio Fc para hacer que su asociación sea estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por tanto, se produce (hetero)dimerización entre un polipéptido que comprende la primera subunidad del dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad del dominio Fc, que podrían no ser idénticas en el sentido de que otros componentes fusionados a cada una de las subunidades (por ejemplo, restos de unión a antígeno) no son iguales. En algunos modos de realización, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación aminoacídica en el dominio Fc,

específicamente una sustitución aminoacídica. En un modo de realización particular, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación aminoacídica independiente, específicamente una sustitución aminoacídica, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

5 "Región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

10 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

15 Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

20 Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Como también se menciona para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, comprende también dichos anticuerpos que se modifican en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación con la unión a C1q y/o unión a FcR, por ejemplo, mediante "intercambio de clase", es decir, cambio o mutación de partes de Fc (por ejemplo, de IgG1 a IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4).

25 El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a hipermutación somática *in vivo*. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y se relacionan con las secuencias de VH y VL de la estirpe germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la estirpe germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

40 Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos de aminoácido que se producen lo más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación del NIH91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

45 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanizados" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación a la unión a C1q y/o la unión al receptor de Fc (FcR).

60 El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH

(H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden en general residuos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Los bucles hipervariables ejemplares se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácido 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera intercambiable en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) han descrito esta región particular, donde las definiciones incluyen residuos de aminoácido superpuestos o subconjuntos de los mismos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término como se define y se usa en el presente documento. Los residuos de aminoácido apropiados que engloban las CDR, como se define en cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la tabla A como comparación. Los números de residuos exactos que engloba una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria los residuos que comprende una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA A. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
CDR1 V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 V _L	89-97	91-96	89-97

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla A está de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.* (véase a continuación).

² "AbM" con una "b" minúscula como se usa en la tabla A se refiere a las CDR definidas por el programa informático de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de la región variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique de otro modo, las referencias a la numeración de posiciones de residuos de aminoácido específicas en una región variable de anticuerpo están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Con la excepción de la CDR1 en V_H, las CDR comprenden en general los residuos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de la especificidad" o "SDR", que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácido 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo pero sin limitarse a un agente citotóxico.

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo,

HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para obtener una revisión de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

5 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

10 "Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a DR5 y un anticuerpo para FAP" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpo (o fragmentos del mismo), incluyendo dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

15 El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes en general en cantidades insignificantes. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

25 30 Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no se conjuga a un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

35 "Anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio variable pesado o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio variable ligero o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio constante ligero (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

45 Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. En algunos modos de realización, los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquean la señalización a través de PD-1 para restablecer una respuesta funcional de los linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas, destrucción de células diana) desde un estado disfuncional a la estimulación antigénica.

50 Un anticuerpo "agonista" o activador es uno que potencia o inicia la señalización por el antígeno al que se une. En algunos modos de realización, los anticuerpos agonistas causan o activan la señalización sin la presencia del ligando natural.

55 El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

60 "Sin reactividad cruzada sustancial" significa que una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) no reconoce o se une específicamente a un antígeno diferente del antígeno diana real de la molécula (por ejemplo, un antígeno relacionado estrechamente con el antígeno diana), en particular cuando se compara con ese antígeno diana. Por ejemplo, un anticuerpo se puede unir en menos de aproximadamente un 10 % a menos de aproximadamente un 5 % a un antígeno diferente del antígeno diana real, o se puede unir a dicho antígeno diferente del antígeno diana real en una cantidad que consiste en menos de aproximadamente un 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 % o 0,1 %, preferentemente menos de aproximadamente un 2 %, 1 % o 0,5 %, y lo más preferentemente menos de aproximadamente un 0,2 % o 0,1 % de antígeno diferente del antígeno diana real.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido de B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

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

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

El término "antagonista de la unión al eje de PD-1" es una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión al eje de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, para eliminar la disfunción de los linfocitos T que resulta de la señalización en el eje de señalización de PD-1, siendo un resultado el restablecimiento o potenciación de la función de los linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas, destrucción de células diana). Como se usa en el presente documento, un antagonista de la unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de la unión a PD-1, un antagonista de la unión a PD-L1 y un antagonista de la unión a PD-L2.

El término "antagonistas de la unión a PD-1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-L1, PD-L2. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de la unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de la unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En un modo de realización, un antagonista de la unión a PD-1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento antigénico). En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de la unión a PD-1 es MDX-1106, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión a PD-1 es Merck 3745, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión a PD-1 es CT-011 descrito en el presente documento.

El término "antagonistas de la unión a PD-L1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En algunos modos de realización, un antagonista de la unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de la unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos modos de realización, los antagonistas de la unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En un modo de realización, un antagonista de la unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L 1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento antigénico). En algunos modos de realización, un antagonista de la unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L 1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, descrito en el presente documento. Todavía en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A, descrito en el presente documento.

El término "antagonistas de la unión a PD-L2" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1. En algunos modos de realización, un antagonista de la unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de la unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunos modos de realización, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tal como PD-1. En un modo de realización, un antagonista de la unión a PD-L2 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento antigénico). En algunos modos de realización, un antagonista de la unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

Un "oligopéptido PD-1", "oligopéptido PD-L1" u "oligopéptido PD-L2" es un oligopéptido que se une, preferentemente de manera específica, a un polipéptido coestimulador negativo de PD-1, PD-L1 o PD-L2, respectivamente, incluyendo un receptor, ligando o componente de señalización, respectivamente, como se describe en el presente documento. Dichos oligopéptidos se pueden sintetizar químicamente usando una metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos tienen normalmente al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, de forma alternativa al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud o más. Dichos oligopéptidos se pueden identificar usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que las técnicas para cribar colecciones de oligopéptidos para seleccionar oligopéptidos que se puedan unir específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones PCT n.º WO 84/03506 y WO 84/03564; Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs *et al.*, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 (1990); Lowman, H.B. *et al.*, Biochemistry, 30:10832 (1991); Clackson, T. *et al.*, Nature, 352:624 (1991); Marks, J. D. *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Kang, A.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 (1991) y Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2:668 (1991).

El término "anergia" se refiere al estado de falta de reactividad a la estimulación antigénica resultante de señales incompletas o insuficientes emitidas a través del receptor de linfocitos T (por ejemplo, incremento del Ca^{+2} intracelular en ausencia de activación de Ras). La anergia de linfocitos T también puede ser el resultado de la estimulación con antígeno en ausencia de coestimulación, lo que da como resultado que la célula se vuelva resistente a la activación posterior por el antígeno, incluso en el contexto de la coestimulación. El estado de falta de reactividad se puede contrarrestar a menudo por la presencia de interleucina-2. Los linfocitos T anérgicos no experimentan expansión clonal y/o no adquieren funciones efectoras.

El término "agotamiento" se refiere al agotamiento de los linfocitos T como un estado de disfunción de los linfocitos T que surge de la señalización mantenida de TCR que se produce durante muchas infecciones crónicas y durante el cáncer. Se distingue de la anergia en que surge no de una señalización incompleta o insuficiente, sino de una señalización mantenida. Se define por una función efectora deficiente, expresión mantenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto del de los linfocitos T efectores o de memoria funcionales. El agotamiento evita el control óptimo de infecciones y tumores. El agotamiento puede ser el resultado de las vías reguladoras negativas extrínsecas (por ejemplo, citocinas inmunorreguladoras), así como de las vías reguladoras (coestimuladoras)

negativas intrínsecas celulares (PD-1, B7-H3, B7-H4, etc.).

"Potenciar la función de los linfocitos T" significa inducir, causar o estimular que un linfocito T tenga una función biológica mantenida o amplificada, o renovar o reactivar linfocitos T agotados o inactivos. Los ejemplos de potenciación de la función de los linfocitos T incluyen: secreción incrementada de interferón y desde los linfocitos T CD8⁺, proliferación incrementada, reactividad incrementada a antígenos (por ejemplo, eliminación vírica, patógena o tumoral) en relación con dichos niveles antes de la intervención. En un modo de realización, el nivel de potenciación es al menos un 50 %, de forma alternativa un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 % o 200 %. La manera de medir esta potenciación es conocida por un experto en la técnica.

La "inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y la eliminación inmunitarios. Por tanto, como concepto terapéutico, se "trata" la inmunidad tumoral cuando se atenúa dicha evasión y el sistema inmunitario reconoce y ataca a los tumores. Ejemplos de reconocimiento tumoral incluyen unión a tumor, reducción del volumen tumoral y eliminación tumoral. [0046] "Inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una sustancia particular de provocar una respuesta inmunitaria. Los tumores son inmunógenos y la potenciación de la inmunogenicidad tumoral ayuda en la eliminación de las células tumorales por la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de potenciación de la inmunogenicidad tumoral incluyen el tratamiento con anticuerpos anti-PDL y un inhibidor de ME.

"Respuesta mantenida" se refiere al efecto mantenido en la reducción del crecimiento tumoral después de la interrupción de un tratamiento. Por ejemplo, el tamaño del tumor puede permanecer igual o más pequeño en comparación con el tamaño al comienzo de la fase de administración. En algunos modos de realización, la respuesta mantenida tiene una duración al menos igual a la duración del tratamiento, al menos 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 veces la duración del tratamiento.

El término "proteína de activación de fibroblastos (FAP)", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier FAP natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba la FAP no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de FAP que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de FAP, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Preferentemente, un anticuerpo anti-FAP de la invención se une al dominio extracelular de FAP. La secuencia de aminoácidos de secuencias polipeptídicas de FAP ejemplares, incluyendo la secuencia de FAP humana, se divulga en el documento WO 2012/020006.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y se puede realizar para profilaxis o bien durante la evolución de la enfermedad clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término cáncer, como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades proliferativas, tales como el cáncer colorrectal, sarcoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de pulmón microcítico y mesotelioma, incluidas las versiones resistentes de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. En un modo de realización, el cáncer es cáncer colorrectal y, opcionalmente, el agente quimioterápico es irinotecán. En modos de realización en los que el cáncer es sarcoma, opcionalmente el sarcoma es condrosarcoma, liomiosarcoma, tumores del estroma gastrointestinal, fibrosarcoma, osteosarcoma, liposarcoma o histiocitoma fibroso maligno.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* *Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

Como se usa en el presente documento, el término "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Ejemplos de moléculas de unión a antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos, de las mismas.

El término "sitio de unión a antígeno de un anticuerpo", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los

residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La parte de un anticuerpo que se une al antígeno contiene residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Regiones "estructurales" o "FR" son las regiones del dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento. Por lo tanto, los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, desde el extremo N al extremo C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión al antígeno y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los residuos de un "bucle hipervariable".

La especificidad de los anticuerpos se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo para un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. Los "anticuerpos biespecíficos" de acuerdo con la invención son anticuerpos que tienen dos especificidades de unión a antígeno diferentes. Los anticuerpos de la presente invención son específicos para dos antígenos diferentes, es decir, DR5 como primer antígeno y FAP como segundo antígeno.

El término anticuerpo "mono específico", como se usa en el presente documento, indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítipo del mismo antígeno.

El término "biespecífica" significa que la molécula de unión a antígeno se puede unir específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende al menos dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica se puede unir simultáneamente a dos determinantes antigénicos, en particular dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

El anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En el presente documento se proporciona un anticuerpo biespecífico, con especificidades de unión para FAP y DR5. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de DR5. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan DR5. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305:537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Trauneker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655 (1991)), y la genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodímeras en Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros en Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al. J. Immunol.* 147:60 (1991).

En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "FAB de doble acción" o "DAF" que comprende al menos un sitio de unión a antígeno que se une a FAP o a DR5, así como a otro antígeno diferente (véase el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El término "valente", como se usa en la presente solicitud, indica la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Como tales, los términos "bivalente", "tetra valente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención son al menos "bivalentes" y pueden ser "trivalentes" o "multivalentes" (por ejemplo, "tetra valentes" o "hexavalentes").

Los anticuerpos de la presente invención tienen dos o más sitios de unión y son biespecíficos. Es decir, los anticuerpos pueden ser biespecíficos incluso en casos donde haya más de dos sitios de unión (es decir, que el anticuerpo sea trivalente o multivalente). Los anticuerpos biespecíficos de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos monocatenarios multivalentes, diacuerpos y triacuerpos, así como anticuerpos que tienen la estructura de dominio constante de anticuerpos de longitud completa a los que se unen otros sitios de unión a antígeno (por ejemplo, Fv monocatenario, un dominio VH y/o un dominio VL, Fab o (Fab)₂) por medio de uno o más conectores peptídicos. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa de una única especie, o estar quimerizados o humanizados.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se une. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

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

Como se usan en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y todas esas designaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transfectantes" y "células transfectadas" incluyen la célula en cuestión primaria y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También se entiende que es posible que no toda la descendencia sea exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica a la cribada en la célula transformada originalmente.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

Como se usa en el presente documento, el término "unión" o "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (RPS, BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y KD (k_D/k_a). La unión o unión específica significa una afinidad de unión (KD) de 10^{-8} mol/l o menos, preferentemente 10^{-9} M a 10^{-13} mol/l.

La unión del anticuerpo al receptor de muerte se puede investigar mediante un ensayo en BIAcore (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y KD (k_D/k_a).

"Unión reducida", por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, como se mide, por ejemplo, por SPR. Para mayor claridad, el término incluye también la reducción de la afinidad hasta cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la supresión completa de la interacción. A la inversa, "unión incrementada" se refiere a un incremento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

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

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

Como se usa en el presente documento, los términos "primero" y "segundo" con respecto a los restos de unión a antígeno, etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. El uso de estos términos no pretende conferir una orientación u orden específico de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a menos que así se establezca explícitamente.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico que se puede unir de forma específica a un anticuerpo. En determinados modos de realización, los determinantes epitópicos incluyen agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, fosforilo o sulfonilo y, en determinados modos de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o

características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término "determinante antigénico" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional constituida por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo de resto de unión a antígeno-antígeno. Se pueden encontrar determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células afectadas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas denominadas antígenos en el presente documento, por ejemplo, FolR1 y CD3, pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En un modo de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en el presente documento, el término engloba la proteína no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Las proteínas humanas ejemplares útiles como antígenos incluyen, pero no se limitan a: FolR1 (receptor de folato alfa (FRA); proteína de unión a folato (FBP); FolR1 humano UniProt n.º: P15328; FolR1 murino UniProt n.º: P35846; FolR1 de macaco cangrejero UniProt n.º: G7PR14) y CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 130), NCBI RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 150 para la secuencia humana; o UniProt n.º Q95LI5 (versión 49), NCBI GenBank n.º BAB71849.1, para la secuencia de macaco cangrejero [*Macaca fascicularis*]). La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se une a un epítipo de CD3 o un antígeno de célula diana que se conserva entre el CD3 o el antígeno diana de diferentes especies. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se une a CD3 y FolR1, pero no se une a FolR2 (receptor de folato beta FRB; o FolR2 humano UniProt n.º: P14207) o FolR3 (receptor de folato gamma; FolR3 humano UniProt n.º: P41439).

Como se usa en el presente documento, se considera que los términos "genomanipular, genomanipulado, genomanipulación", en particular con el prefijo "gluco-", así como el término "genomanipulación de la glucosilación" incluyen cualquier manipulación del patrón de glucosilación de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La genomanipulación de la glucosilación incluye la genomanipulación metabólica de la maquinaria de glucosilación de una célula, incluyendo las manipulaciones genéticas de las vías de síntesis de oligosacáridos para lograr una alteración de la glucosilación de las glucoproteínas expresadas en las células. Además, la genomanipulación de la glucosilación incluye los efectos de las mutaciones y del medio celular sobre la glucosilación. En un modo de realización, la genomanipulación de la glucosilación es una alteración en la actividad de glucosiltransferasa. En un modo de realización particular, la genomanipulación da como resultado una actividad glucosaminiltransferasa y/o actividad fucosiltransferasa alteradas.

II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

En un aspecto, la invención se basa en el uso de una combinación terapéutica de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un primer sitio de unión a antígeno específico para el receptor de folato 1 (FolR1) y un segundo sitio de unión a antígeno específico para CD3, y un antagonista de la unión al eje de PD-1, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer. En algunos modos de realización, la combinación terapéutica incluye además un antagonista de TIM3.

A. Politerapia de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y un antagonista de la unión al eje de PD-1

En términos generales, la presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y a su uso en combinación con antagonistas de la unión al eje de PD-1. La ventaja de la politerapia con respecto a la monoterapia es que las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T usadas en la presente invención permiten el redireccionamiento y la activación de los linfocitos T hacia la célula diana, mientras que el antagonista de la unión al eje de PD-1 potencia la función de los linfocitos T al reducir el agotamiento de linfocitos T.

En un aspecto, en el presente documento se proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, por ejemplo, una TCB anti-FolR1 y un antagonista de la unión al eje de PD-1. En algunos modos de realización, el tratamiento da como resultado una respuesta mantenida en el individuo después de la interrupción del tratamiento. Los procedimientos de la presente invención pueden encontrar uso en el tratamiento de afecciones en las que se desea una inmunogenicidad potenciada, tal como incrementando la inmunogenicidad tumoral para el tratamiento del cáncer. Se pueden tratar una variedad de cánceres, o se puede retrasar su progresión, incluyendo, pero sin limitarse a, un cáncer que puede contener una mutación V600E de BRAF, un cáncer que puede contener un BRAF natural, un cáncer que puede contener un KRAS natural o un cáncer que puede contener una mutación activadora de KRAS.

- En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de endometrio. El cáncer de endometrio puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene melanoma. El melanoma puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer colorrectal. El cáncer colorrectal puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de pulmón, por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico. El carcinoma de pulmón no microcítico puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de páncreas. El cáncer de páncreas puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene una neoplasia hemática. La neoplasia hemática puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de mama. El cáncer de mama puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene carcinoma de células renales. El carcinoma de células renales puede estar en fase precoz o en fase tardía.
- En algunos modos de realización, el individuo es un mamífero, tal como animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En algunos modos de realización, el individuo tratado es un humano.
- En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un procedimiento de potenciación de la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, específicamente una TCB anti-FoIR1, y un antagonista de la unión al eje de PD-1.
- En algunos modos de realización, los linfocitos T en el individuo tienen una activación, proliferación y/o función efectora potenciadas con respecto a antes de la administración de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y el antagonista de la vía de PD-1. En algunos modos de realización, la función efectora de los linfocitos T es la secreción de al menos uno de IL-2, IFN- γ y TNF- α . En un modo de realización, la administración de una TCB anti-FoIR1 y un anticuerpo anti-PDL1 da como resultado una secreción incrementada de linfocitos T de IL-2, IFN- γ y TNF- α . En algunos modos de realización, el linfocito T es un linfocito T CD8⁺. En algunos modos de realización, la sensibilización de linfocitos T se caracteriza por una expresión elevada de CD44 y/o una actividad citolítica potenciada en linfocitos T CD8. En algunos modos de realización, la activación de linfocitos T CD8 se caracteriza por una frecuencia elevada de linfocitos T CD8 γ -IFT⁺. En algunos modos de realización, el linfocito T CD8 es un linfocito T específico de antígeno. En algunos modos de realización se inhibe la inmunoevasión mediante señalización a través de la expresión superficial de PD-L1. En algunos modos de realización, el cáncer tiene niveles elevados de infiltración de linfocitos T.
- En algunos modos de realización, la politerapia de la invención comprende la administración de una TCB anti-FoIR1 y de un antagonista de la unión al eje de PD-1. La TCB anti-FoIR1 y un antagonista de la unión al eje de PD-1 se pueden administrar de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, la TCB anti-FoIR1 y un antagonista de la unión al eje de PD-1 se pueden administrar secuencialmente (en diferentes momentos) o concurrentemente (al mismo tiempo). En algunos modos de realización, la TCB anti-FoIR1 se administra de forma continua. En algunos modos de realización, la TCB anti-FoIR1 se administra de forma intermitente. En algunos modos de realización, la TCB anti-FoIR1 se administra antes de la administración del antagonista de la unión al eje de PD-1. En algunos modos de realización, la TCB anti-FoIR1 se administra simultáneamente a la administración del antagonista de la unión al eje de PD-1. En algunos modos de realización, la TCB anti-FoIR1 se administra después de la administración del antagonista de la unión al eje de PD-1.
- En algunos modos de realización se proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos, por ejemplo, una TCB anti-FoIR1 y un antagonista de la unión al eje de PD-1, que comprende además administrar un tratamiento adicional. Específicamente, se contempla un modo de realización en el que el tratamiento adicional comprende un antagonista de TIM-3. En consecuencia, en un aspecto, en el presente documento se proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, específicamente una TCB anti-FoIR1, un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un antagonista de TIM-3. Se puede usar cualquier antagonista de TIM3, por ejemplo, los descritos en el presente documento. El tratamiento adicional también puede ser radioterapia, cirugía (por ejemplo, tumorectomía y una mastectomía), quimioterapia, genoterapia, tratamiento de ADN, tratamiento antivirico, tratamiento de A N, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, tratamiento con anticuerpos monoclonales o una combinación de lo anterior. El tratamiento adicional puede ser en forma de tratamiento quirúrgico o posquirúrgico. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es la administración de un inhibidor enzimático micromolecular o agente antimetastático. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados a disminuir la aparición y/o la gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes antieméticos, etc.). En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es radioterapia. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es cirugía. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es una combinación de radioterapia y cirugía. En algunos modos de realización,

el tratamiento adicional es irradiación gamma. En algunos modos de realización, el tratamiento adicional es un tratamiento dirigido a la vía de PI3K/A T/mTOR, inhibidor de HSP90, inhibidor de tubulina, inhibidor de apoptosis y/o agente quimioprolifáctico. El tratamiento adicional puede ser uno o más de los agentes quimioterápicos descritos anteriormente en el presente documento.

5 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, por ejemplo, una TCB anti-FoIR1, y el antagonista de la unión al eje de PD-1 se pueden administrar mediante la misma vía de administración o mediante diferentes vías de administración. En algunos modos de realización, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, por ejemplo, una TCB anti-FoIR1, se administran por vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía tópica, vía oral, vía transdérmica, vía intraperitoneal, vía intraorbitaria, por implantación, por inhalación, vía intratecal, vía intraventricular o vía intranasal. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra por vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía tópica, vía oral, vía transdérmica, vía intraperitoneal, vía intraorbitaria, por implantación, por inhalación, vía intratecal, vía intraventricular o vía intranasal. Se puede administrar una cantidad eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y del antagonista de la unión al eje de PD-1 para la prevención o el tratamiento de la enfermedad. La dosificación apropiada de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y/o el antagonista de la unión al eje de PD-1 se puede determinar en base al tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y de antagonista de la unión al eje de PD-1, la gravedad y la evolución de la enfermedad, el estado clínico del individuo, la anamnesis del individuo y la respuesta al tratamiento, y el criterio del médico especialista.

En los procedimientos se puede usar cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, los antagonistas de la unión al eje de PD-1 y los antagonistas de TIM3 conocidos en la técnica o descritos a continuación.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describen en el presente documento, un antagonista de la unión al eje de PD-1 como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos modos de realización, la composición farmacéutica comprende además un antagonista de TIM3.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FoIR1) y para CD3, y un prospecto del envase que comprende instrucciones para usar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con un antagonista de la unión al eje de PD-1 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En algunos modos de realización, el kit comprende además instrucciones para usar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con un antagonista de TIM3. En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FoIR1) y para CD3 y un antagonista de la unión al eje de PD-1, y un prospecto del envase que comprende instrucciones para usar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y el antagonista de la unión al eje de PD-1 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En un modo de realización, el kit comprende además un antagonista de TIM3. En uno de los modos de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PDL1. En un modo de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es una inmunoadhesina anti-PD-1.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende:

(i) un primer recipiente que comprende una composición que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FoIR1) y para CD3 como se describe en el presente documento; y

50 (ii) un segundo recipiente que comprende una composición que comprende un antagonista de la unión al eje de PD-1.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende:

55 (i) un primer recipiente que comprende una composición que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para el receptor de folato 1 (FoIR1) y para CD3 como se describe en el presente documento;

60 (ii) un segundo recipiente que comprende una composición que comprende un antagonista de la unión al eje de PD-1; y

(iii) un tercer recipiente que comprende una composición que comprende un antagonista de TIM3.

65

B. Molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T ejemplar para su uso en la invención

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención es biespecífica, es decir, comprende al menos dos restos de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a dos determinantes antigénicos distintos, es decir a CD3 y a FolR1. De acuerdo con la invención, los restos de unión a antígeno son moléculas Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos por una cadena pesada y una ligera, comprendiendo cada una una región variable y una constante). En un modo de realización, dichas moléculas Fab son humanas. En otro modo de realización, dichas moléculas Fab son humanizadas. Aún en otro modo de realización, dichas moléculas Fab comprenden regiones constantes de la cadena pesada y ligera humanas.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención se puede unir simultáneamente al antígeno de la célula diana FolR1 y CD3. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede entrecruzar un linfocito T y una célula diana que expresa FolR1 mediante unión simultánea al antígeno de la célula diana FolR1 y a CD3. En un modo de realización incluso más particular, dicha unión simultánea da como resultado la lisis de la célula diana que expresa FolR1, en particular una célula tumoral que expresa FolR1. En un modo de realización, dicha unión simultánea da como resultado la activación del linfocito T. En otros modos de realización, dicha unión simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionada del grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. En un modo de realización, la unión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a CD3 sin unión simultánea al antígeno de la célula diana FolR1 no da como resultado la activación del linfocito T.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede redireccionar la actividad citotóxica de un linfocito T hacia una célula diana que expresa FolR1. En un modo de realización particular, dicho redireccionamiento es independiente de la presentación de antígenos peptídicos mediada por MHC por la célula diana y/o la especificidad del linfocito T.

En particular, un linfocito T de acuerdo con algunos de los modos de realización de la invención es un linfocito T citotóxico. En algunos modos de realización, el linfocito T es un linfocito T CD4⁺ o CD8⁺, en particular un linfocito T CD8⁺.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3 (también denominado en el presente documento "resto de unión al antígeno CD3" o "primer resto de unión a antígeno"). En un modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende no más de un resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T proporciona unión monovalente a CD3. En un modo de realización particular, el CD3 es CD3 humano o CD3 de macaco cangrejero, lo más en particular CD3 humano. En un modo de realización particular, el resto de unión al antígeno CD3 reacciona de forma cruzada con (es decir, se une específicamente a) CD3 humano y de macaco cangrejero. En algunos modos de realización, el primer resto de unión a antígeno se puede unir de forma específica a la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 130), NCBI RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 150 para la secuencia humana; UniProt n.º Q95L15 (versión 49), NCBI GenBank n.º BAB71849.1, para la secuencia de macaco cangrejero [*Macaca fascicularis*]).

En algunos modos de realización, el resto de unión al antígeno CD3 comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

En un modo de realización, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34.

En un modo de realización, el resto de unión al antígeno CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 31.

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

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir al antígeno de la célula diana FolR1 (también denominado en el presente documento "resto de unión a FolR1" o "segundo" o "tercer" resto de unión a antígeno). En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que se puede unir al antígeno de la célula diana FolR1 no se une a FolR2 o FolR3. En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno FolR1 reacciona de forma cruzada con (es decir, se une

específicamente a) FolR1 humano y de macaco cangrejero. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende dos restos de unión a antígeno que se pueden unir al antígeno de célula diana FolR1. En un modo de realización particular de este tipo, cada uno de estos restos de unión a antígeno se une específicamente al mismo determinante antigénico. En un modo de realización aún más particular, todos estos restos de unión a antígeno son idénticos. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende no más de dos restos de unión a antígeno que se pueden unir a FolR1.

El resto de unión a FolR1 es en general una molécula Fab que se une específicamente a FolR1 y puede dirigir la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a la que está unida a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que expresa FolR1.

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

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34; y

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1).

En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T adicionalmente comprende

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a FolR1.

En un modo de realización de este tipo, el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR1 comprenden secuencias idénticas de región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y CDR de la cadena ligera. En un modo de realización de este tipo, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de cualquiera de los modos de realización anteriores comprende adicionalmente un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable.

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

En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, opcionalmente por medio de un conector peptídico.

En otro modo de realización particular, no más de un resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 está presente en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (es decir, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T proporciona unión monovalente a CD3).

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

Los autores de la presente invención generaron un anticuerpo biespecífico en el que los restos de unión comparten una cadena ligera común que conserva la especificidad y eficacia del anticuerpo mono específico original para CD3 y se puede unir a un segundo antígeno (por ejemplo, FolR1) usando la misma cadena ligera. La generación de una molécula biespecífica con una cadena ligera común que conserva las propiedades de unión del anticuerpo original no es sencilla, ya que las CDR comunes de la cadena ligera híbrida tienen que lograr la especificidad de unión para ambas dianas. En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un primer y un segundo resto de unión a antígeno, uno de los cuales es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3 y el otro de los cuales es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a FolR1, en la que la primera y la segunda molécula Fab tienen cadenas ligeras VLCL idénticas. En un modo de realización, dicha cadena ligera (VLCL) idéntica comprende las CDR de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34. En un modo de realización, dicha cadena ligera (VLCL) idéntica

comprende SEQ ID NO: 35.

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

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

En un modo de realización de este tipo, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y el resto de unión al antígeno FolR1 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 18, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34.

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

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 15 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 31, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 15 y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 31.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T adicionalmente comprende

(iii) un tercer resto de unión a antígeno (que es una molécula Fab) que se puede unir de forma específica a FolR1.

En un modo de realización de este tipo, el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR1 comprenden secuencias idénticas de región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y CDR de la cadena ligera. En un modo de realización de este tipo, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

Por tanto, en un modo de realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena

pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

5 (iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

10 En un modo de realización de este tipo, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y el resto de unión al antígeno FolR1 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 18, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34.

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

20 (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

25 (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

30 (iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

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

35 (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

40 (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 402 y SEQ ID NO: 400 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

45 En un modo de realización de este tipo, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y el resto de unión al antígeno FolR1 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 402, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 400, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34.

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

55 (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3, que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

60 (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 401 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

65 En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 401 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente

un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 31, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

5 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 401 y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 31.

10 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T adicionalmente comprende

(iii) un tercer resto de unión a antígeno (que es una molécula Fab) que se puede unir de forma específica a FolR1.

15 En un modo de realización de este tipo, el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR1 comprenden secuencias idénticas de región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y CDR de la cadena ligera. En un modo de realización de este tipo, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

20 Por tanto, en un modo de realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

25 (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

30 (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 402 y SEQ ID NO: 400 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

35 (iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 402 y SEQ ID NO: 400 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

40 En un modo de realización de este tipo, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y el resto de unión al antígeno FolR1 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 402, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 400, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34.

45 En un modo de realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

50 (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a CD3, que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

55 (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 401 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

60 (iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1), que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 401 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

65 Por tanto, en un modo de realización, la invención se refiere a moléculas biespecíficas en las que al menos dos restos de unión tienen cadenas ligeras idénticas y cadenas pesadas remodeladas correspondientes que confieren la unión específica al antígeno activador de linfocitos CD3 y al antígeno de célula diana FolR1, respectivamente. El uso de este llamado principio de "cadena ligera común", es decir, la combinación de dos moléculas de unión que comparten una cadena ligera, pero que todavía tienen especificidades independientes, evita el emparejamiento erróneo de las cadenas ligeras. Por tanto, existen menos productos secundarios durante la producción, lo que facilita la preparación

homogénea de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T.

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones. Configuraciones ejemplares se muestran en las figuras 1A-I y se describen con más detalle a continuación.

En algunos modos de realización, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable. A continuación, se describen modos de realización ejemplares de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc.

Molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con un fragmento Fab de entrecruzamiento

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

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65.

En un modo de realización de este tipo, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y el resto de unión al antígeno FolR1 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 56, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 59, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 60 y CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 65.

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

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

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

En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una secuencia de

la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 55 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 64, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

5

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

10

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T adicionalmente comprende

15

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FoIR1.

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

20

En un modo de realización de este tipo, el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FoIR1 comprenden secuencias idénticas de región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y CDR de la cadena ligera. En un modo de realización de este tipo, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

25

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

30

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FoIR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65.

35

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FoIR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65.

40

En un modo de realización de este tipo, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y el resto de unión al antígeno FoIR1 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 56, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 57, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 59, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 60 y CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 65.

45

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

50

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

55

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FoIR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

60

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FoIR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

65

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

5 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 50 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54.

En un modo de realización de este tipo, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y el resto de unión al antígeno FolR1 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 50, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 52, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 53 y CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 54.

25 En un modo de realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En un modo de realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende

30 (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

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

40 En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 49 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 51, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 31, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 49 y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 51.

55 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T adicionalmente comprende

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FolR1.

60 En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En un modo de realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento.

En un modo de realización de este tipo, el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR1 comprenden secuencias idénticas de región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y CDR de la cadena ligera. En un modo de realización de este tipo, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende

- 5 (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;
- 10 (ii) un segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 49 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54.
- 15 (iii) un tercer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 50 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54.

20 En un modo de realización de este tipo, el resto de unión al antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y el resto de unión al antígeno FolR1 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 50, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 52, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 53 y CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 54.

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

30 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende

- (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab de entrecruzamiento que se puede unir de forma específica a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.
- 35 (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.
- 40 (iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

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

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

55 Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones. Configuraciones ejemplares se muestran en las figuras 1A-I y se describen con más detalle a continuación.

60 En algunos modos de realización, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable. A continuación, se describen modos de realización ejemplares de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc.

Formatos de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T

65 Como se representa anteriormente y en las figuras 1A-I, en un modo de realización las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T comprenden al menos dos fragmentos Fab que tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas y que tienen cadenas pesadas (VHCL) diferentes que confieren las especificidades para dos antígenos diferentes, es decir, un fragmento Fab se puede unir de forma específica a un antígeno activador de linfocitos T CD3

y el otro fragmento Fab se puede unir de forma específica al antígeno de célula diana FoIR1.

En otro modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende al menos dos restos de unión a antígeno (moléculas Fab), uno de los cuales es una molécula Fab de entrecruzamiento y uno de los cuales es una molécula Fab convencional. En un modo de realización de este tipo, el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento y el segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FoIR es una molécula de Fab convencional.

Estos componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones. Configuraciones ejemplares se representan en las figuras 1A-I.

En algunos modos de realización, el primer y segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización de este tipo, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otro modo de realización de este tipo, el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento y el segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FoIR es una molécula de Fab convencional.

En un modo de realización, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, el dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno, y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización de este tipo, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otro modo de realización de este tipo, el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento y el segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FoIR es una molécula de Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En otros modos de realización, el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización particular de este tipo, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, el dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización de este tipo, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otro modo de realización de este tipo, el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento y el segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a FoIR es una molécula de Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

Los restos de unión a antígeno se pueden fusionar al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un conector peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunógenos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos $(G_4S)_n$ (SEQ ID NO: 387), $(SG_4)_n$ (SEQ ID NO: 388), $(G_4S)_n$ (SEQ ID NO: 387) o $G_4(SG_4)_n$ (SEQ ID NO: 389), siendo "n", en general, un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4. Un conector peptídico adecuado en particular para fusionar las cadenas ligeras de Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno entre sí es $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 386). Un conector peptídico ejemplar adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno es EPKSC(D)- $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 390 y 391). Adicionalmente, los conectores pueden comprender (una parte de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular, cuando un resto de unión a antígeno se fusiona al extremo N de una subunidad del dominio Fc, se puede fusionar por medio de una región bisagra de inmunoglobulina o una parte de la misma, con o

sin un conector peptídico adicional.

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

En consecuencia, en determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende además un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir de forma específica a FoIR. En un modo de realización de este tipo, el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FoIR1 comprenden secuencias idénticas de región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y CDR de la cadena ligera, es decir, las secuencias de CDR de la cadena pesada del segundo resto de unión a antígeno son las mismas que las secuencias de CDR de la cadena pesada del tercer resto de unión a antígeno y las secuencias de CDR de la cadena ligera del segundo resto de unión a antígeno son las mismas que las secuencias de CDR de la cadena ligera del tercer resto de unión a antígeno. En un modo de realización de este tipo, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno (es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos).

En un modo de realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc, y el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc y el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En un modo de realización de este tipo, el primer, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otro modo de realización de este tipo, el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento y el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FoIR son una molécula de Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del tercer resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende a) un primer sitio de unión a antígeno que compite por la unión a FoIR1 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio de la cadena pesada variable (VH) de SEQ ID NO: 49 y un dominio de la cadena ligera variable de SEQ ID NO: 51; y b) un segundo sitio de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio de la cadena pesada variable (VH) de SEQ ID NO: 36 y un dominio de la cadena ligera variable de SEQ ID NO: 31, en el que la competición por la unión se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3, y un segundo resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica al receptor de folato 1 (FoIR1), en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une al mismo epítipo de FoIR1 humano que un primer anticuerpo de referencia que comprende un dominio de la cadena pesada variable (VH) de SEQ ID NO: 49 y un dominio de la cadena ligera variable de SEQ ID NO: 51; y en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se une al mismo epítipo de CD3 humano que un segundo anticuerpo de referencia que comprende un dominio de la cadena pesada variable (VH) de SEQ ID NO: 36 y un dominio de la cadena ligera variable de SEQ ID NO: 31.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende una primera, segunda, tercera, cuarta y quinta cadena polipeptídica que forman un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno en la que el primer resto de unión a antígeno se puede unir a CD3 y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir cada uno al receptor de folato 1 (FoIR1). La primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden, en dirección desde el extremo amino (N) hacia el extremo carboxilo (C), un primer dominio variable de la cadena ligera (VLD1) y un primer dominio constante de la cadena ligera (CLD1). La tercera cadena polipeptídica comprende, en dirección desde el extremo N hacia el extremo C, un segundo dominio variable de la cadena ligera (VLD2) y un segundo dominio constante de la cadena pesada 1 (CH1D2). La cuarta cadena polipeptídica comprende, en dirección desde el extremo N hacia el extremo C, un primer dominio variable de la cadena pesada (VHD1), un primer dominio constante de la cadena pesada 1 (CH1D1), un primer dominio constante de la cadena pesada 2 (CH2D1) y un primer dominio constante de la cadena pesada 3 (CH3D1). La quinta cadena polipeptídica comprende VHD1, CH1D1, un segundo dominio variable de la cadena pesada (VHD2), un segundo dominio constante de la cadena ligera (CLD2), un segundo dominio constante de la cadena pesada 2 (CH2D2) y un segundo dominio constante de la cadena pesada 3 (CH3D2). La tercera cadena polipeptídica y VHD2 y CLD2 de la

quinta cadena polipeptídica forman el primer resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3. La segunda cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la quinta cadena polipeptídica forman el tercer resto de unión que se puede unir a FolR1. La primera cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la cuarta cadena polipeptídica forman el segundo resto de unión que se puede unir a FolR1.

5 En otro modo de realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en la que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del tercer resto de unión a antígeno. En un modo de realización de este tipo, el primer, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otro modo de realización de este tipo, el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento y el segundo y tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR son una molécula de Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

Los restos de unión a antígeno se pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En un modo de realización particular, los restos de unión a antígeno se fusionan cada uno al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana.

En un modo de realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc forman parte de una molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la clase IgG. En un modo de realización incluso más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG₁. En otro modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la subclase IgG₄. En otro modo de realización particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otros modos de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada.

En un modo de realización particular, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc forman parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, en la que el primer, segundo y tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas, en el que el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR1 comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34.

En un modo de realización particular, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc forman parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, en la que el primer, segundo y tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas, en el que el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 36, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 31; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR1 comprenden una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 31.

En un modo de realización particular, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc forman parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno y el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variable o constante de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a

FolR1 comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 65.

5 En un modo de realización particular, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc forman parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno y el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variable o constante de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, en la que el primer resto de unión a antígeno que se puede unir de forma específica a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 36, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 31; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno que se pueden unir de forma específica a FolR1 comprenden una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 55, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 65.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T es monovalente para cada antígeno. En un modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede unir a CD3 humano y al receptor de folato humano alfa (FolR1) y se preparó sin emplear un enfoque de heterodimerización, tal como, por ejemplo, tecnología de botón en ojal. Por ejemplo, la molécula se puede producir empleando una colección de cadenas ligeras comunes y tecnología CrossMab. En un modo de realización particular, la región variable de la molécula de unión a CD3 se fusiona al dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano estándar para formar la molécula entrecruzada VLVH (fusionada a Fc) que es común para ambas especificidades. Para generar los equivalentes entrecruzados (VHCL), se fusiona un dominio de la cadena pesada variable específico para CD3 a una cadena ligera λ humana constante, mientras que un dominio de la cadena pesada variable específico para FolR1 humano (por ejemplo, aislado de la colección de cadenas ligeras comunes) se fusiona con una cadena ligera κ humana constante. La molécula deseada resultante con cadenas correctamente emparejadas comprende ambas cadenas ligeras kappa y lambda o fragmentos de las mismas. En consecuencia, esta especie de molécula biespecífica deseada se puede purificar de las especies homodiméricas o mal emparejadas mediante etapas de purificación secuenciales que seleccionan la cadena ligera kappa y lambda, en cualquier secuencia. En un modo de realización particular, la purificación del anticuerpo biespecífico deseado emplea etapas de purificación posteriores con las columnas KappaSelect y LambdaFabSelect (GE Healthcare) para eliminar los anticuerpos homodiméricos no deseados.

35 **Dominio Fc**

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

En un modo de realización de acuerdo con la invención, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T es un dominio Fc de IgG. En un modo de realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otro modo de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En un modo de realización más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende una sustitución aminoacídica en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular la sustitución aminoacídica S228P. Esta sustitución aminoacídica reduce el intercambio *in vivo* en el brazo Fab de los anticuerpos IgG₄ (véase Stubenrauch *et al.*, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En otro modo de realización particular, el dominio Fc es humano.

Modificaciones en el dominio Fc que promueven la heterodimerización

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

En consecuencia, en modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana está en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, en un modo de

realización, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un modo de realización específico, dicha modificación es una modificación llamada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en un modo de realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede colocar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que se puede colocar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

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

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

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

En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3 se fusiona (opcionalmente a través del resto de unión a antígeno que se puede unir a un antígeno de célula diana) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación "botón"). Sin quedar vinculado a ninguna teoría, la fusión del resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3 a la subunidad que contiene un botón del dominio Fc minimizará (además) la generación de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos restos de unión a antígeno que se pueden unir a CD3 (impedimento estérico de dos polipéptidos que contienen botones).

En un modo de realización alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media en los efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno o más residuos de aminoácido en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc por residuos de aminoácido cargados de modo que la formación de homodímeros se vuelve electrostáticamente desfavorable, pero la heterodimerización es electrostáticamente favorable.

Modificaciones en el dominio Fc que suprimen la unión al receptor de Fc y/o la función efectora

El dominio Fc confiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una semivida en suero larga que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una proporción de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo, sin embargo, puede dar lugar a la dirección indeseable de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T hacia células que expresan receptores de Fc en lugar de a las células portadoras de antígenos preferentes. Además, la coactivación de las vías de señalización del receptor de Fc puede dar lugar a la liberación de citocinas lo que, en combinación con las propiedades activadoras de linfocitos T y la semivida larga de la molécula de unión a antígeno, da como resultado una activación excesiva de receptores de citocinas y efectos secundarios graves tras la administración sistémica. La activación de células inmunitarias (portadoras del receptor de Fc) distintas de linfocitos T incluso puede reducir la

eficacia de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T debido a la destrucción potencial de linfocitos T, por ejemplo, por linfocitos NK.

5 En consecuencia, en modos de realización particulares, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de acuerdo con la invención presenta una afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con el dominio Fc de IgG₁ natural. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural), y/o menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la función efectora en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural). En un modo de realización, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce función efectora. En un modo de realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En un modo de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En un modo de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano activador, más específicamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa humano, lo más específicamente Fc γ RIIIa humano. En un modo de realización, la función efectora es una o más seleccionada del grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En un modo de realización particular, la función efectora es ADCC. En un modo de realización, el dominio Fc presenta una afinidad de unión sustancialmente similar al receptor de Fc neonatal (FcRn) en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. Se logra una unión sustancialmente similar a FcRn cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente un 70 %, en particular más de aproximadamente un 80 %, más en particular más de aproximadamente un 90 % de la afinidad de unión de un dominio Fc de IgG₁ natural (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural) por FcRn.

En determinados modos de realización, el dominio Fc se genomanipula para que tenga afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. En modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o función efectora. Típicamente, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc está presente la misma mutación o mutaciones aminoacídicas. En un modo de realización, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc. En un modo de realización, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En modos de realización donde existe más de una mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por el receptor de Fc, la combinación de estas mutaciones aminoacídicas puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc genomanipulado presenta menos de un 20 %, en particular menos de un 10 %, más en particular menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc en comparación con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado. En un modo de realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En algunos modos de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En algunos modos de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano activador, más específicamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa humano, lo más específicamente Fc γ RIIIa humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunos modos de realización también se reduce la afinidad de unión por un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión por C1q. En un modo de realización, no se reduce la afinidad de unión por el receptor de Fc neonatal (FcRn). La unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación de la afinidad de unión del dominio Fc por dicho receptor, se logra cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente un 70 % de la afinidad de unión de una forma no genomanipulada del dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicha forma no genomanipulada del dominio Fc) por FcRn. El dominio Fc, o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención que comprenden dicho dominio Fc, pueden presentar más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad. En determinados modos de realización, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se genomanipula para que tenga función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos reducida, unión a linfocitos NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce apoptosis reducida, entrecruzamiento de anticuerpos unidos a diana reducido, maduración de células dendríticas reducida o activación de linfocitos T reducida. En un modo de realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y

secreción de citocinas reducida. En un modo de realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En un modo de realización, la ADCC reducida es menor de un 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no genomanipulado (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado).

5 En un modo de realización, la mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o función efectora es una sustitución aminoacídica. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329. En un modo de realización más específico, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de L234, L235 y P329. En algunos modos de realización, el dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A y L235A. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329. En un modo de realización más específico, la sustitución aminoacídica es P329A o P329G, en particular, P329G. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329 y una sustitución aminoacídica adicional en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331. En un modo de realización más específico, la sustitución aminoacídica adicional es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones P329, L234 y L235. En modos de realización más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G LALA"). En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "P329G LALA" de sustituciones aminoacídicas suprime casi completamente la unión de un dominio Fc de IgG₁ humana a un receptor de Fc γ , como se describe en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. El documento WO 2012/130831 también describe procedimientos de preparación de dichos dominios Fc mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades tales como unión al receptor de Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos IgG₄ presentan una afinidad de unión reducida por receptores de Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos IgG₁. Por tanto, en algunos modos de realización, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención es un dominio Fc de IgG₄, en particular un dominio Fc de IgG₄ humana. En un modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones aminoacídicas en la posición S228, específicamente la sustitución aminoacídica S228P. Para reducir más su afinidad de unión por un receptor de Fc y/o su función efectora, en un modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución aminoacídica en la posición L235, específicamente la sustitución aminoacídica L235E. En otro modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329, específicamente la sustitución aminoacídica P329G. En un modo de realización particular, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente las sustituciones aminoacídicas S228P, L235E y P329G. Dichos mutantes de dominio Fc de IgG₄ y sus propiedades de unión al receptor de Fc γ se describen en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

40 En un modo de realización particular, el dominio Fc que presenta afinidad de unión por un receptor de Fc reducida y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural es un dominio Fc de IgG₁ humana que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y opcionalmente P329G, o un dominio Fc de IgG₄ humana que comprende las sustituciones aminoacídicas S228P, L235E y opcionalmente P329G.

45 En determinados modos de realización se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc comprende una mutación aminoacídica en la posición N297, en particular, una sustitución aminoacídica que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D).

50 Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, los dominios Fc con unión a receptor de Fc y/o función efectora reducidas también incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 del dominio Fc (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

55 Se pueden preparar dominios Fc mutantes por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.

60 La unión a receptores de Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. Un ensayo de unión de este tipo adecuado se describe en el presente documento. De forma alternativa, se puede evaluar la afinidad de unión de dominios Fc o moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos que comprenden un dominio Fc por los receptores de Fc usando líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos

NK humanos que expresan el receptor de FcγIIIa.

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

En algunos modos de realización, se reduce la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, en algunos modos de realización en los que se manipula el dominio Fc para que tenga una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede unir a C1q y, por tanto, tener actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Modificaciones en el dominio Fc que promueven la heterodimerización

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención comprende diferentes restos de unión a antígeno, algunos de los cuales están fusionados a una o a la otra de las dos subunidades del dominio Fc, por tanto, las dos subunidades del dominio Fc están comprendidas típicamente en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización dan lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de los anticuerpos biespecíficos de la invención en la producción recombinante, será ventajoso, por tanto, introducir en el dominio Fc de los anticuerpos biespecíficos de la invención una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, en modos de realización particulares, el dominio Fc de los anticuerpos biespecíficos de la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana está en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, en un modo de realización, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un modo de realización específico, dicha modificación es una modificación llamada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001).

En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en un modo de realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de los anticuerpos biespecíficos de la invención se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que se puede colocar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad en el que se puede colocar la protuberancia dentro el dominio CH3 de la primera subunidad.

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

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

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

En un modo de realización alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media en los efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno o más residuos de aminoácido en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc por residuos de aminoácido cargados de modo que la formación de homodímeros se vuelve electrostáticamente desfavorable, pero la heterodimerización es electrostáticamente favorable.

En un modo de realización, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une a FolR1 y a CD3 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores comprende una molécula de inmunoglobulina G (IgG) con dos sitios de unión específicos para FolR1, en la que la parte Fc de la primera cadena pesada comprende un primer módulo de dimerización y la parte Fc de la segunda cadena pesada comprende un segundo módulo de dimerización que permite una heterodimerización de las dos cadenas pesadas de la molécula de IgG.

En otro modo de realización preferente, el primer módulo de dimerización comprende botones y el segundo módulo de dimerización comprende ojales de acuerdo con la estrategia de botones en ojales (véase Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology, volumen 2, número 1, febrero de 1996, pág. 73-73(1)).

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

Un experto en la técnica puede apreciar la eficacia ventajosa de una molécula que distingue selectivamente entre células cancerosas y células sanas no cancerosas. Una forma de lograr este objetivo es mediante selección de dianas adecuadas. Se pueden emplear marcadores expresados exclusivamente en células tumorales para dirigir selectivamente moléculas o células efectoras a células tumorales, evitando al mismo tiempo las células normales que no expresan dicho marcador. Sin embargo, en algunos casos, los denominados marcadores de células tumorales también se expresan en tejido normal, aunque a niveles menores. Esta expresión en tejido normal plantea la posibilidad de toxicidad. Por tanto, existía una necesidad en la técnica de moléculas que se pudieran dirigir de forma más selectiva a células tumorales. La invención descrita en el presente documento proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que se dirigen selectivamente a células tumorales que expresan FolR1 y no a células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o no lo expresan en absoluto. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende al menos dos, preferentemente dos, restos de unión a FolR1 de afinidad relativamente baja que confieren un efecto de avidéz que permite la diferenciación entre células con expresión de FolR1 alta y baja. Debido a que las células tumorales expresan FolR1 a niveles altos o intermedios, este modo de realización de la invención se une selectivamente a y/o induce la destrucción de células tumorales y no de células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o no lo hacen en absoluto. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T está en el formato 2+1 invertido. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la destrucción mediada por linfocitos T de las células tumorales positivas para FolR1 y no de las células no tumorales y comprende un resto de unión al antígeno CD3 que comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33, y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y dos restos de unión al antígeno FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 50, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 52, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 53, y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 54.

En un modo de realización específico, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no induce la destrucción de células normales que tienen menos de aproximadamente 1000 copias de FolR1 en su superficie.

Además de las características ventajosas anteriores, un modo de realización de la invención no requiere que se produzca entrecruzamiento químico o un enfoque híbrido. En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se puede producir en células

CHO. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende polipéptidos humanizados y humanos. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T no causa entrecruzamiento de FcγR. En un modo de realización de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede producir en las células CHO y comprende un resto de unión al antígeno CD3 que comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33, y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y dos restos de unión al antígeno FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 50, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 52, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 53, y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 54.

Como se indica anteriormente, algunos modos de realización contemplados en el presente documento incluyen moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que tienen dos restos de unión que confieren unión específica a FolR1 y un resto de unión que confiere especificidad para el antígeno activador de linfocitos T CD3, en la que cada resto de unión a FolR1 individual se acopla al antígeno con baja afinidad. Dado que la molécula comprende dos restos de unión a antígeno que confieren unión a FolR1, la avidéz global de la molécula, no obstante, proporciona una unión eficaz a células diana que expresan FolR1 y una activación eficaz de linfocitos T para inducir la función efectora de los linfocitos T. Teniendo en cuenta que, aunque FolR1 se expresa a niveles diversos en células tumorales, también se expresa a niveles muy bajos (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 copias en la superficie celular) en determinadas células normales, un experto en la técnica puede reconocer fácilmente la eficacia ventajosa de dicha molécula para su uso como agente terapéutico. Dicha molécula se dirige selectivamente más a células tumorales que a células normales. Por tanto, dicha molécula se puede administrar a un individuo que necesite la misma con una preocupación significativamente menor por la toxicidad resultante de células normales que expresan FolR1 en comparación con las moléculas que se unen a FolR1 con alta afinidad para inducir la función efectora.

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

Como se describe anteriormente, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T contempladas en el presente documento pueden inducir función efectora de los linfocitos T, por ejemplo, expresión de marcadores de superficie celular, producción de citocinas, destrucción mediada por linfocitos T. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la destrucción mediada por linfocitos T de la célula diana que expresa FolR1, tal como una célula tumoral humana, *in vitro*. En un modo de realización, el linfocito T es un linfocito T CD8 positivo. Los ejemplos de células tumorales humanas que expresan FolR1 incluyen, pero no se limitan a, células Hela, Skov-3, HT-29 y HRCEpiC. Otras células cancerosas humanas que expresan FolR1 que se pueden usar para pruebas *in vitro* están fácilmente disponibles para el experto en la técnica. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la destrucción mediada por linfocitos T de la célula tumoral humana que expresa FolR1 *in vitro* con una CE50 de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 39573 pM después de 24 horas. Se contemplan específicamente moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que inducen la destrucción mediada por linfocitos T de la célula tumoral que expresa FolR1 *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 36 pM después de 24 horas. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T induce la destrucción mediada por linfocitos T de la célula tumoral que expresa FolR1 *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 178,4 pM después de 24 horas. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora

de linfocitos T induce la destrucción mediada por linfocitos T de la célula tumoral que expresa FolR1 *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 134,5 pM o mayor después de 48 horas. La CE50 se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procedimientos descritos en el presente documento por los ejemplos.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de cualquiera de los modos de realización anteriores induce la regulación por incremento de la expresión en la superficie celular de al menos uno de CD25 y CD69 en el linfocito T, medida por citometría de flujo. En un modo de realización, el linfocito T es un linfocito T CD4 positivo o un linfocito T CD8 positivo.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de cualquiera de los modos de realización anteriores se une a FolR1 que se expresa en una célula tumoral humana. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de cualquiera de los modos de realización anteriores se une a un epítipo conformacional de FolR1 humano. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de cualquiera de los modos de realización anteriores no se une al receptor de folato 2 (FolR2) humano ni al receptor de folato 3 (FolR3) humano. En un modo de realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de cualquiera de los modos de realización anteriores, el resto de unión a antígeno se une a un polipéptido de FolR1 que comprende los aminoácidos 25 a 234 de FolR1 humano (SEQ ID NO: 227). En un modo de realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de cualquiera de los modos de realización anteriores, el resto de unión a antígeno FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 227, 230 y 231, y en la que el resto de unión a antígeno FolR1 no se une a un polipéptido de FolR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 228 y 229. En un modo de realización específico, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un resto de unión al antígeno FolR1 que se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 227, 230 y 231, y en la que el resto de unión al antígeno FolR1 no se une a un polipéptido de FolR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 228 y 229, y comprende un resto de unión al antígeno CD3 que comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 37, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 39, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34 y dos restos de unión al antígeno FolR1 que cada uno comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 50, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 52, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 53 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 54.

Con respecto al FolR1, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T contempladas en el presente documento pueden tener un efecto agonista, antagonista o neutro. Los ejemplos de efecto agonista incluyen inducción o potenciación de la señalización a través de FolR1 tras el acoplamiento del resto de unión a FolR1 con el receptor FolR1 en la célula diana. Los ejemplos de actividad antagonista incluyen anulación o reducción de la señalización a través de FolR1 tras el acoplamiento del resto de unión a FolR1 con el receptor FolR1 en la célula diana. Esto se puede producir, por ejemplo, al bloquear o reducir la interacción entre folato y FolR1.

Antagonistas de la unión aleje de PD-1 ejemplares para su uso en la invención

En el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y un antagonista de la unión al eje de PD-1. Por ejemplo, un antagonista de la unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de la unión a PD-1, un antagonista de la unión a PDL1 y un antagonista de la unión a PDL2. Los nombres alternativos para "PD-1" incluyen CD279 y SLEB2. Los nombres alternativos para "PDL1" incluyen B7-H1, B7-4, CD274 y B7-H. Los nombres alternativos para "PDL2" incluyen B7-DC, Btdc y CD273. En algunos modos de realización, PD-1, PDL1 y PDL2 son PD-1, PDL1 y PDL2 humanos.

En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión ligados. En un aspecto específico, los compañeros de unión ligados de PD-1 son PDL1 y/o PDL2. En otro modo de realización, un antagonista de la unión a PDL1 es una molécula que inhibe la unión de PDL1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, los compañeros de unión de PDL1 son PD-1 y/o B7-1. En otro modo de realización, el antagonista de la unión a PDL2 es una molécula que inhibe la unión de PDL2 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, un compañero de unión a PDL2 es PD-1. El antagonista puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión u oligopéptido. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico). En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab y CT-011. En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es una inmunoadhesina (por ejemplo, una inmunoadhesina que comprende una parte extracelular o de unión a PD-1 de PDL1 o PDL2 fusionada a una región constante (por ejemplo, una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es AMP-224. Nivolumab, también conocido como MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 y OPDIVO®, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2006/121168.

Pembrolizumab, también conocido como MK-3475, Merck 3475, lambrolizumab, KEYTRUDA® y SCH-900475, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/114335. CT-011, también conocido como hBAT o hBAT-1, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/101611. AMP-224, también conocido como B7-DCIg, es un receptor soluble de fusión de PDL2-Fc descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342.

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (número de registro de CAS: 946414-94-4). Todavía en otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PD-1 aislado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 274 y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 275. Todavía en otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PD-1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y/o una de la cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGFTFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWY
 DGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SLGK (SEQ ID NO: 274), o

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 275).

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab (número de registro de CAS: 1374853-91-4). Todavía en otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PD-1 aislado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 276 y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 277. Todavía en otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PD-1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y/o una de la cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:

QVQLVQSGVE
 VKKPGASVKVSCKASGYTET NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF
 NEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRDYRFDMGFYW
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVS

WNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGKTKTYTCNVDPHKPS
 NTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTSKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 276), o

5 (b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA
 YLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKR
 TVAAPSVEFIPPSDEQLKSGTASVVCCLINNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV

10 TEQDSKDSYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO: 277).

15 En algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PDL1 es un anticuerpo anti-PDL1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión anti-PDL1 se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PDL1 descrito en el documento WO2007/005874. El anticuerpo YW243.55.S70 (secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera mostradas en las SEQ ID NO: 20 y 21, respectivamente) es un anti-PDL1 descrito en el documento WO 2010/077634 A1. MEDI4736 es un anticuerpo anti-PDL1 descrito en los documentos WO2011/066389 y US2013/034559, cada uno incorporado en el presente documento por referencia como se expone en su totalidad.

20 Los ejemplos de anticuerpos anti-PDL1 útiles para los procedimientos de la presente invención y los procedimientos para preparar los mismos se describen en la solicitud de patente PCT WO 2010/077634 A1 y en la patente de EE. UU. n.º 8.217.149, cada una incorporada en el presente documento por referencia como se expone en su totalidad.

25 En algunos modos de realización, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es un anticuerpo anti-PDL1. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 puede inhibir la unión entre PDL1 y PD-1 y/o entre PDL1 y B7-1. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un anticuerpo humanizado. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es un anticuerpo humano.

30 Los anticuerpos anti-PDL1 útiles en la presente invención, incluyendo composiciones que contienen dichos anticuerpos, tales como las descritas en el documento WO 2010/077634 A1, se pueden usar en combinación con una molécula de unión a antígeno activadora de linfocitos T y, opcionalmente, un anticuerpo antagonista anti-TIM3 para tratar el cáncer. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 382 y la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 383.

40 En un modo de realización, el anticuerpo anti-PDL1 contiene un polipéptido de región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en el que:

(a) la secuencia de HVR-H1 es **GFTESXISWIH** (SEQ ID NO: 283);

45 (b) la secuencia de HVR-H2 es **AWIK2PYGGXSX3YYADSVKG** (SEQ ID NO: 284);

(c) la secuencia de HVR-H3 es **RHWPGGFDY** (SEQ ID NO: 285);

en la que además: X1 es D o G; X2 es S o L; X3 es T o S.

50 En un aspecto específico, X1 es D; X2 es S y X3 es T. En otro aspecto, el polipéptido comprende además secuencias estructurales de la cadena pesada de región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula:

(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVRH3)-(HC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales son la secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

5 HC-FR1 es **EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS** (SEQ ID NO: 295)

HC-FR2 es **WVRQAPGKGLEWV** (SEQ ID NO: 296)

10 HC-FR3 es **RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR** (SEQ ID NO: 297)

HC-FR4 es **WGQGLVTVSA** (SEQ ID NO: 298).

15 Todavía en otro aspecto, el polipéptido de cadena pesada se combina además con una cadena ligera de la región variable que comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en la que:

(a) la secuencia de HVR-L1 es **RASQX4X5X6TX7X8A** (SEQ ID NO: 286);

20 (b) la secuencia de HVR-L2 es **SASX9LX10S** (SEQ ID NO: 287);

(c) la secuencia de HVR-L3 es **QQX11X12X13X14PX15T** (SEQ ID NO: 288);

25 en la que además: X4 es D o V; X5 es V o I; X6 es S o N; X7 es A o F; X8 es V o L; X9 es F o T; X10 es Y o A; X11 es Y, G, F, o S; X12 es L, Y, F o W; X13 es Y, N, A, T, G, F o I; X14 es H, V, P, T o I; X15 es A, W, R, P o T.

Todavía en otro aspecto, X4 es D; X5 es V; X6 es S; X7 es A; X8 es V; X9 es F; X10 es Y; X11 es Y; X12 es L; X13 es Y; X14 es H; X15 es A. Todavía en otro aspecto, la cadena ligera comprende además secuencias estructurales de la cadena ligera de la región variable yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-F1)-(LC-FR2)-(HVR-F2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LCFR4).

30 Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales son una estructura consenso de VL kappa I. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

35 LC-FR1 es **DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC** (SEQ ID NO: 300)

LC-FR2 es **WYQQKPGKAPKLLIY** (SEQ ID NO: 301)

40 LC-FR3 es **GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC** (SEQ ID NO: 302)

LC-FR4 es **FGQGTKVEIKR** (SEQ ID NO: 303).

45 En otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado o un fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(a) la cadena pesada comprende una HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en el que además:

(i) la secuencia de HVR-H1 es **GFTFSX1SWIH** (SEQ ID NO: 283)

50 (ii) la secuencia de HVR-H2 es **AWIX2PYGGSX3YYADSVKG** (SEQ ID NO: 284)

(iii) la secuencia de HVR-H3 es **RHWPGGFDY** (SEQ ID NO: 285)

(b) la cadena ligera comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en la que además:

55 (i) la secuencia de HVR-L1 es **RASQX4X5X6TX7X8A** (SEQ ID NO: 286)

(ii) la secuencia de HVR-L2 es **SASX9LX10S** (SEQ ID NO: 287)

60 (iii) la secuencia de HVR-L3 es **QQX11X12X13X14PX15T** (SEQ ID NO: 288)

en la que además: X1 es D o G; X2 es S o L; X3 es T o S; X4 es D o V; X5 es V o I; X6 es S o N; X7 es A o F; X8 es

ES 2 984 937 T3

V o L; X9 es F o T; X10 es Y o A; X11 es Y, G, F, o S; X12 es L, Y, F o W; X13 es Y, N, A, T, G, F o I; X14 es H, V, P, T o I; X15 es A, W, R, P o T.

5 En un aspecto específico, X1 es D; X2 es S y X3 es T. En otro aspecto, X4 es D; X5 es V; X6 es S; X7 es A; X8 es V; X9 es F; X10 es Y; X11 es Y; X12 es F; X13 es Y; X14 es H; X15 es A. Aún en otro aspecto, X1 es D; X2 es S y X3 es T, X4 es D; X5 es V; X6 es S; X7 es A; X8 es V; X9 es F; X10 es Y; X11 es Y; X12 es L; X13 es Y; X14 es H y X15 es A.

10 En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HCFR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 295)

20 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 296)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 297)

25 HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 298).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de VL kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

30 LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEQ ID NO: 300)

LC-FR2 WYQQKPKAPKLLIY (SEQ ID NO: 301)

35 LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 302)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 303).

40 Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. En otro modo de realización más, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

45 Aún en otro modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

50 (a) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 289), AWISFPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 290) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 291), respectivamente, o

55 (b) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 292), SASELYS (SEQ ID NO: 293) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 294), respectivamente. En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HCFR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las

secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

5 HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 295)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 296)

10 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 297)

HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 298).

15 Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de VL kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

20 LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC (SEQ ID NO: 300)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 301)

LC-FR3 GVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 302)

25 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 303).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. En otro modo de realización más, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

35 Todavía en otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

40 (a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
 PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF
 DYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 382), o

45 (b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
 SASFLYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDEATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEI KR
 (SEQ ID NO: 383).

50 En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HCFR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat.

ES 2 984 937 T3

Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

5 HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 295)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 296)

10 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 297)

HC-FR4 WGQGTLYTVSA (SEQ ID NO: 298).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de VL kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

15 LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 300)

20 LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 301)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGIDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 302)

25 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 303).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de la producción en células procariotas. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. En otro modo de realización más, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

35 Aún en otro modo de realización adicional, se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

40 (a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWV
AWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHW
PGGFYWGQGTLYTVSS (SEQ ID NO: 280), o

45 (b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
SASFLYSGVPSRFSGSGSGIDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATIFGQGTKVEI
KR (SEQ ID NO: 383).

50 Todavía en otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

55 (a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPY
GGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFY
WGQGTLYTVSSASTK. (SEQ ID NO: 281), o

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASF
 5 LYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR
 (SEQ ID NO: 282).

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 295)
 20 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 296)
 HC-FR3 RFTISADISKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 297)
 25 HC-FR4 WGQGITLVTVSS (SEQ ID NO: 299).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una secuencia estructural consenso de VL kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 300)
 LC-FR2 WYQQKPKGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 301)
 35 LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 302)
 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 303).

40 Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de la producción en células procariotas. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. En otro modo de realización más, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

50 Aún en otro modo de realización, el anticuerpo anti-PDL1 es MPDL3280A (número de registro de CAS: 1422185-06-5). Todavía en otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 28 y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 21. Todavía en otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y/o una de la cadena ligera, en el que:

60 (a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIIIWVRQAPGKGLEWVAVWISPY
 GGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
 PKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 278), o

5

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLY
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 279).

10

Todavía en otro modo de realización, la invención proporciona composiciones que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-PDL1 descritos anteriormente en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

Todavía en otro modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de la región variable de la cadena ligera o una de la cadena pesada de un anticuerpo anti-PDL1, en el que:

20

(a) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y una HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIIH (SEQ ID NO: 289), AWISPYGGSTYYADSVK (SEQ ID NO: 290) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 291), respectivamente, y

25

(b) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 292), SASFLYS (SEQ ID NO: 293) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 294), respectivamente. En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En un aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una secuencia estructural consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de cadena pesada es la siguiente:

30

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 295)

40

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 296)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 297)

HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 298).

45

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, III o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una

secuencia estructural consenso de VL kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1 **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC** (SEQ ID NO: 300)

5

LC-FR2 **WYQQKPGKAPKLLIY** (SEQ ID NO: 301)

LC-FR3 **GVPSRFSGSGSGIDFTLTSSLPEDFATYYC** (SEQ ID NO: 302)

10 LC-FR4 **FGQGTKVEIKR** (SEQ ID NO: 303).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo descrito en el presente documento (tal como un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PDL1 o un anticuerpo anti-PDL2) comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de la producción en células procariontas. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. Todavía en otro aspecto, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

15

20

Todavía en otro aspecto, en el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el ácido nucleico comprende además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PDL1, anti-PD-1 o anti-PDL2 descritos previamente. Todavía en otro aspecto específico, el vector comprende además una célula huésped adecuada para la expresión del ácido nucleico. Todavía en otro aspecto específico, la célula huésped es una célula eucariota o una célula procarionta. Todavía en otro aspecto específico, la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como de ovario de hámster chino (CHO).

25

30

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede preparar usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende cultivar una célula huésped que contiene ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PDL1, anti-PD-1 o anti-PDL2 o fragmento de unión a antígeno descritos previamente en una forma adecuada para la expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.

35

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 aislado no está glucosilado.

La glucosilación de anticuerpos es típicamente unida a N o bien unida a O. Unida a N se refiere al acoplamiento del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. Glucosilación unida a O hace referencia al acoplamiento de uno de los carbohidratos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La eliminación de sitios de glucosilación para formar un anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se elimine una de las secuencias de tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unida a N). La alteración se puede realizar por sustitución de un residuo de asparagina, serina o treonina dentro del sitio de glucosilación por otro residuo de aminoácido (por ejemplo, glicina, alanina o una sustitución conservadora).

40

45

50

En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, el anticuerpo anti-PDL1 aislado se puede unir a un PDL1 humano, por ejemplo, un PDL1 humano como se muestra en el n.º de acceso a UniProtKB/Swiss-Prot Q9NZQ7.1, o una variante del mismo.

55

Todavía en otro modo de realización, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-PDL1, uno anti-PD-1 o uno anti-PDL2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se proporciona en el presente documento y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1, anti-PD-1 o anti-PDL2 o el fragmento de unión a antígeno del mismo administrado al individuo es una composición que comprende uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

60

Se puede usar cualquiera de los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 descrito en el presente documento está en una formulación que comprende el anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 60 mg/ml, acetato de histidina en una concentración de aproximadamente 20 mM, sacarosa en una concentración de aproximadamente 120 mM y polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20) en una concentración del 0,04 % (p/v), y la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,8. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PDL1 descrito en el presente documento está en una formulación que comprende el anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 125 mg/ml, acetato de histidina en una concentración de aproximadamente 20 mM, la sacarosa está en una concentración de aproximadamente 240 mM y polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20) en una concentración del 0,02 % (p/v), y la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,5.

Antagonistas de TIM3 ejemplares para su uso en la invención

En el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, un antagonista de la unión al eje de PD-1 y un antagonista de TIM3. En un modo de realización, el antagonista de TIM3 es un anticuerpo anti-TIM3. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-TIM3 induce la internalización de TIM3 expresada en una célula de al menos el 45 % después de 120 minutos a 37 °C, según se determina mediante análisis de FACS. La célula es, por ejemplo, una célula RPMI8226 (ATCC® CCL-155™). En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 en células RPMI8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™) de al menos el 55 % después de 120 minutos a 37 °C, según se determina mediante análisis de FACS. En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 en células RPMI8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™) de al menos el 60 % después de 240 minutos a 37 °C, según se determina mediante análisis de FACS. En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 en células RPMI8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™) de al menos el 65 % después de 240 minutos a 37 °C, según se determina mediante análisis de FACS.

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-TIM3 compite por la unión a TIM3 con un anticuerpo anti-TIM3 que comprende el VH y VL de Tim3_0016. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-TIM3 se une a una TIM3 humana y de macaco cangrejero. En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-TIM3 muestra como inmunoconjugado una actividad citotóxica en células que expresan TIM3. En un modo de realización de este tipo, el inmunoconjugado tiene un valor relativo de CI50 de la actividad citotóxica como conjugado de exotoxina A de *Pseudomonas* en células RPMI-8226 de 0,1 o menor. En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 induce la liberación de interferón-gamma según se determina mediante un ensayo de RLM.

En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-TIM3 se une a una TIM3 humana y de macaco cangrejero e induce la liberación de interferón-gamma según se determina mediante un ensayo de RLM.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 306; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 307; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 315; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 306; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 307; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 315; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 306; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 307; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 306; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305; (c)

HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 306; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 315; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

5 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 306; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 307; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 315; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

15 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 306; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 307; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 315; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

25 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 306; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 307; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

30 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 306; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 314; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

40 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 304, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 305 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 306; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 315; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 308 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 309.

45 En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 310 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 311;
- ii) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 312 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 313;
- 50 iii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i) o ii).

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 316; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 317; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 318; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 319; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 320; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 321.

60 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 316; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 317; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 318; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 319; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 320; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 321.

65 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 316, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 317, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 318; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 319, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 320, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 321.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 316, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 317 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 318; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 319; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 320 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 321.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 322 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 323;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 324; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 325; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 326; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 327; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 328; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 329.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 324; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 325; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 326; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 327; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 328; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 329.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 324, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 325, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 326; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 327, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 328, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 329.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 324, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 325 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 326; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 327; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 328 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 329.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 330 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 331;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 332; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 333; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 334; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 335; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 336; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 337.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 332; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 333; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 334; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 335; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 336; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 337.

5 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 332, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 333, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 334; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 335, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 336, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 337.

10 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 332, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 333 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 334; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 335; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 336 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 337.

15 En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- 20 i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 338 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 339;
- ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

25 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 340; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 342; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 343; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 344; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 345.

30 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 340; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 342; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 343; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 344; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 345.

35 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 340, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 342; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 343, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 344, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 345.

45 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 340, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 341 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 342; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 343; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 344 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 345.

50 En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 346 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 347;
- 55 ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

60 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 348; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 349; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 350; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 352; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 353.

65 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 348; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 349; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 350; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 352; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 353.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 348, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 349, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 350; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 352, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 353.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 348, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 349 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 350; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 351; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 352 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 353.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 354 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 355;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 356; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 359; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 360; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 361.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 356; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 358; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 359; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 360; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 361.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 356, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 358; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 359, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 360, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 361.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 356, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 357 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 358; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 359; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 360 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 361.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 362 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 363;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 364; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 365; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 366; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 367; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 368; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 369.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 364; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 365; (c)

HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 366; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 367; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 368; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 369.

5 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 364, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 365, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 366; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 367, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 368, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 369.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 364, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 365 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 366; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 367; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 368 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 369.

20 En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 370 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 371;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

25 En cualquiera de los modos de realización anteriores, un anticuerpo anti-TIM3 es humanizado. En un modo de realización, un anticuerpo anti-TIM3 comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además una región estructural humana aceptadora, por ejemplo, una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana. En otro modo de realización, un anticuerpo anti-TIM3 comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además un VH y VL que comprenden dichas HVR. En otro aspecto, el anticuerpo anti-TIM3 se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-TIM3 proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en determinados modos de realización, un anticuerpo anti-TIM3 se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 310 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 311, o un anticuerpo anti-TIM3 se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 312 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 313, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 322 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 323, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 330 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 331, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 338 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 339, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 346 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 347, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 354 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 355, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 362 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 363, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 370 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 371. En un modo de realización preferente se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 310 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 311.

50 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 compite por la unión a TIM3 humana con el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 310 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 311 como se determina en un ensayo de competencia usando células RPMI-8226 (ATCC® CCL-155™) que expresan TIM3.

55 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un modo de realización, un anticuerpo anti-TIM3 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

60 En otro aspecto, un anticuerpo anti-TIM3 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describe en el presente documento.

65 En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 es cualquiera de los anticuerpos descritos en los documentos WO 2011/155607, WO 2013/006490, WO 03/063792, WO 2009/097394 o WO 2011/159877. En un modo de realización,

el anticuerpo anti-TIM3 es F38-2E2. En algunos modos de realización, los anticuerpos anti-TIM3 son anticuerpos de los hibridomas 8B.2C12 y 25F.1D6 y se preparan como se divulga en las solicitudes de patente de EE. UU. n.º: 2004/0005322 y 2005/0191721, Sabatos, C.A. *et al.*, Nature Immunol. 4:1102-1110, 2003 y Sánchez-Fueyo, A. *et al.*, Nature Immunol. 4:1093-101 2003, de los que todos se incorporan por el presente documento por referencia como se expone en su totalidad. Se contemplan específicamente otros anticuerpos contra TIM3 y se pueden producir, por ejemplo, con los procedimientos divulgados en el presente documento. Las secuencias de nucleótidos y proteínas de las secuencias humanas de TIM3 se pueden encontrar en el número de acceso Genbank AF251707.1 y el número de acceso Uniprot Q8TDQ0. Una secuencia de aminoácidos de TIM3 humana ejemplar se expone en SEQ ID NO: 380; una secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de TIM3 humana ejemplar se expone en SEQ ID NO: 381.

Preparación de anticuerpos

Como se describe anteriormente, en algunos modos de realización, el antagonista de la unión a PD-1 es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PDL1 o un anticuerpo anti-PDL2). En algunos modos de realización, el antagonista de TIM3 es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-TIM3). Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden preparar usando técnicas disponibles en la técnica para generar anticuerpos, cuyos procedimientos ejemplares se describen con más detalle en las siguientes secciones.

El anticuerpo está dirigido contra un antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo se puede dirigir contra PD-1 (tal como PD-1 humano), PDL1 (tal como PDL1 humano), PDL2 (tal como PDL2 humano), una TIM3 (tal como TIM3 humana). Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en dicho mamífero.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento tiene una constante de disociación (K_d) de 1 μ M, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM o 0,001 nM (por ejemplo, 10-8 M o menos, por ejemplo, de 10-8 M a 10-13 M, por ejemplo, de 10-9 M a 10-13 M).

En un modo de realización, se mide la K_d mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno se mide equilibrando los Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (125I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando a continuación el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 μ g/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) con carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla antígeno marcado con [125I] 100 pM o 26 pM con diluciones sucesivas de un Fab de interés. A continuación, se incuba el Fab de interés durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se hayan secado, se añaden 150 μ l/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual a un 20 % de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro modo de realización, la K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un dispositivo BIACORE®-2000 o uno BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 μ g/ml (~0,2 μ M) antes de su inyección a un caudal de 5 μ l/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones sucesivas 1:2 de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 μ l/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_d) como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera 10⁶ M⁻¹s⁻¹ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo (forma Fab) anti-antígeno 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

En algunos modos de realización, un anticuerpo anti-TIM3 como se describe en el presente documento presenta una afinidad de unión de al menos 100 pM o menos contra TIM3 humana, una afinidad de unión de al menos 300 pM o menos contra TIM3 humana, una afinidad de unión de al menos 400 pM o menos contra TIM3 humana, una capacidad neutralizante de al menos 40 nM o menos contra TIM3 humana, una capacidad neutralizante de al menos 120 nM o menos contra TIM3 humana, y una capacidad neutralizante de al menos 31 nM o menos contra TIM3 humana. En estos modos de realización, la afinidad de unión se puede medir mediante resonancia de plasmón superficial como se describe en la patente de EE. UU. n.º 8.771.697.

10 **Fragmentos de anticuerpo**

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pág. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185 y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítopos de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

15 **Anticuerpos quiméricos y humanizados**

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y en Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en humanos, mientras conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunos modos de realización se sustituyen algunos residuos de FR de un anticuerpo humanizado por los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo. Los anticuerpos humanizados y los procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (α-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" al reordenamiento de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véanse, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-

22618 (1996)).

Anticuerpos humanos

- 5 En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).
- 10 Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para que produzca anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica. Dichos animales contienen típicamente todos o una parte de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena en general se han inactivado. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HuMAB®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar además, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente. También se pueden preparar anticuerpos humanos por procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véanse, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147:86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridomas) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humanos). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005). También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano. Dichas secuencias de dominio variable se pueden combinar a continuación con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

Anticuerpos derivados de colecciones

- 40 Se pueden aislar anticuerpos cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos es conocida en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).
- 50 En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos que, a continuación, se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y no propios sin ninguna inmunización, como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos del gen V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos-anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o

fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

Anticuerpos multiespecíficos

5 En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En el presente documento se describen ejemplos de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T específicas para FolR1 y CD3. En algunos modos de realización, el antagonista del componente del eje de PD1 es multiespecífico. Una de las especificidades de unión es por un componente del eje de PD-1 (por ejemplo, PD-1, PDL1 o PDL2) y la otra es por cualquier otro antígeno. En algunos modos de realización, una de las especificidades de unión es por IL-17 o IL-17R y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epitopos diferentes de un componente del eje de PD-1 (por ejemplo, PD-1, PDL1 o PDL2), IL-17 o IL-17R. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

En algunos modos de realización, una de las especificidades de unión es por un componente del eje de PD-1 (por ejemplo, PD-1, PDL1 o PDL2) y la otra es por IL-17 o IL-17R. En el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo multiespecífico, en los que el anticuerpo multiespecífico comprende una primera especificidad de unión por un componente del eje de PD-1 (por ejemplo, PD-1, PDL1 o PDL2) y una segunda especificidad de unión por IL-17 o IL-17R. En algunos modos de realización, se puede preparar un anticuerpo multiespecífico mediante cualquiera de las técnicas descritas en el presente documento y a continuación.

25 Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305:537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655 (1991)), y la genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas en Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros en Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al. J. Immunol.* 147:60 (1991). En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1). El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "FAb de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un componente del eje de PD-1 (por ejemplo, PD-1, PDL1 o PDL2), IL-17 o IL-17R, así como otro antígeno diferente (véase el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

C. Secuencias de ácido nucleico, vectores y procedimientos de producción

45 Se pueden usar polinucleótidos que codifican una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un primer sitio de unión a antígeno específico para el receptor de folato 1 (FolR1) y un segundo sitio de unión a antígeno específico para CD3, y anticuerpos para la producción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y los anticuerpos descritos en el presente documento. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y los anticuerpos de la invención se pueden expresar como un único polinucleótido que codifica toda la molécula de unión a antígeno biespecífica o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T funcional y un anticuerpo. Por ejemplo, la parte de la cadena ligera de un fragmento Fab se puede codificar por un polinucleótido separado de la parte del anticuerpo biespecífico o el anticuerpo que se une a FolR1 que comprende la parte de la cadena pesada del fragmento Fab, una subunidad del dominio Fc y opcionalmente (parte de) otro fragmento Fab. Cuando se coexpresen, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena ligera para formar el fragmento Fab. En otro ejemplo, la parte de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o la parte de unión a antígeno para FolR1 proporcionada en el mismo que comprende una de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) uno o más fragmentos Fab se podría codificar por un polinucleótido separado de la parte del anticuerpo biespecífico o el anticuerpo que se une a FolR1 proporcionado en el mismo que comprende la otra de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) un fragmento Fab. Cuando se coexpresen, las subunidades del dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

65 En determinados modos de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros modos de realización, un

polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

D. Variantes de anticuerpo

5 En determinados modos de realización se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T específica para FolR1 y CD3 proporcionada en el presente documento y los anticuerpos, además de las descritas anteriormente. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. Se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o el anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

1. Variantes de sustitución, inserción y deleción

20 En determinados modos de realización, se proporcionan variantes que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla B bajo el encabezamiento "sustituciones conservadoras". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla B bajo el encabezamiento "sustituciones ejemplares" y, como se describe además a continuación, en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, conservación/mejora de unión a antígeno, disminución en inmunogenicidad, o mejora en ADCC o CDC.

TABLA B

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

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

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

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

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

5 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

10

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, la afinidad de unión).

15

20

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de anticuerpos. Se pueden realizar dichas alteraciones en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o en las SDR (las a-CDR), sometiéndolo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar su afinidad de unión. La maduración de la afinidad mediante construcción y reelección de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunos modos de realización de la maduración de la afinidad se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. A menudo se seleccionan como diana, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

25

30

35

En determinados modos de realización se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, en las HVR se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de la HVR o las SDR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones aminoacídicas.

40

45

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

50

55

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácido individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incremente la semivida en suero del anticuerpo.

60

2. Variantes de glucosilación

65

En determinados modos de realización se altera una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el

anticuerpo se glucosila. La adición o delección de sitios de glucosilación en un anticuerpo se puede lograr convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o se eliminen uno o más sitios de glucosilación.

5 Cuando la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o el anticuerpo usado con la invención comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que se une, en general, por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo biespecifico o un anticuerpo que se une a DR5 de la invención para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

15 En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpos biespecificos o variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser desde un 1 % hasta un 80 %, desde un 1 % hasta un 65 %, desde un 5 % hasta un 65 % o desde un 20 % hasta un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, con relación a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 de la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, la Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "deficitario en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.*, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la publicación de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con genes inactivados, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con genes inactivados (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

40 Las variantes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y las variantes del anticuerpo se proporcionan además con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une a FolR1 está bisectado por GlcNAc. Dichas variantes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T pueden tener una fucosilación reducida y/o una función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

3. Variantes de anticuerpo genomanipuladas con cisteína

55 En determinados modos de realización, puede ser deseable crear la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y los anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, THIOMABS, en los que uno o más residuos de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se sustituyen por residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. Al sustituir esos residuos por cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan, de este modo, en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunocóncugado. En determinados modos de realización, uno cualquiera o más de los siguientes residuos se pueden sustituir por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

65

E. Procedimientos y composiciones recombinantes

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y los anticuerpos de la invención se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis de péptidos en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o los anticuerpos (o fragmentos), por ejemplo, como se describe anteriormente, se aíslan o insertan en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. En un modo de realización se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o un anticuerpo junto con señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que el polinucleótido que codifica la molécula (fragmento) de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o un anticuerpo (fragmento) (es decir, la región codificante) se clona en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es un fragmento de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, si está presente; sin embargo, cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosoma, finalizadores de la transcripción, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares, no forma parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una única construcción de polinucleótidos, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones de polinucleótidos separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan de forma postraduccional o cotraduccional en las proteínas finales por medio de escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterógenas, fusionadas o bien no fusionadas a un polinucleótido que codifica la molécula (fragmento) de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o un anticuerpo, o variante o derivado de los mismos. Las regiones codificantes heterógenas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterógeno. Una asociación funcional es cuando una región codificante de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal forma que sitúa la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) se "asocian de forma funcional" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión de dirigir la expresión del producto génico ni interfiere con la capacidad del molde de ADN de transcribirse. Por tanto, una región promotora se asociaría de forma funcional con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor puede efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas.

Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, se pueden asociar de forma funcional con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. En el presente documento se divulgan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitarse a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, conjuntamente con intrón-A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y α -globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De forma similar, los expertos en la técnica conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión a ribosoma, codones de iniciación y terminación de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (en particular un sitio de entrada a ribosoma interno o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otros rasgos característicos tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas o repeticiones terminales invertidas (ITR) víricas adenoasociadas (AAV).

Se pueden asociar regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o el anticuerpo, se puede disponer el ADN que codifica una

secuencia señal en dirección 5' del ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico de la invención o el anticuerpo que se une a DR5 de la invención o un fragmento del mismo. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica saben que los polipéptidos secretados por células de vertebrado en general tienen un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinados modos de realización se usa el péptido señal natural, por ejemplo, un péptido señal de la cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está funcionalmente asociado con él. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterógeno o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder natural se puede sustituir por la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón.

El ADN que codifica una secuencia proteínica corta que se podría usar para facilitar la posterior purificación (por ejemplo, una marca de histidina) o ayudar a marcar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede incluir dentro de o en los extremos del polinucleótido que codifica la molécula (fragmento) de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o el anticuerpo (fragmento).

En otro modo de realización se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinados modos de realización se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en el presente documento en relación con polinucleótidos y vectores, respectivamente. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o un anticuerpo de la invención o una parte de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que se puede genomanipular para generar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T para FolR1 divulgadas en el presente documento, o el anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-TIM3 de la invención o fragmentos de los mismos. Las células huésped adecuadas para replicación y para sustentar la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y los anticuerpos de la invención son bien conocidas en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o traducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y de los anticuerpos para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariontes, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos en bacterias, en particular cuando no se necesita glucosilación. Después de la expresión, se puede aislar el polipéptido a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de procariontes, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006). Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que están adaptadas para el cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J Gen Virol* 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol Reprod* 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)), células MRC-5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO-DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pág. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En un modo de realización, la célula

huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20).

5 Son conocidas en la técnica las tecnologías estándar para expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o bien la ligera de un dominio de unión a antígeno tal como un anticuerpo se pueden genomanipular para que expresen también la otra de las cadenas de anticuerpo de modo que el producto expresado sea un anticuerpo que tiene tanto una cadena pesada como una ligera.

10 Se puede usar cualquier especie de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o región variable animal en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominios de unión a antígeno o regiones variables no limitantes útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, primate o humano. Si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T está destinada al uso en humanos, se puede usar una forma quimérica de anticuerpo en la que las regiones constantes del anticuerpo son de un humano. También se puede preparar una forma humanizada o totalmente humana del anticuerpo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 concedida a Winter). La humanización se puede lograr mediante diversos procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a, (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin conservación de residuos de la región estructural críticos (por ejemplo, los que son importantes para conservar buenas funciones de afinidad de unión a antígeno o de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de la especificidad (SDR o a-CDR; los residuos críticos para la interacción anticuerpo-antígeno) no humanas en regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos completos, pero "enmascararlos" con una sección similar a humana mediante el reemplazo de residuos superficiales. Los anticuerpos humanizados y procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Jones *et al.*, *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri *et al.*, *Methods* 36, 25-34 (2005) (que describen un injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (que describe el "rebornizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36, 43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" al reordenamiento de FR). Se pueden producir anticuerpos humanos y regiones variables humanas usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos preparados por el procedimiento de hibridoma (véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para que produzca anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). También se pueden generar anticuerpos humanos y regiones variables humanas aislando secuencias de regiones variables de clones de Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352, 624-628 (1991)). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab.

50 En determinados modos de realización, los restos de unión a antígeno útiles en la presente invención se genomanipulan para que tengan una afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos divulgados en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132066, de la que se incorpora por el presente documento todo su contenido por referencia. La capacidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención de unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljebblad, *et al.*, *Glyco J17*, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compite con un anticuerpo de referencia por la unión a un antígeno particular, por ejemplo, un anticuerpo que compite con el anticuerpo V9 por la unión a CD3. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) al que se une el anticuerpo de referencia. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competencia ejemplar se incubaba el antígeno inmovilizado (por ejemplo, CD3) en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo, anticuerpo V9, descrito en el documento US 6.054.297) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en

condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba con relación a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

En determinados modos de realización, los restos de unión a antígeno útiles en la presente invención se genomanipulan para que tengan una afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos divulgados en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132066, de la que se incorpora por el presente documento todo su contenido por referencia. La capacidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o el anticuerpo de la invención de unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad, *et al.*, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compita con un anticuerpo de referencia por su unión a un antígeno particular. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) al que se une el anticuerpo de referencia. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competencia ejemplar, se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo por su unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado.

Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba con relación a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y anticuerpos preparados como se describe en el presente documento se pueden purificar por técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación por cromatografía de afinidad se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une el anticuerpo biespecífico o el anticuerpo que se une a DR5. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de los anticuerpos biespecíficos de la invención, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se pueden usar la cromatografía de afinidad con proteína A o G y la cromatografía de exclusión por tamaño secuenciales para aislar un anticuerpo biespecífico esencialmente como se describe en los ejemplos. La pureza del anticuerpo biespecífico o el anticuerpo que se une a DR5 se puede determinar mediante cualquiera de una variedad de procedimientos analíticos bien conocidos que incluyen electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares.

F. Ensayos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, por ejemplo, moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que comprenden un primer sitio de unión a antígeno específico para el receptor de folato 1 (FolR1) y un segundo sitio de unión a antígeno específico para CD3, y anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-PD-1 antagonistas de la unión al eje de PD-1 y anticuerpos antagonistas anti-TIM3 proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de afinidad

La afinidad de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, por ejemplo, moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que comprenden un primer sitio de unión a antígeno específico para el receptor de folato 1 (FolR1) y un segundo sitio de unión a antígeno específico para CD3, y anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-PD-1 antagonistas de la unión al eje de PD-1 y anticuerpos antagonistas anti-TIM3 proporcionados en el presente documento por sus respectivos antígenos, por ejemplo, FolR1, PD-1, PD-L1, TIM3, se pueden determinar de acuerdo con los procedimientos establecidos en los ejemplos mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y

receptores o proteínas diana tales como las que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, la unión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y anticuerpos proporcionados en el mismo para su antígeno respectivo se puede evaluar usando líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo, por citometría de flujo (FACS).

K_D se puede medir por resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C. Para analizar la interacción entre la parte Fc y los receptores de Fc, se captura el receptor de Fc recombinante con marca de His con un anticuerpo anti-Penta His (Qiagen) ("Penta His" divulgado como SEQ ID NO: 392) inmovilizado en chips CM5 y se usan las construcciones biespecíficas como analitos. En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el anticuerpo anti-Penta-His ("Penta His" divulgado como SEQ ID NO: 392) con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, a 40 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para lograr aproximadamente 6500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Posteriormente, se captura el receptor de Fc durante 60 s a 4 o 10 nM. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones sucesivas 1:4 de la construcción biespecífica (intervalo entre 500 nM y 4000 nM) en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de 30 µl/min durante 120 s.

Para determinar la afinidad por el antígeno diana, se capturan las construcciones biespecíficas con un anticuerpo específico anti-Fab humano (GE Healthcare) que se inmoviliza en una superficie de chip sensor CM5 activado como se describe para el anticuerpo anti-Penta-His ("Penta-His" descrito como SEQ ID NO: 392). La cantidad final de proteína acoplada es de aproximadamente 12000 UR. Se capturan las construcciones biespecíficas durante 90 s a 300 nM. Se pasan los antígenos diana a través de las cubetas de lectura durante 180 s a un intervalo de concentración de 250 a 1000 nM con un caudal de 30 µl/min. Se supervisa la disociación durante 180 s.

Se corrigen las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. Se usó la respuesta en situación de equilibrio para derivar la constante de disociación K_D por ajuste no lineal de la curva de la isoterma de unión de Langmuir. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación BIACORE® T100 versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

2. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un primer sitio de unión a antígeno específico para el receptor de folato 1 (FolR1) y un segundo sitio de unión a antígeno específico para CD3, y anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-PD-1 antagonistas de la unión al eje de PD-1 y anticuerpos antagonistas anti-TIM3 de la invención se someten a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, etc.

En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo o fragmento que compite con un anticuerpo de referencia específico por la unión a un antígeno respectivo. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) al que se une un anticuerpo de referencia específico. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se describen otros procedimientos en la sección de ejemplos.

3. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T, por ejemplo, moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que comprenden un primer sitio de unión a antígeno específico para el receptor de folato 1 (FolR1) y un segundo sitio de unión a antígeno específico para CD3 y anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-PD-1 antagonistas de la unión al eje de PD-1 y anticuerpos antagonistas anti-TIM3 proporcionados en el presente documento que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, inducción de la fragmentación del ADN, inducción de la apoptosis y lisis de células seleccionadas. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En determinados modos de realización, se somete a prueba una molécula de unión a antígeno activadora de linfocitos T y un anticuerpo de la invención para determinar dicha actividad biológica. Los ensayos para detectar la lisis (por ejemplo, mediante medición de la liberación de LDH) o la apoptosis (por ejemplo, usando el ensayo de TUNEL) de las células son bien conocidos en la técnica. También se describen ensayos para medir la ADCC o CDC en el documento WO 2004/065540 (véase el ejemplo 1 en el mismo), del que se incorpora por el presente documento todo su contenido por referencia.

G. Formulaciones farmacéuticas

5 Se preparan formulaciones farmacéuticas de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un primer sitio de unión a antígeno específico para el receptor de folato 1 (FolR1) y un segundo sitio de unión a antígeno específico para CD3, y anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-PD-1 antagonistas de la unión al eje de PD-1 y anticuerpos antagonistas anti-TIM3 como se describen en el presente documento mezclando dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T o anticuerpos que tienen el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

30 Se describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y en el documento WO 2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón acetato-histidina.

35 La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

40 Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

45 Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

50 Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son en general estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

H. Procedimientos y composiciones terapéuticas

55 Las combinaciones terapéuticas que comprenden una o más de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T y el anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1 y, opcionalmente, el antagonista de TIM3 proporcionado en el presente documento se pueden usar en procedimientos terapéuticos.

60 En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une al receptor de folato 1 (FolR1) y a CD3 para su uso como medicamento para su uso en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1. En determinados modos de realización, se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une a FolR1 y a CD3 para su uso en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1 para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados modos de realización, la combinación comprende además un antagonista de TIM3, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-TIM3. En determinados modos de realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une a FolR1 y a CD3 y un anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene

cáncer, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une a FolR1 y CD3 y al anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un antagonista de TIM3, por ejemplo, como se describe a continuación. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un humano. En un modo de realización preferente, dicho cáncer es cáncer de páncreas, sarcoma o carcinoma colorrectal. En otros modos de realización, el cáncer es cáncer colorrectal, sarcoma, cánceres de cabeza y cuello, carcinomas de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de pulmón microcítico o mesotelioma. En modos de realización en los que el cáncer es cáncer de mama, el cáncer de mama puede ser cáncer de mama triple negativo.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una combinación terapéutica que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une a FolR1 y a CD3 y un anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1 en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, la combinación comprende además un antagonista de TIM3. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento del cáncer. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer, que comprende administrar a un individuo que tiene cáncer una cantidad eficaz del medicamento. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene cáncer una cantidad eficaz de una combinación terapéutica que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une a FolR1 y a CD3 y un anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación. En un modo de realización de este tipo, el al menos un agente terapéutico adicional es un anticuerpo antagonista anti-TIM3. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un humano. En un modo de realización preferente, dicho cáncer es cáncer de páncreas, sarcoma o carcinoma colorrectal. En otros modos de realización, el cáncer es cáncer colorrectal, sarcoma, cánceres de cabeza y cuello, carcinomas de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de pulmón microcítico o mesotelioma.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que se unen a FolR1 y a CD3 proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores, y un anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que se unen a FolR1 proporcionadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que se unen a FolR1 y a CD3 y un anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1 proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Un anticuerpo biespecífico se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos momentos, administración en embolada e infusión intermitente.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden formular, dosificar y administrar de una forma consecuente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo biespecífico no lo necesita, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo biespecífico dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y evolución de la enfermedad, de si

el anticuerpo biespecífico se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis y respuesta del paciente al anticuerpo biespecífico y del criterio del médico especialista. El anticuerpo biespecífico se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg a 10 mg/kg) del anticuerpo biespecífico o del anticuerpo novedoso que se une a DR5 puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, por ejemplo, ya sea mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se prolongaría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo biespecífico estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg. Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo biespecífico). Se puede administrar una dosis inicial mayor de carga, seguida de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La progresión de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunocombinado de la invención en lugar o además de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se une a FoIR1 y a CD3 y el anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1 y, opcionalmente, el anticuerpo antagonista anti-TIM3.

I. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo biespecífico y un agente activo adicional es el agente quimioterápico adicional como se describe en el presente documento. La ficha técnica o prospecto del envase indican que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo biespecífico; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunocombinado de la invención en lugar de o además de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que se une a FoIR1 y a CD3 y el anticuerpo anti-PD-1 antagonista de la unión al eje de PD-1 y, opcionalmente, el anticuerpo antagonista anti-TIM3.

III. EJEMPLOS

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

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

60 Procedimientos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La información general con

respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

5 Se determinaron secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra.

Síntesis génica

10 Se generaron segmentos de genes deseados, cuando se requirió, por PCR usando moldes apropiados o bien se sintetizaron por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis génica automatizada. En casos donde no estaba disponible ninguna secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos en base a las secuencias de los homólogos más cercanos y se aislaron los genes por RT-PCR del ARN procedente del tejido apropiado. Se clonaron segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares en vectores de clonación/secuenciación estándar. Se purificó el ADN plasmídico de bacterias transformadas y se determinó la concentración por espectroscopia UV. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados por secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Se diseñaron todas las construcciones con una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que dirige las proteínas para su secreción en células eucariotas.

Aislamiento de linfocitos pan T primarios humanos de PBMC

25 Se prepararon leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. En resumen, la sangre se diluyó con PBS estéril y se colocó cuidadosamente en una capa sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, H8889). Después de la centrifugación durante 30 minutos a 450 x g a temperatura ambiente (freno desconectado), se desechó parte del plasma que se encontraba por encima de la interfase que contenía los PBMC. Los PBMC se transfirieron a nuevos tubos Falcon de 50 ml y los tubos se rellenaron con PBS hasta un volumen total de 50 ml. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 400 x g (freno activado). El sobrenadante se desechó y el sedimento de PBMC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 4 °C durante 10 minutos a 350 x g). La población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en un medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO₂ al 5 % en la estufa de incubación hasta el inicio del ensayo.

35 El enriquecimiento de linfocitos T a partir de PBMC se realizó usando el kit II de aislamiento de linfocitos pan T (Miltenyi Biotec n.º 130-091-156), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los sedimentos celulares se diluyeron en 40 µl de tampón frío por 10 millones de células (PBS con BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM, filtrado estéril) y se incubaron con 10 µl de cóctel de biotina-anticuerpo por 10 millones de células durante 10 min a 4 °C. Se añadieron 40 30 µl de tampón frío y 20 µl de microesferas magnéticas anti-biotina por 10 millones de células, y la mezcla se incubó durante otros 15 min a 4 °C. Las células se lavaron añadiendo 10-20x el volumen actual y una etapa de centrifugación posterior a 300 x g durante 10 min. Se resuspendieron hasta 100 millones de células en 500 µl de tampón. La separación magnética de linfocitos pan T humanos no marcados se realizó usando columnas LS (Miltenyi Biotec n.º 130-042-401) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de linfocitos T resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en un medio AIM-V a 37 °C, CO₂ al 5 % en la estufa de incubación hasta el inicio del ensayo (no más de 24 h).

Aislamiento de linfocitos T indiferenciados primarios humanos de PBMC

50 Se prepararon leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. El enriquecimiento de linfocitos T a partir de PBMC se realizó usando el kit de aislamiento de linfocitos T indiferenciados CD8⁺ de Miltenyi Biotec (n.º 130-093-244), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero omitiendo la última etapa de aislamiento de los linfocitos T CD8⁺ (véase también la descripción para el aislamiento de linfocitos pan T humanos primarios).

Aislamiento de linfocitos pan T murinos de esplenocitos

60 Se aislaron bazo de ratones C57BL/6, se transfirieron a un tubo en C GentleMACS (Miltenyi Biotec n.º 130-093-237) que contenía tampón MACS (PBS + BSA al 0,5 % + EDTA 2 mM) y se disociaron con el disociador GentleMACS para obtener suspensiones de células disociadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La suspensión celular se pasó a través de un filtro de separación previa para eliminar las partículas de tejido no disociadas restantes. Después de la centrifugación a 400 x g durante 4 min a 4 °C, se añadió tampón de lisis ACK para lisar los glóbulos rojos (incubación durante 5 min a temperatura ambiente). Las células restantes se lavaron con tampón MACS dos veces, se contaron y se usaron para el aislamiento de linfocitos pan T murinos. Se realizó selección (magnética) negativa usando el kit de aislamiento de linfocitos pan T de Miltenyi Biotec (n.º 130-090-861), de acuerdo con las instrucciones

del fabricante. La población de linfocitos T resultante se contó automáticamente (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos adicionales.

Aislamiento de PBMC primarios de macaco cangrejero de sangre heparinizada

Se prepararon leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación por densidad a partir de sangre fresca de donantes macacos cangrejeros sanos, como sigue: se diluyó sangre heparinizada 1:3 con PBS estéril, y se diluyó medio Lymphoprep (Axon Lab n.º 1114545) al 90 % con PBS estéril. Dos volúmenes de la sangre diluida se colocaron en una capa sobre un volumen del gradiente de densidad diluido y la fracción de PBMC se separó mediante centrifugación durante 30 min a 520 x g, sin freno, a temperatura ambiente. La banda de PBMC se transfirió a un tubo Falcon nuevo de 50 ml y se lavó con PBS estéril por centrifugación durante 10 min a 400 x g a 4 °C. Se realizó una centrifugación a baja velocidad para eliminar las plaquetas (15 min a 150 x g, 4 °C), y la población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos adicionales.

Ejemplo 1

Purificación de fusiones biotiniladas de Fc con receptor de folato

Para generar nuevos anticuerpos contra FolR1 humano, se generaron los siguientes antígenos y herramientas de cribado como proteínas de fusión de Fc monovalentes (el dominio extracelular del antígeno unido a la región bisagra de la molécula de Fc-botón que se coexpresa con una molécula de Fc-ojal). Los genes antigénicos se sintetizaron (Genearth, Regensburg, Alemania) en base a secuencias obtenidas de GenBank o SwissProt y se insertaron en vectores de expresión para generar proteínas de fusión con Fc-botón con una marca de avidina C terminal para biotinilación *in vivo* o *in vitro*. La biotinilación *in vivo* se logró mediante la coexpresión del gen *birA* bacteriano que codifica una biotina ligasa bacteriana durante la producción. La expresión de todos los genes se realizó bajo el control de un promotor MPSV quimérico en un plásmido que contiene un elemento *oriP* para el mantenimiento estable de los plásmidos en líneas celulares que contienen EBNA.

Para la preparación de las moléculas de fusión Fc/antígeno monoméricas biotiniladas, se cotransfectaron células HEK293 EBNA en suspensión en crecimiento exponencial con tres vectores que codifican los dos componentes de la proteína de fusión (cadenas botón en ojal), así como BirA, una enzima necesaria para la reacción de biotinilación. Los vectores correspondientes se usaron en una proporción 9,5 : 9,5 : 1 ("ECD del antígeno-Fc botón-marca de avidina" : "Fc ojal" : "BirA").

Para la producción de proteínas en matraces de agitación de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 210 x g y el sobrenadante se reemplazó por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se resuspendieron en 20 ml de medio CD CHO que contenía 200 µg de ADN vector. Después de la adición de 540 µl de polietiliminina (PEI), la solución se mezcló durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una estufa de incubación con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadió ácido valproico 1 mM y medio Feed 1 (Lonza) al 7 % al cultivo. El medio de producción también se complementó con biotina 100 µM. Después de cultivar durante 7 días, se recogió el sobrenadante de las células mediante sedimentación por centrifugado durante 15 min a 210 x g. La solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se complementó con acida sódica hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo a 4 °C.

Las proteínas secretadas se purificaron de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguida de una cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap Protein A HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de pH lineal creado en 20 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. A continuación, se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. Se concentró la proteína y se filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0.

Se determinó la concentración de proteína midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de la fusión FolR1-Fc se analizaron mediante electroforesis capilar-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Se analizó el contenido en agregado de las muestras usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

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

5 **Tabla 1:** Antígenos producidos para aislamiento, selección y contraselección de anticuerpos anti-FoIR1 humano

Antígeno	ECD (aa)	Número de acceso	Secuencia	SEQ ID NO
FoIR1 humano	25-234	P15328	RIAWARTELLNVCMNAKHHKEXKPGPEDEKLHEQCPEWE KHNACCSINTSQEAHKDVSYLRYFNWHDHCGEMAFACER HYIQDTCLYECSFNLGFWIQQVDSWRKERVLLNVPFC KEDCQWWEDECHTSYTCSSNWHKGNWTSGFNKC AACQPFHEFFPTFVLCNEINTHSYKVSNSYSGSGPC IQNWFPAQGNPNEEVARFYAAMN	227
FoIR2 humano	17-230	P14207	TNCSAQDRELLNVCMNAKHHKTKKPGPEDEKLHEQCSP KKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWHDHCGEMEPAC KRNHFYIQDTCLYECSFNLGFWIQQVDSWRKERVLLNVP LCKEDCQWWEDECHTSYTCSSNWHKGNWTSGFNKC AGALCRTEFFESYFPTPAALCEGLWGHSEKVSNSYSGSGPC RCIQNWFPAQGNPNEEVARFYAAMN	228
FoIR3 humano	24-243	P41439	SARARTDLLNVCMNAKHHKTKKPGPEDELYGQCSFWEK NACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWHDHCGEMEPCKRH FIQDSGLYECSFNLGFWIQQVDSWRKERVLLNVPFC EDCERWWEDECHTSYTCSSNWHKGNWTSGFINECPAGA LCSFESYFPTPAALCEGLWGHSEKVSNSYSGSGPC IQNWFPAQGNPNEEVARFYAAMNACAPSGRLID	229
FoIR1 murino	25-232	P35846	TRARTELLNVCMNAKHHKTKKPGPEDEKLHEQCSPWKTN SCCSINTSQEAHKDVSYLRYFNWHDHCGEMAFACER HYIQDTCLYECSFNLGFWIQQVDSWRKERVLLNVPFC KEDCQWWEDECHTSYTCSSNWHKGNWTSGFNKC AACQPFHEFFPTFVLCNEINTHSYKVSNSYSGSGPC IQNWFPAQGNPNEEVARFYAAMN	230
FoIR1 de macaco cangrejero	25-234	G7PR14	EAQTRTARARTELLNVCMNAKHHKTKKPGPEDEKLHEQC RPNKKNACCSINTSQEAHKDVSYLRYFNWHDHCGEMAF ACKRNHFYIQDTCLYECSFNLGFWIQQVDSWRKERVLLN VFLCKEDCQWWEDECHTSYTCSSNWHKGNWTSGFNKC FVGAACQPFHEFFPTFVLCNEINTHSYKVSNSYSGSGPC RCIQNWFPAQGNPNEEVARFYAAMN	231

Tabla 2: Resumen del rendimiento y contenido final de monómero de las fusiones FoIR-Fc

Antígeno	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento
huFoIR1	100	30 mg/l
cyFoIR1	100	32 mg/l
muFoIR1	100	31 mg/l
huFoIR2	100	16 mg/l
huFoIR3	95	38 mg/l

10 **Ejemplo 2**

Generación de la cadena ligera común con especificidad para CD3ε

15 Las moléculas biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento comprenden al menos un resto de unión a CD3. Este resto se puede generar inmunizando animales de laboratorio, cribando una colección de fagos o usando anticuerpos anti-CD3 conocidos. La cadena ligera común con especificidad para CD3ε se generó humanizando la cadena ligera de un anticuerpo murino anti-CD3ε original (CH2527). Para la humanización de un anticuerpo de origen no humano, se deben trasplantar los residuos de las CDR del anticuerpo no humano (donante) a la región estructural de un anticuerpo humano (aceptador). En general, las secuencias de la región estructural
20 aceptadora se seleccionan alineando la secuencia del donante con una colección de secuencias aceptadoras potenciales y eligiendo una que tenga una homología razonable con el donante o que muestre aminoácidos similares

en algunas posiciones críticas para la estructura y la actividad. En el presente caso, la búsqueda de la región estructural aceptadora de anticuerpo se realizó alineando la secuencia del dominio VL de ratón del anticuerpo original con una colección de secuencias de la línea germinal humana y eligiendo la secuencia humana que mostró una identidad de secuencia alta. Sorprendentemente, se encontró una buena coincidencia en términos de homología de secuencia de la región estructural en una cadena ligera humana bastante poco frecuente perteneciente a la familia 7 de dominios V del tipo lambda, más precisamente, hVL_7_46 (nomenclatura IMGT, n.º acceso GenBank Z73674). Esta cadena ligera humana poco frecuente se eligió posteriormente como región estructural aceptadora para la humanización de la cadena ligera de CH2527. Las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del dominio variable de la cadena ligera de ratón se injertaron en esta región estructural aceptadora. Dado que la región estructural 4 no forma parte de la región variable del gen V de la línea germinal, la alineación para esta región (elemento J) se realizó individualmente. Por tanto, se eligió la secuencia IGLJ3-02 para la humanización de esta cadena ligera.

Se generaron trece variantes humanizadas (CH2527-VL7_46-1 a VL7_46-10, VL7_46-12 a VL7_46-14). Estas variantes difieren en los residuos de la región estructural (y combinaciones de los mismos) que se retomaron a la secuencia del dominio V murino o en los residuos CDR (definición de Kabat) que se podían mantener idénticos a la secuencia de la línea germinal humana. Los siguientes residuos de región estructural fuera de las CDR se retomaron a los residuos murinos en la variante del dominio VL humanizado final VL7_46-13 (residuos murinos enumerados): V36, E38, F44, G46, G49 y G57, respectivamente. El elemento J humano IGLJ3-02 era 100 % idéntico al elemento J del anticuerpo murino original.

Ejemplo 3

Evaluación por SPR de variantes humanizadas con especificidad para CD3ε

Las variantes de VL humanizadas se evaluaron como quimera en un formato TCB 2+1, es decir, los dominios V de la cadena ligera humanizada se emparejaron con dominios V de la cadena pesada murina. La evaluación por SPR se realizó en un instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Más precisamente, las variantes se capturaron directamente del sobrenadante de cultivo en un chip sensor GLM derivatizado anti-Fab (anticuerpo caprino anti-IgG humana, específico del fragmento F(ab')₂, Jackson ImmunoResearch) en orientación vertical. Los siguientes análisis posteriormente se inyectaron horizontalmente como concentraciones únicas para evaluar la unión a CD3ε humano y de macaco cangrejero: huCD3ε(-1-26)-Fc(botón)-avi (ID807) 3 μM y cyCD3ε(-1-26)-Fc(botón)-avi-Fc(ojal) (ID873) 2,5 μM, respectivamente. Las respuestas de unión se compararon cualitativamente con la unión de la construcción de control murina y se calificaron con + (unión observada comparable), +/- (unión observada reducida) y - (ninguna unión observada). El anticuerpo de captura se regeneró después de cada ciclo de captura de ligando y unión de analito y la construcción murina se reinyectó al final del estudio para confirmar la actividad de la superficie de captura. Los resultados se resumen en la tabla 3.

variante de VL humanizada	unión a CD3ε
CH2527-VL_murina	+
CH2527-VL7_46-1	-
CH2527-VL7_46-2	-
CH2527-VL7_46-3	-
CH2527-VL7_46-4	-
CH2527-VL7_46-5	-
CH2527-VL7_46-6	-
CH2527-VL7_46-7	-
CH2527-VL7_46-8	-
CH2527-VL7_46-9	-
CH2527-VL7_46-10	-
CH2527-VL7_46-12	+/-
CH2527-VL7_46-13	+
CH2527-VL7_46-14	-

Tabla 3: Evaluación cualitativa de unión basada en SPR para las variantes de la cadena ligera humanizada combinadas con la cadena pesada murina de CH2527. Solo la variante de la cadena ligera humanizada que se eligió finalmente, CH2527-VL7_46-13, resaltada en negrita, presentó una unión comparable a CD3ε humano y de macaco cangrejero.

Ejemplo 4**Propiedades de la cadena ligera común humanizada con especificidad para CD3ε**

La variante del dominio V de la cadena ligera que se eligió como la molécula inicial humanizada es VL7_46-13. Se determinó el grado de humanidad, es decir, la homología de secuencia del dominio V humanizado con la secuencia del dominio V de la línea germinal humana. Para VL7_46-13, la identidad de secuencia global con el homólogo de la línea germinal humana más cercano es de un 65 % antes de la humanización y de un 80 % después de ella. Omitiendo las regiones CDR, la identidad de secuencia es de un 92 % con respecto al homólogo de la línea germinal humana más cercano. Como se puede ver en la tabla 3, VL7_46-13 es la única variante de VL humanizada de un panel de 13 variantes que mostró una unión comparable al anticuerpo murino original y también conservó su reactividad cruzada con el CD3ε de macaco cangrejero. Este resultado indica que no era trivial humanizar el dominio VL murino sin perder afinidad de unión por CD3ε, lo que requería varias retromutaciones a los residuos de la región estructural murina (en particular G46) mientras se conservaba G24 en CDR1. Además, este resultado muestra que el dominio VL desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de la diana. Es importante destacar que el dominio VL humanizado VL7_46-13 basado en una línea germinal humana poco frecuente perteneciente a la familia 7 de dominios V de tipo lambda y que conserva la afinidad y especificidad para CD3ε, también es adecuado para su uso como una cadena ligera común en colecciones de anticuerpos de presentación en fagos del formato Fab y permite la selección exitosa de especificidades novedosas, lo que facilita enormemente la generación y producción de moléculas biespecíficas que se unen a CD3ε y, por ejemplo, a una diana tumoral y que comparten la misma cadena ligera "común".

Ejemplo 5**Generación de una colección de anticuerpos de presentación en fagos usando una cadena ligera común de la línea germinal humana derivada de HVK1-39**

Varios enfoques para generar anticuerpos biespecíficos que se asemejan a la IgG humana de longitud completa utilizan modificaciones en la región Fc que inducen la heterodimerización de dos cadenas pesadas distintas. Dichos ejemplos incluyen tecnologías de botón en ojal (Merchant *et al.*, Nat Biotechnol. Jul. de 1998;16(7):677-81), SEED (Davis *et al.*, Protein Eng Des Sel. Abr. de 2010; 23(4): 195-202) y conducción electrostática (Gunasekaran *et al.*, J Biol Chem. 18 de jun. de 2010; 285(25): 19637-46). Aunque estos enfoques permiten la heterodimerización eficaz de dos cadenas pesadas distintas, el emparejamiento apropiado de cadenas ligeras y pesadas relacionadas sigue siendo un problema. El uso de una cadena ligera (LC) común puede resolver este problema (Merchant *et al.*, Nat Biotech 16, 677-681 (1998)).

Aquí se describe la generación de una colección de anticuerpos para la presentación en un fago M13. Esencialmente, se diseñó una colección de múltiples regiones estructurales para la cadena pesada con una cadena ligera constante (o "común"). Esta colección está diseñada para generar anticuerpos multiespecíficos sin necesidad de usar tecnologías sofisticadas para evitar el emparejamiento erróneo de la cadena ligera.

El uso de una cadena ligera común permite facilitar la producción de estas moléculas, ya que ya no se produce un emparejamiento erróneo y se facilita el aislamiento de un anticuerpo biespecífico altamente puro. En comparación con otros formatos, el uso de fragmentos Fab como componentes básicos a diferencia de, por ejemplo, el uso de fragmentos scFv da como resultado una mayor estabilidad térmica y la ausencia de agregación de scFv y de formación de scFv intermolecular.

Generación de la colección

A continuación, se describe la generación de una colección de anticuerpos para la presentación en el fago M13. Esencialmente, se diseñó una colección de múltiples regiones estructurales para la cadena pesada con una cadena ligera constante (o "común").

Se usaron estas cadenas pesadas en la colección (números de acceso GenBank entre paréntesis):

IGHV1-46*01 (X92343) (SEQ ID NO: 104)

IGHV1-69*06 (L22583) (SEQ ID NO: 105)

IGHV3-15*01 (X92216) (SEQ ID NO: 106)

IGHV3-23*01 (M99660) (SEQ ID NO: 107)

IGHV4-59*01 (AB019438) (SEQ ID NO: 108)

IGHV5-51*01 (M99686) (SEQ ID NO: 109)

Todas las cadenas pesadas usan IGHJ2 como elemento J, excepto IGHV1-69*06 que usa la secuencia IGHJ6. El diseño de la aleatorización incluyó la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. Para CDR-H1 y CDR-H2 se eligió una estrategia

de aleatorización "suave", y los oligonucleótidos de aleatorización fueron tales que el codón para el aminoácido de la secuencia de la línea germinal estaba presente al 50 %. Todos los demás aminoácidos, excepto la cisteína, sumaban el 50 % restante. En CDR-H3, donde no hay aminoácidos en la línea germinal debido a la presencia del elemento D genético, se diseñaron oligonucleótidos que permiten el uso de insertos aleatorizados entre el elemento V y el elemento J de 4 a 9 aminoácidos de longitud. Los oligonucleótidos contenidos en su parte aleatorizada, por ejemplo, los tres aminoácidos G/Y/S, están presentes al 15 % cada uno, mientras que los aminoácidos A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E están presentes al 4,6 % cada uno.

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

La cadena ligera se deriva de la secuencia humana hVK1-39, y se usa de forma no modificada y no aleatorizada. Esto garantizará que se pueda usar la misma cadena ligera para otros proyectos sin modificaciones adicionales.

15 Selección de la colección ejemplar:

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

20 1. 10^{12} partículas de fagómidos de cada colección se unen a antígeno soluble biotinilado 100 nM durante 0,5 h en un volumen total de 1 ml. 2. El antígeno biotinilado se captura y las partículas de fagos unidas específicamente se aíslan mediante la adición de $\sim 5 \times 10^7$ microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina durante 10 min. 3. Las microesferas se lavan usando 5-10 x 1 ml de PBS/Tween20 y 5-10 x 1 ml de PBS. 4. La elución de las partículas de fagos se realiza por adición de 1 ml de TEA (trietilamina) 100 mM durante 10 min y neutralización mediante adición de 500 μ l de Tris/HCl 1 M, pH 7,4 y 5. En rondas de selección posteriores se aplica la reinfección de las bacterias *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial, la infección con el fago auxiliar VCSM13 y la posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagómidos. Las selecciones se llevan a cabo en 3-5 rondas usando concentraciones de antígeno constantes o decrecientes (de 10^{-7} M a 2×10^{-9} M). En la ronda 2, la captura de los complejos antígeno-fago se realizó usando placas de neutravidina en lugar de microesferas de estreptavidina. Todas las reacciones de unión se complementan con seroalbúmina bovina 100 nM o con leche desnatada en polvo para competir por los clones no deseados que surgen de la simple unión adhesiva de los anticuerpos al soporte plástico.

Las selecciones se llevan a cabo en tres o cuatro rondas usando concentraciones decrecientes del antígeno comenzando a partir de 100 nM y bajando hasta 5 nM en la ronda de selección final. Las moléculas de unión específicas se definen como señales aprox. 5 veces mayores que el fondo y se identifican mediante ELISA. Las moléculas de unión específica se identifican mediante ELISA como sigue: Se recubren 100 μ l de antígeno biotinilado 10 nM por pocillo en placas de neutravidina. Se añaden sobrenadantes bacterianos que contienen Fab y se detectan los Fab de unión por medio de sus marcas Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones positivos en ELISA se expresan en bacterias como fragmentos Fab solubles en formato de 96 pocillos y los sobrenadantes se someten a un experimento de cribado cinético mediante análisis SPR usando ProteOn XPR36 (BioRad). Se identifican los clones que expresan Fab con las constantes de afinidad más altas y se secuencian los fagómidos correspondientes. Para una caracterización adicional, las secuencias de Fab se amplifican mediante PCR a partir del fagómido y se clonan por medio de sitios de restricción apropiados en vectores de expresión de IgG₁ humana para la producción en mamíferos.

45 Generación de una colección de anticuerpos de presentación en fagos usando una cadena ligera común específica para CD3 ϵ humanizada

Aquí se describe la generación de una colección de anticuerpos para la presentación en el fago M13. Esencialmente, se diseñó una colección de múltiples regiones estructurales para la cadena pesada con una cadena ligera constante (o "común"). Esta colección se diseñó para la generación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T inactivos que contienen Fc, pero que se unen a Fc γ R, del isotipo IgG₁ P329G LALA o IgG₄ SPLE PG en los que uno o dos Fab reconocen un antígeno de superficie tumoral expresado en una célula tumoral mientras que el brazo Fab restante del anticuerpo reconoce CD3 ϵ en un linfocito T.

55 Generación de la colección

A continuación, se describe la generación de una colección de anticuerpos para la presentación en el fago M13. Esencialmente, se diseñó una colección de múltiples regiones estructurales para la cadena pesada con una cadena ligera constante (o "común"). Esta colección está diseñada únicamente para la generación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T inactivos que contienen Fc, pero que se unen a Fc γ R, del isotipo IgG₁ P329G LALA o IgG₄ SPLE PG.

La diversidad se introdujo mediante aleatorización de oligonucleótidos solo en la CDR3 de las diferentes cadenas pesadas. Los procedimientos para la generación de colecciones de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y se describen en Hoogenboom *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133-413; o en: Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004) 340,

1073-1093.

Se usaron estas cadenas pesadas en la colección:

- 5 IGHV1-46*01 (X92343) (SEQ ID NO: 104)
 IGHV1-69*06 (L22583) (SEQ ID NO: 105)
 IGHV3-15*01 (X92216) (SEQ ID NO: 106)
 10 IGHV3-23*01 (M99660) (SEQ ID NO: 107)
 IGHV4-59*01 (AB019438) (SEQ ID NO: 108)
 15 IGHV5-51*01 (M99686) (SEQ ID NO: 109)

Se usó la cadena ligera derivada del anticuerpo humanizado CH2527 específico para CD3 ϵ de macaco cangrejero y humano en la colección: (VL7_46-13; SEQ ID NO: 112). Esta cadena ligera no se aleatorizó y se usó sin modificaciones adicionales para garantizar la compatibilidad con diferentes moléculas de unión biespecíficas.

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

25 Ejemplo 6

Selección de fragmentos de anticuerpo de colecciones de cadenas ligeras comunes (que comprenden cadenas ligeras con especificidad para CD3 ϵ) contra FoIR1

30 Los anticuerpos 16A3, 15A1, 18D3, 19E5, 19A4, 15H7, 15B6, 16D5, 15E12, 21D1, 16F12, 21A5, 21G8, 19H3, 20G6 y 20H7 que comprenden la cadena ligera común VL7_46-13 con especificidad para CD3 ϵ se obtuvieron mediante selecciones de presentación en fagos contra diferentes especies (humana, de macaco cangrejero y murina) de FoIR1. Los clones 16A3, 15A1, 18D3, 19E5, 19A4, 15H7, 15B6, 21D1, 16F12, 19H3, 20G6 y 20H7 se seleccionaron de una subcolección en la que la cadena ligera común estaba emparejada con un repertorio de cadenas pesadas basado en la línea germinal humana VH1_46. En esta subcolección, la CDR3 de VH1_46 se había aleatorizado en base a 6 longitudes diferentes de CDR3. Los clones 16D5, 15E12, 21A5 y 21G8 se seleccionaron de una subcolección en la que la cadena ligera común estaba emparejada con un repertorio de cadenas pesadas basado en la línea germinal humana VH3_15. En esta subcolección, la CDR3 de VH3_15 se había aleatorizado en base a 6 longitudes diferentes de CDR3. Para obtener anticuerpos con reactividad cruzada para distintas especies (o reactivos para FoIR1 murino), las diferentes especies de FoIR1 se alternaron (o se mantuvieron constantes) de diferentes maneras en 3 rondas de bioselección (biopanning): 16A3 y 15A1 (FoIR1 humano - de macaco - humano); 18D3 (FoIR1 de macaco - humano - murino); 19E5 y 19A4 (3 rondas contra FoIR1 murino); 15H7, 15B6, 16D5, 15E12, 21D1, 16F12, 21A5, 21G8 (FoIR1 humano - de macaco - humano); 19H3, 20G6 y 20H7 (3 rondas contra FoIR1 murino).

45 Los FoIR1 humano, murino y de macaco cangrejero como antígenos para las selecciones de presentación en fagos, así como los cribados basados en ELISA y SPR, se expresaron de forma transitoria como fusión Fc monomérica N terminal en células HEK EBNA y se biotinilaron específicamente en el sitio *in vivo* por medio de la coexpresión de la biotina ligasa BirA en la secuencia de reconocimiento de la marca de avidina localizada en el extremo C de la parte Fc que lleva la cadena del receptor (cadena de botón Fc). Para evaluar la especificidad para FoIR1, se generaron dos receptores relacionados, FoIR2 y FoIR3 humanos de la misma manera.

50 Se realizaron rondas de selección (biopanning) en solución de acuerdo con el siguiente patrón:

- 55 1. Eliminación previa de $\sim 10^{12}$ partículas de fagómidos en placas Maxisorp recubiertas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de una IgG humana no relacionada para agotar las colecciones de anticuerpos que reconocen la parte Fc del antígeno.
2. Incubación de las partículas de fagómidos que no se unen a Fc con FoIR1 biotinilado humano, de macaco cangrejero o murino 100 nM durante 0,5 h en presencia de una construcción de Fc de botón en ojal no biotinilada no relacionada 100 nM para una disminución adicional de las moléculas de unión a Fc en un volumen total de 1 ml.
- 60 3. Captura del FoIR1 biotinilado y del fago específicamente unido mediante transferencia a 4 pocillos de una placa de microvaloración prerrecubierta con neutravidina durante 10 min (en las rondas 1 y 3).
4. Lavado de los pocillos respectivos con 5x PBS/Tween20 y 5x PBS.
- 65 5. Elución de las partículas de fagos por adición de 250 μl de TEA (trietilamina) 100 mM por pocillo durante 10 min y

neutralización por adición de 500 µl de Tris/HCl 1 M pH 7,4 a los eluidos agrupados de 4 pocillos.

6. Eliminación posterior de los eluidos neutralizados por incubación en una placa de microvaloración prerrecubierta con neutravidina con FoIR2 o FoIR3 capturado con biotina 100 nM para la eliminación final de las moléculas de unión a Fc y de unión inespecífica.

7. Reinfeción de células de *E. coli* TG1 en fase logarítmica con el sobrenadante de partículas de fagos eluidas, infección con el fago auxiliar VCSM13, incubación en un agitador a 30 °C durante la noche y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagómidos que se van a usar en la siguiente ronda de selección.

Las selecciones se llevaron a cabo en 3 rondas usando concentraciones de antígenos constantes de 100 nM. En la ronda 2, para evitar el enriquecimiento de moléculas de unión a neutravidina, se realizó la captura de complejos antígeno:fago por adición de $5,4 \times 10^7$ microesferas magnéticas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las moléculas de unión específica se identificaron mediante ELISA como sigue: Se recubrieron 100 µl de FoIR1 biotinilado humano, de macaco cangrejero o murino 25 nM y 10 µg/ml de IgG humana sobre placas de neutravidina y placas Maxisorp, respectivamente. Se añadieron sobrenadantes bacterianos que contenían Fab y se detectaron los Fab de unión por medio de sus marcas Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones que presentan señales en FoIR1 humano y son negativos en IgG humana se incluyeron en la preselección para realizar análisis adicionales y también se sometieron a prueba de manera similar contra las dos especies restantes de FoIR1. Se expresaron en bacterias en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purificaron por afinidad y se caracterizaron adicionalmente por análisis por SPR usando el biosensor ProteOn XPR36 de BioRad.

Las afinidades (K_D) de los clones seleccionados se midieron por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con FoIR1 biotinilado humano, de macaco cangrejero y murino, así como FoIR2 y FoIR3 humanos (controles negativos) inmovilizados en chips NLC por captura con neutravidina. Inmovilización de antígenos (ligando): los antígenos recombinantes se diluyeron con PBST (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a 10 µg/ml y, a continuación, se inyectaron a 30 µl/minuto en orientación vertical. Inyección de analitos: para las mediciones de cinética con dosis única, se cambió la dirección de inyección a la orientación horizontal, se inyectaron simultáneamente series de dilución 1:2 de Fab purificado (intervalos de concentración variables) a lo largo de los canales 1-5 separados, con tiempos de asociación de 200 s y tiempos de disociación de 600 s. Se inyectó el tampón (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" como referencia. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación (k_{as}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{dis}) usando un modelo de Langmuir sencillo de unión uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción k_{dis}/k_{as} . La tabla 4 enumera las constantes de disociación en equilibrio (K_D) de los clones seleccionados específicos para FoIR1.

Tabla 4: Constantes de disociación en equilibrio (K_D) para anticuerpos anti-FoIR1 (formato Fab) seleccionados por presentación en fagos de subcolecciones de cadenas ligeras comunes que comprenden VL7_46-13, una cadena ligera humanizada específica para CD3ε. K_D en nM.

Clon	huFoIR1 [nM]	cyFoIR1 [nM]	muFoIR1 [nM]	huFoIR2 [nM]	huFoIR3 [nM]
16A3	21,7	18	muy débil	sin unión	sin unión
15A1	30,9	17,3	muy débil	sin unión	sin unión
18D3	93,6	40,2	muy débil	sin unión	sin unión
19E5	522	276	19,4	sin unión	sin unión
19A4	2050	4250	43,1	sin unión	sin unión
15H7	13,4	72,5	sin unión	sin unión	sin unión
15B6	19,1	13,9	sin unión	sin unión	sin unión
16D5	39,5	114	sin unión	sin unión	sin unión
15E12	55,7	137	sin unión	sin unión	sin unión
21D1	62,6	32,1	sin unión	sin unión	sin unión
16F12	68	90,9	sin unión	sin unión	sin unión
21A5	68,8	131	sin unión	sin unión	sin unión
21G8	130	261	sin unión	sin unión	sin unión
19H3	sin unión	sin unión	89,7	sin unión	sin unión
20G6	sin unión	sin unión	78,5	sin unión	sin unión

Ejemplo 7

Selección de fragmentos de anticuerpo de colecciones genéricas de múltiples regiones estructurales contra FoIR1

Los anticuerpos 11F8, 36F2, 9D11, 5D9, 6B6 y 14E4 se obtuvieron mediante selecciones de presentación en fagos basadas en subcolecciones genéricas de múltiples regiones estructurales contra diferentes especies (humana, de

ES 2 984 937 T3

macaco cangrejero y murina) de FolR1. En estas subcolecciones de múltiples regiones estructurales, diferentes dominios VL con CDR3 aleatorizada (3 longitudes diferentes) se emparejan con diferentes dominios VH con CDR3 aleatorizada (6 longitudes diferentes). Los clones seleccionados son de los siguientes emparejamientos VL/VH: 11F8 (Vk_{1_5}/VH_{1_69}), 36F2 (Vk_{3_20}/VH_{1_46}), 9D11 (Vk_{2D_28}/VH_{1_46}), 5D9 (Vk_{3_20}/VH_{1_46}), 6B6 (Vk_{3_20}/VH_{1_46}) y 14E4 (Vk_{3_20}/VH_{3_23}). Para obtener anticuerpos con reactividad cruzada entre especies (o reactivos contra FolR1 murino), las diferentes especies de FolR1 se alternaron (o se mantuvieron constantes) de diferentes maneras en 3 o 4 rondas de bioselección (biopanning): 11F8 (FolR1 de macaco - murino - humano); 36F2 (FolR1 humano - murino - de macaco - murino); 9D11 (FolR1 de macaco - humano - macaco); 5D9 (FolR1 humano - de macaco - humano); 6B6 (FolR1 humano - de macaco - humano) y 14E4 (3 rondas contra FolR1 murino).

Los FolR1 humano, murino y de macaco cangrejero como antígenos para las selecciones de presentación en fagos, así como los cribados basados en ELISA y SPR, se expresaron de forma transitoria como fusión Fc monomérica N terminal en células HEK EBNA y se biotinilaron específicamente en el sitio *in vivo* por medio de la coexpresión de la biotina ligasa BirA en la secuencia de reconocimiento de la marca de avidina localizada en el extremo C de la parte Fc que lleva la cadena del receptor (cadena de botón Fc). Para evaluar la especificidad para FolR1, se generaron dos receptores relacionados, FolR2 y FolR3 humanos de la misma manera.

Se realizaron rondas de selección (biopanning) en solución de acuerdo con el siguiente patrón:

1. Eliminación previa de $\sim 10^{12}$ partículas de fagómidos en placas Maxisorp recubiertas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de una IgG humana no relacionada para agotar las colecciones de anticuerpos que reconocen la parte Fc del antígeno.
2. Incubación de las partículas de fagómidos que no se unen a Fc con FolR1 biotinilado humano, de macaco cangrejero o murino 100 nM durante 0,5 h en presencia de una construcción de Fc de botón en ojal no biotinilada no relacionada 100 nM para una disminución adicional de las moléculas de unión a Fc en un volumen total de 1 ml.
3. Captura del FolR1 biotinilado y del fago específicamente unido mediante transferencia a 4 pocillos de una placa de microvaloración prerrecubierta con neutravidina durante 10 min (en las rondas 1 y 3).
4. Lavado de los pocillos respectivos con 5x PBS/Tween20 y 5x PBS.
5. Elución de las partículas de fagos por adición de 250 μl de TEA (trietilamina) 100 mM por pocillo durante 10 min y neutralización por adición de 500 μl de Tris/HCl 1 M pH 7,4 a los eluidos agrupados de 4 pocillos.
6. Eliminación posterior de los eluidos neutralizados por incubación en una placa de microvaloración prerrecubierta con neutravidina con FolR2 o FolR3 capturado con biotina 100 nM para la eliminación final de las moléculas de unión a Fc y de unión inespecífica.
7. Reinfeción de células de *E. coli* TG1 en fase logarítmica con el sobrenadante de partículas de fagos eluidas, infección con el fago auxiliar VCSM13, incubación en un agitador a 30 °C durante la noche y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagómidos que se van a usar en la siguiente ronda de selección.

Las selecciones se llevaron a cabo en 3 rondas usando concentraciones de antígenos constantes de 100 nM. En las rondas 2 y 4, para evitar el enriquecimiento de moléculas de unión a neutravidina, se realizó la captura de complejos antígeno:fago por adición de $5,4 \times 10^7$ microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las moléculas de unión específica se identificaron mediante ELISA como sigue: Se recubrieron 100 μl de FolR1 biotinilado humano, de macaco cangrejero o murino 25 nM y 10 $\mu\text{g/ml}$ de IgG humana sobre placas de neutravidina y placas Maxisorp, respectivamente. Se añadieron sobrenadantes bacterianos que contenían Fab y se detectaron los Fab de unión por medio de sus marcas Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones que presentan señales en FolR1 humano y son negativos en IgG humana se incluyeron en la preselección para realizar análisis adicionales y también se sometieron a prueba de manera similar contra las dos especies restantes de FolR1. Se expresaron en bacterias en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purificaron por afinidad y se caracterizaron adicionalmente por análisis por SPR usando el biosensor ProteOn XPR36 de BioRad.

Las afinidades (K_D) de los clones seleccionados se midieron por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con FolR1 biotinilado humano, de macaco cangrejero y murino, así como FolR2 y FolR3 humanos (controles negativos) inmovilizados en chips NLC por captura con neutravidina. Inmovilización de antígenos (ligando): los antígenos recombinantes se diluyeron con PBST (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a 10 $\mu\text{g/ml}$ y, a continuación, se inyectaron a 30 $\mu\text{l/minuto}$ en orientación vertical. Inyección de analitos: Para las mediciones de cinética con dosis única, se cambió la dirección de inyección a la orientación horizontal, se inyectaron simultáneamente series de dilución 1:2 de Fab purificado (intervalos de concentración variables) a lo largo de los canales 1-5 separados, con tiempos de asociación de 150 o 200 s y tiempos de disociación de 200 o 600 s, respectivamente. Se inyectó el tampón (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" como referencia. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación (k_{as}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{dis}) usando un modelo de Langmuir sencillo de unión uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y

disociación. Se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción k_{dis}/k_{as} . La tabla 5 enumera las constantes de disociación en equilibrio (K_D) de los clones seleccionados específicos para FoIR1.

5 Tabla 5: Constantes de disociación en equilibrio (K_D) para anticuerpos anti-FoIR1 (formato Fab) seleccionados por presentación en fagos de subcolecciones genéricas de múltiples regiones estructurales. K_D en nM.

Clon	K_D (nM)				
	huFoIR1	cyFoIR1	muFoIR1	huFoIR2	huFoIR3
11F8	632	794	1200	sin unión	sin unión
36F2	1810	1640	737	sin unión	sin unión
9D11	8,64	5,29	sin unión	sin unión	sin unión
5D9	8,6	5,9	sin unión	sin unión	sin unión
6B6	14,5	9,4	sin unión	sin unión	sin unión
14E4	sin unión	sin unión	6,09	sin unión	sin unión

Ejemplo 8

10 **Producción y purificación de moléculas de unión a FoIR1 novedosas en formatos biespecíficos de linfocitos T e IgG**

Para identificar las moléculas de unión a FoIR1 que pueden inducir la destrucción dependiente de linfocitos T de las células diana seleccionadas, los anticuerpos aislados de una colección de Fab o cadenas ligeras comunes se convirtieron al formato IgG₁ humano correspondiente. En resumen, se amplificaron las cadenas pesada variable y ligera variable de moléculas de unión a FoIR1 únicas de la presentación en fagos mediante reacciones de PCR estándar usando los clones de Fab como molde. Los productos de PCR se purificaron e insertaron (mediante clonación basada en endonucleasas de restricción y ligasas o bien mediante "recombinación" usando el kit InFusion de Invitrogen) en vectores de expresión adecuados en los que se fusionan a la cadena pesada constante humana o cadena ligera constante humana apropiada. Los casetes de expresión en estos vectores consisten en un promotor MPSV quimérico y un sitio de poliadenilación sintético. Además, los plásmidos contienen la región oriP del virus de Epstein-Barr para el mantenimiento estable de los plásmidos en células HEK293 que albergan el antígeno nuclear de EBV (EBNA). Después de la transfección mediada por PEI, los anticuerpos se produjeron de forma transitoria en células HEK293 EBNA y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A estándar seguida de cromatografía de exclusión por tamaño como se describe:

Transfección y producción transitorias

Todos los anticuerpos (bienespecíficos) (si no se obtuvieron a partir de una fuente comercial) usados en el presente documento se produjeron de forma transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediada por PEI para los vectores requeridos como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en un matraz de agitación de 500 ml, se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas, todas las cantidades se ajustaron en consecuencia). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, el sobrenadante se reemplaza por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Se mezclan vectores de expresión en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl, la solución de PEI se mezcla con una agitadora vortical durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclan con la solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz de agitación de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en una estufa de incubación con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después del tiempo de incubación, se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de un cultivo de 7 días, se recoge el sobrenadante para la purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se filtra en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm) y se añade acida de sodio hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantiene a 4 °C. Después de la producción, se obtuvieron los sobrenadantes y se filtraron los sobrenadantes que contenían anticuerpos a través de filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación de anticuerpos

Todas las moléculas se purificaron en dos etapas usando procedimientos estándar, tales como cromatografía de afinidad con proteína A (Åkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M, pH 8,0) y se aplicó a una columna HiTrap PA FF (GE Healthcare, volumen de columna (VC) = 5 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (VC) de *tampón A* (fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5). Después del lavado con 10 VC de *tampón A*, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH para *tampón B* (citrato de sodio 20 mM, pH 3, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 12 VC. Las fracciones que contenían la proteína de interés se combinaron y el pH de la solución se ajustó suavemente a pH 6,0 (usando Na₂HPO₄ 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron a 2 ml usando ultraconcentradores (Vivaspin 15R

30.000 MWCO HY, Sartorius) y posteriormente se aplicaron a una columna de calidad preparativa HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween-20 al 0,01 %. El contenido agregado de las fracciones eluidas se analizó por cromatografía analítica de exclusión por tamaño. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7, a 25 °C. Se combinaron las fracciones que contenían menos de un 2 % de oligómeros y se concentraron a una concentración final de 1-1,5 mg/ml usando ultraconcentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius). Se determinó la concentración de proteína midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y el peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis capilar-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C.

En base a los resultados de la caracterización *in vitro*, las moléculas de unión seleccionadas se convirtieron a un formato biespecífico de linfocitos T. En estas moléculas, los restos de unión a FoIR1:CD3 están dispuestos en un orden 2:1 con los Fab de FoIR1 localizados en el extremo N. Para los clones aislados de la colección de Fab estándar, la parte de unión a CD3 se generó como un CrossFab (entrecruzamiento de CH1Ck), mientras que para los clones de la colección de cadenas ligeras comunes no fue necesario ningún entrecruzamiento. Estas moléculas biespecíficas se produjeron y purificaron de forma análoga a las IgG.

Tabla 6: Rendimiento y contenido de monómero de moléculas de unión a FoIR1 novedosas en formato IgG y TCB, respectivamente.

N.º	Clon	Colección	IgG		TCB	
			Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]
1	11F8	Fab	8,03	96,26	--	--
2	14E4	Fab	8,90	98,12	--	--
3	15B6	CLC	7,72	100,00	--	--
4	15E12	CLC	6,19	100,00	--	--
5	15H7	CLC	8,94	100,00	--	--
6	16A3	CLC	0,60	n.d.	--	--
7	16D5	CLC	36,50	96,96	4,36	97,19
8	16F12	CLC	5,73	97,17	--	--
9	18D3	CLC	0,90	n.d.	--	--
10	19A4	CLC	38,32	100,00	37,50	100,00
11	19E5	CLC	46,09	100,00	--	--
12	19H3	CLC	7,64	100,00	--	--
13	20G6	CLC	24,00	100,00	--	--
14	20H7	CLC	45,39	100,00	--	--
15	21A5	CLC	1,38	98,56	47,31	95,08
16	21D1	CLC	5,47	100,00	--	--
17	21G8	CLC	6,14	97,28	9,27	100,00
18	36F2	Fab	11,22	100,00	18,00	100,00
19	5D9	Fab	20,50	100,00	0,93	97,32
20	6B6	Fab	3,83	100,00	4,17	91,53
21	9D11	Fab	14,61	100,00	2,63	100,00

CLC: Cadena ligera común

Ejemplo 9

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

Se prepararon cuatro formatos biespecíficos de linfocitos T diferentes para una molécula de unión de la colección de cadenas ligeras comunes (16D5) y tres formatos para una molécula de unión de la colección de Fab (9D11) para comparar sus propiedades de destrucción *in vitro*.

El formato estándar es el formato invertido 2+1 como ya se describió (restos de unión a FoIR1:CD3 dispuestos en un orden 2:1 con los Fab de FoIR1 localizados en el extremo N). En el formato clásico 2+1, los restos de unión a FoIR1:CD3 están dispuestos en un orden 2:1 con el Fab de CD3 localizado en el extremo N. También se prepararon dos formatos monovalentes. El formato 1+1 cabeza a cola tiene los restos de unión a FoIR1:CD3 dispuestos en un orden 1:1 en el mismo brazo de la molécula con el Fab de FoIR1 localizado en el extremo N. En el formato 1+1 clásico, los restos de unión a FoIR1:CD3 están presentes una vez, cada uno en un brazo de la molécula. Para el clon 9D11 aislado de la colección de Fab estándar, la parte de unión a CD3 se generó como un CrossFab (entrecruzamiento de

CH1Ck), mientras que para el clon 16D5 de la colección de cadenas ligeras comunes no fue necesario ningún entrecruzamiento. Estas moléculas biespecíficas se produjeron y purificaron de forma análoga al formato biespecífico de linfocitos T invertido estándar.

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

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento
TCB 16D5 anti-FoIR1 2+1 (invertida)	96 %	5,4 mg/l
TCB 16D5 anti-FoIR1 2+1 (clásica)	90 %	4,6 mg/l
TCB 16D5 anti-FoIR1 1+1 (cabeza a cola)	100 %	5,4 mg/l
TCB 16D5 anti-FoIR1 1+1 (clásica)	100 %	0,7 mg/l
TCB 9D11 anti-FoIR1 2+1 (invertida)	100 %	2,6 mg/l
TCB 9D11 anti-FoIR1 1+1 (cabeza a cola)	100 %	6,1 mg/l
TCB 9D11 anti-FoIR1 1+1 (clásica)	96 %	1,3 mg/l
TCB Mov19 anti-FoIR1 2+1 (invertida)	98 %	3 mg/l
TCB Mov19 anti-FoIR1 1+1 (cabeza a cola)	100 %	5,2 mg/l

10 **Ejemplo 10**

Caracterización bioquímica de moléculas de unión a FoIR1 por resonancia de plasmón superficial

15 La unión de las moléculas de unión a FoIR1 como IgG o en el formato biespecífico de linfocitos T a diferentes receptores de folato recombinantes (FoIR1, 2 y 3 humano, FoIR1 murino y FoIR1 de macaco cangrejero; todos como fusiones Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

20 **Inyecciones únicas**

25 En primer lugar, las IgG anti-FoIR1 se analizaron mediante inyecciones únicas (tabla 1) para caracterizar su reactividad cruzada (con FoIR1 humano, murino y de macaco cangrejero) y especificidad (para FoIR1 humano, FoIR2 humano, FoIR3 humano). Las fusiones con Fc monomérico biotinilado recombinante de los receptores de folato 1 humano, de macaco cangrejero y murino (FoIR1-Fc) o los receptores de folato 2 y 3 humano (FoIR2-Fc, FoIR3-Fc) se acoplaron directamente en un chip SA usando las instrucciones de acoplamiento estándar (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las IgG se inyectaron durante 60 segundos a una concentración de 500 nM. Las IgG que se unieron a huFoIR2 y huFoIR3 se rechazaron por falta de especificidad. La mayoría de las moléculas de unión solo tienen reactividad cruzada entre FoIR1 humano y de macaco cangrejero, mientras que la reactividad cruzada adicional para FoIR1 murino estuvo la mayor parte del tiempo vinculada a la pérdida de especificidad.

30 Tabla 8: Reactividad cruzada y especificidad de 25 nuevas moléculas de unión al receptor de folato 1 (como IgG), así como de dos IgG de control (Mov19 y Farletuzumab). + significa unión, - significa que no hay unión, +/- significa una unión débil.

Nombre del clon	Unión a huFoIR1	Unión a cyFoIR1	Unión a muFoIR1	Unión a huFoIR2	Unión a huFoIR3
Mov19	+	+	-	-	-
Farletuzumab	+	+	-	-	-
16A3	+	+	+/-	-	-
18D3	+	+	-	-	-
19E5	+	+	+	+	+
19A4	-	-	+	+	+
15H7	+	+	+	-	-
15B6	+	+	-	-	-
16D5	+	+	-	-	-
15E12	+	+	+/-	+	+
21D1	+	+	+/-	-	-
16F12	+	+	-	-	-
21A5	+	+	-	-	+/-
21G8	+	+	-	+	+

19H3	-	-	+	-	-
20G6	-	-	+	-	-
20H7	-	-	+	-	-
9D11	+	+	-	-	-
5D9	+	+	-	+	+
6B6	+	+	-	+	+
11F8	+	+	+	+	+
36F2	+	+	+	-	-
14E4	-	-	+	-	-

Avidez por el receptor de folato 1

5 La avides de la interacción entre las IgG o las moléculas biespecíficas de linfocitos T anti-FolR1 y los receptores de folato recombinantes se determinó como se describe a continuación (tabla 9).

10 Las fusiones con Fc monomérico biotinilado recombinante del receptor de folato 1 humano, de macaco cangrejero y murino (FolR1-Fc) se acoplaron directamente en un chip SA usando las instrucciones de acoplamiento estándar (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las IgG o las moléculas biespecíficas de linfocitos T anti-FolR1 se pasaron a un intervalo de concentración de 2,1 a 500 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las cubetas de lectura durante 180 segundos. Se supervisó la disociación durante 600 segundos. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia inmovilizada con fusión de Fc del receptor de IL2 biotinilado recombinante. Para el análisis de la interacción de IgG 19H3 y el receptor de folato 1 murino, se añadió folato (Sigma F7876) en el tampón de migración HBS-EP a una concentración de 2,3 µM. Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las IgG o las moléculas biespecíficas de linfocitos T se aproximaron a una unión de Langmuir 1:1 y se ajustaron a ese modelo (que no es correcto, pero da una idea de la avides). Las constantes de avides aparente para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

20 Tabla 9: Unión bivalente (avides con KD aparente) de molécula de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o como moléculas biespecíficas de linfocitos T (TCB) en FolR1 humano y de macaco cangrejero.

Análito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD aparente (M)
TCB 16D5	huFolR1	8,31E+04	3,53E-04	4,24E-09
	cyFolR1	1,07E+05	3,70E-04	3,45E-09
TCB 9D11	huFolR1	1,83E+05	9,83E-05	5,36E-10
	cyFolR1	2,90E+05	6,80E-05	2,35E-10
TCB 21A5	huFolR1	2,43E+05	2,64E-04	1,09E-09
	cyFolR1	2,96E+05	2,76E-04	9,32E-10
IgG 36F2	huFolR1	2,62E+06	1,51E-02	5,74E-9
	cyFolR1	3,02E+06	1,60E-02	5,31E-9
	muFolR1	3,7E+05	6,03E-04	1,63E-9
IgG Mov19	huFolR1	8,61E+05	1,21E-04	1,4E-10
	cyFolR1	1,29E+06	1,39E-04	1,08E-10
Farletuzumab	huFolR1	1,23E+06	9E-04	7,3E-10
	cyFolR1	1,33E+06	8,68E-04	6,5E-10
IgG 19H3	muFolR1	7,1E+05	1,1E-03	1,55E-09

1. Afinidad por el receptor de folato 1

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

30 Para la medición de afinidad, se realizó el acoplamiento directo de alrededor de 6000-7000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (GE Healthcare). Se capturaron las IgG o las moléculas biespecíficas de linfocitos T anti-FolR1 a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 20 o 40 segundos, la cubeta de lectura de referencia se dejó sin captura. Se pasaron series de dilución (6,17 a 500 nM o 12,35 a 3000 nM) de fusión de Fc con el receptor de folato 1 humano o de macaco cangrejero en todas las cubetas de lectura a 30 µl/min durante 120 o 240 segundos para registrar la fase de asociación. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 240 s y se activó cambiando de la solución de muestra a HBS-EP. La superficie del chip se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble de 60 s de glicina-HCl 10 mM, pH 2,1 o pH 1,5. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia 1. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión de Langmuir 1:1 usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 10: Unión monovalente (afinidad) de moléculas de unión a FoIR1 seleccionadas como IgG o como moléculas biespecíficas de linfocitos T (TCB) en FoIR1 humano y de macaco cangrejero.

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
TCB 16D5	huFoIR1	1,53E+04	6,88E-04	4,49E-08
	cyFoIR1	1,32E+04	1,59E-03	1,21E-07
TCB 9D11	huFoIR1	3,69E+04	3,00E-04	8,13E-09
	cyFoIR1	3,54E+04	2,06E-04	5,82E-09
TCB 21A5	huFoIR1	1,79E+04	1,1E-03	6,16E-08
	cyFoIR1	1,48E+04	2,06E-03	1,4E-07
IgG Mov19	huFoIR1	2,89E+05	1,59E-04	5,5E-10
	cyFoIR1	2,97E+05	1,93E-04	6,5E-10
Farletuzumab	huFoIR1	4,17E+05	2,30E-02	5,53E-08
	cyFoIR1	5,53E+05	3,73E-02	6,73E-08

5 2. Afinidad por CD3

La afinidad de la interacción entre las moléculas biespecíficas de linfocitos T anti-FoIR1 y CD3εδ-Fc humano recombinante se determinó como se describe a continuación (tabla 11).

10 Para la medición de la afinidad, se realizó el acoplamiento directo de alrededor de 9000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (GE Healthcare). Se capturaron las moléculas biespecíficas de linfocitos T anti-FoIR1 a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 segundos, la cubeta de lectura de referencia se dejó sin captura. Se pasaron series de dilución (6,17 a 500 nM) de la fusión CD3εδ-Fc humano en todas las cubetas de lectura a 15 30 µl/min durante 240 segundos para registrar la fase de asociación. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 240 s y se activó cambiando de la solución de muestra a HBS-EP. La superficie del chip se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble de 60 s de glicina-HCl 10 mM, pH 2,1. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia 1. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión de Langmuir 1:1 usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 11: Unión monovalente (afinidad) de moléculas biespecíficas de linfocitos T (TCB) anti-FoIR1 seleccionadas en CD3-Fc humano.

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

25 La parte de unión a CD3 es idéntica para todas las construcciones y la afinidad es similar para las moléculas biespecíficas de linfocitos T medidas (intervalo de KD entre 60 y 90 nM).

Ejemplo 11

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

La unión simultánea de las moléculas biespecíficas de linfocitos T anti-FoIR1 al receptor de folato 1 recombinante y a CD3εδ-Fc humano recombinante se determinó como se describe a continuación.

35 Las fusiones con Fc monomérico biotinilado recombinante del receptor de folato 1 humano, de macaco cangrejero y murino (FoIR1-Fc) se acoplaron directamente en un chip SA usando las instrucciones de acoplamiento estándar (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las moléculas biespecíficas de linfocitos T anti-FoIR1 se inyectaron durante 60 s a 500 nM con un caudal de 30 µl/minutos a través de las cubetas de lectura, seguido de una inyección de huCDεδ-Fc durante 60 s a 500 nM. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia inmovilizada con fusión de Fc del receptor de IL2 biotinilado recombinante. Las cuatro moléculas biespecíficas de linfocitos T sometidas a prueba (TCB 16D5, TCB 21A5, TCB 51C7 y TCB 45D2) se pudieron unir simultáneamente al receptor de folato 1 y a CD3 humano como se esperaba.

Ejemplo 12

Agrupación de epítomos

50 Para la agrupación de epítomos, las IgG o las moléculas biespecíficas de linfocitos T anti-FoIR1 se inmovilizaron directamente en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (GE Healthcare), con una

respuesta final de alrededor de 700 UR. A continuación, se capturó huFolR1-Fc 500 nM durante 60 s, seguido de 500 nM de las diferentes moléculas de unión durante 30 s. La superficie se regeneró con dos inyecciones de glicina 10 mM a pH 2 durante 30 s cada una. Se evalúa si las diferentes moléculas de unión se pueden unir a huFolR1 capturado en moléculas de unión inmovilizadas (tabla 12).

5

Tabla 12: Caracterización de epítomos de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o como moléculas biespecíficas de linfocitos T (TCB) en FolR1 humano. + significa unión, - significa que no hay unión, +/- significa una unión débil

		Analitos en solución						
		En huFolR1	TCB 16D5	TCB 21A5	TCB 9D11	IgG 36F2	IgG Mov19	Farletuzumab
Inmovilizado	TCB 16D5		-	-	-	+	+	+
	TCB 21A5		-	-	-	+	+	+
	TCB 9D11	Una vez capturado en 9D11, no se puede unir también a FolR1						
	IgG 36F2	No se puede medir, huFolR1 se disocia demasiado rápido						
	IgG Mov19		+	+	+/-	-	-	-

10

En base a estos resultados y a datos adicionales con unión simultánea a huFolR1 inmovilizado, las moléculas de unión se separaron en tres grupos. No está claro si 9D11 tiene un epítipo separado, ya que desplaza a todas las demás moléculas de unión. 16D5 y 21A5 parecen estar en el mismo grupo y Mov19, Farletuzumab (Coney *et al.*, Cancer Res. 15 de nov. de 1991; 51 (22):6125-32; Kalli *et al.*, Curr Opin Investig Drugs. Dic. de 2007; 8(12): 1067-73) y 36F2 en otro (tabla 13). Sin embargo, 36F2 se une a un epítipo diferente que Mov19 y Farletuzumab, ya que se une a FolR1 humano, de macaco cangrejero y murino.

15

Tabla 13: Agrupación de epítomos de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o como moléculas biespecíficas de linfocitos T (TCB) en FolR1 humano

20

Epítipo 1	Epítipo 2	Epítipo 3
16D5	9D11	Mov19
21A5		Farletuzumab
		36F2

Ejemplo 13

Selección de moléculas de unión

25

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

Las IgG anti-FolR1 se analizaron mediante SPR para caracterizar su reactividad cruzada (con FolR1 humano, murino y de macaco cangrejero) y especificidad (para FolR1 humano, FolR2 humano, FolR3 humano). La unión inespecífica a FolR2 y 3 humanos se consideró un factor de exclusión. La unión y la especificidad para FolR1 humano se confirmó en las células. Algunas moléculas de unión no se unieron a las células que expresaban FolR1, aunque reconocieron el FolR1 humano recombinante en SPR. Se determinó la temperatura de agregación, pero no fue un factor de exclusión, ya que las moléculas de unión seleccionadas eran todas estables. Las moléculas de unión seleccionadas se sometieron a prueba en un ELISA de polirreactividad para verificar la unión inespecífica, lo que dio lugar a la exclusión de cuatro moléculas de unión. Este procedimiento dio como resultado una selección inicial de tres moléculas de unión: 36F2 (colección de Fab), 9D11 (colección de Fab) y 16D5 (cadena ligera común). 36F2 se disoció rápidamente de huFolR1 y, por lo tanto, inicialmente no se escogió.

35

Ejemplo 14

Unión específica de moléculas de unión a FolR1 recientemente generadas a células tumorales que expresan FolR1 humano

Se generaron nuevas moléculas de unión a FolR1 por medio de presentación en fagos usando una colección de Fab o una colección de cadenas ligeras comunes usando la cadena ligera de CD3. Las moléculas de unión identificadas se convirtieron a un formato de IgG₁ humana y se abordó la unión a células HeLa de alta expresión de FolR1. Como molécula de referencia se incluyó la molécula de unión a FolR1 humano Mov19. La mayoría de las moléculas de unión sometidas a prueba en este ensayo mostraron una unión a FolR1 de intermedia a buena con algunos clones uniéndose igual de bien que Mov19 (véase la figura 2). Los clones 16A3, 18D3, 15H7, 15B6, 21D1, 14E4 y 16F12 se excluyeron porque la unión a FolR1 en las células no se pudo confirmar por citometría de flujo. En una siguiente etapa, se sometió a prueba la especificidad de los clones seleccionados para FolR1 humano excluyendo la unión al FolR2 humano estrechamente relacionado. Las células HEK se transfectaron de forma transitoria con FolR1 humano o FolR2 humano para abordar la especificidad. Los clones 36F2 y 9D11 derivados de la colección de Fab y los clones 16D5 y 21A5

50

derivados de la colección de CLC se unieron específicamente a FolR1 humano y no a FolR2 humano (véanse las figuras 3A-B). Todos los demás clones sometidos a prueba mostraron al menos algo de unión a FolR2 humano (véanse las figuras 3A-B). Por lo tanto, estos clones se excluyeron de la caracterización adicional. En paralelo, la reactividad cruzada de los clones de FolR1 con FolR1 de macaco cangrejero se abordó realizando estudios de unión a células HEK transfectadas de forma transitoria con FolR1 de macaco cangrejero. Todos los clones sometidos a prueba se pudieron unir a FolR1 de macaco cangrejero y los cuatro clones específicos seleccionados de FolR1 humano 36F2, 9D11, 16D5 y 21A5 se unieron comparativamente bien a FolR1 humano y de macaco cangrejero (figura 4). Posteriormente, tres moléculas de unión de reactividad cruzada con macaco cangrejero específicas de FolR1 humano se convirtieron al formato de TCB y se sometieron a prueba para determinar la inducción de la destrucción por linfocitos T y la activación de linfocitos T. Estos clones fueron 9D11 de la colección de Fab y 16D5 y 21A5 de la colección de CLC. Como molécula de referencia se incluyó TCB Mov19 anti-FolR1 en todos los estudios. Estos TCB anti-FolR1 se usaron a continuación para comparar la inducción de internalización después de unirse a FolR1 en células HeLa. Los tres clones sometidos a prueba se internalizan tras la unión a FolR1 de manera comparable a la internalización tras la unión de TCB Mov19 anti-FolR1 (figura 5). TCB 21A5 anti-FolR1 se suspendió debido a signos de polirreactividad.

Ejemplo 15

Destrucción mediada por linfocitos T de células diana tumorales que expresan FolR1 inducida por anticuerpos TCB anti-FolR1

Las TCB anti-FolR1 se usaron para determinar la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan FolR1. Se usó un panel de líneas celulares diana potenciales para determinar los sitios de unión a FolR1 mediante análisis por Qifikit.

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

Tabla 14: Sitios de unión a FolR1 en células tumorales

Línea celular	Origen	Sitios de unión a FolR1
HeLa	Adenocarcinoma de cuello uterino	2.240.716
Skov3	Adenocarcinoma ovárico	91.510
OVCAR5	Adenocarcinoma ovárico	22.077
HT29	Adenocarcinoma colorrectal	10.135
MKN45	Adenocarcinoma gástrico	54

Se determinó la unión de las tres TCB anti-FolR1 diferentes (que contienen las moléculas de unión 9D11, 16D5 y Mov19) a este panel de líneas celulares tumorales, lo que demuestra que las TCB anti-FolR1 se unen específicamente a las células tumorales que expresan FolR1 y no a una línea celular tumoral negativa para FolR1. La cantidad de construcción unida es proporcional al nivel de expresión de FolR1 y todavía existe una buena unión de las construcciones a la línea celular de baja expresión de FolR1 HT-29 detectable. Además, no existe unión del control negativo TCB DP47 a ninguna de las líneas celulares usadas (figuras 6A-E). TCB DP47 es una TCB no dirigida y se preparó como se describe en el documento WO2014/131712.

La línea celular de expresión intermedia SKOV3 y la línea celular de expresión baja HT-29 se usaron adicionalmente para someter a prueba la destrucción mediada por linfocitos T y la activación de linfocitos T usando TCB 16D5 y TCB 9D11; TCB DP47 se incluyó como control negativo. Ambas líneas celulares se destruyeron ya en presencia de niveles muy bajos de TCB 16D5 y TCB 9D11 y no existió diferencia en la actividad entre ambas TCB, aunque TCB 9D11 se une más fuertemente a FolR1 que TCB 16D5. La destrucción global de células SKOV3 fue mayor en comparación con HT-29, que refleja los niveles de expresión más altos de FolR1 en células SKOV3 (figuras 7A-D). En línea con esto, se detectó una fuerte regulación por incremento del marcador de activación CD25 y CD69 en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. La activación de los linfocitos T fue muy similar en presencia de células SKOV3 y células HT-29. El control negativo TCB DP47 no induce ninguna destrucción a las concentraciones usadas y no existió una regulación por incremento significativa de CD25 y CD69 en los linfocitos T.

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

Construcción	Destrucción tras 24 h (pM)	Destrucción tras 48 h (pM)	CD4+ CD69+ (%)	CD4+ CD25+ (%)	CD8+ CD69+ (%)	CD8+ CD25+ (%)
TCB 9D11 anti-FolR1	1,1	0,03	0,51	0,46	0,019	0,03
TCB 16D5 anti-FolR1	0,7	0,04	0,34	0,33	0,025	0,031

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

Construcción	Destrucción tras 24 h (pM)	Destrucción tras 48 h (pM)	CD4+ CD69+ (%)	CD4+ CD25+ (%)	CD8+ CD69+ (%)	CD8+ CD25+ (%)
TCB 9D11 anti-FoIR1	2,3	0,1	1,22	1,11	0,071	0,084
TCB 16D5 anti-FoIR1	2,8	0,1	0,69	0,62	0,021	0,028

Ejemplo 16**5 Unión de anticuerpos TCB anti-FoIR1 a eritrocitos y activación de linfocitos T en sangre completa**

Para demostrar que no existe activación espontánea en ausencia de células tumorales que expresan FoIR1, se analizó si existe unión de los clones de FoIR1 a eritrocitos que podrían expresar potencialmente FoIR1. No se pudo observar ninguna unión específica de IgG 9D11, IgG 16D5 e IgG Mov19 a los eritrocitos, incluyendo IgG DP47 de control negativo (figura 8).

Para excluir cualquier unión inespecífica adicional a los glóbulos sanguíneos o la activación inespecífica por medio de TCB anti-FoIR1, se añadieron TCB 9D11, TCB 16D5 y TCB Mov19 a la sangre completa y se analizó la regulación por incremento de CD25 y CD69 en los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺ por citometría de flujo. La TCB DP47 se incluyó como control negativo. No se pudo observar activación de los linfocitos T con ninguna de las construcciones sometidas a prueba al analizar la regulación por incremento de CD25 y CD69 en linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ (figura 9).

Ejemplo 17

20

Destrucción por linfocitos T inducida por TCB 36F2 y TCB 16D5 en diferentes formatos biespecíficos de linfocitos T monovalentes y bivalentes

Se evaluó la destrucción por linfocitos T mediada por anticuerpos TCB 36F2, TCB 16D5, TCB 16D5 clásica, TCB 16D5 1+1 y TCB 16D5 HT de células tumorales humanas HeLa, Skov-3 (expresión media de FoIR1, aproximadamente 70000-90000 copias) y HT-29 (expresión baja de FoIR1, aproximadamente 10000). El anticuerpo TCB DP47 se incluyó como control negativo. Se usaron PBMC humanos como células efectoras y se detectó la destrucción tras 24 h de incubación con el anticuerpo biespecífico. En resumen, se recogieron células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche. Los leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre recién obtenida con PBS estéril y se colocó en una capa sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), se desechó el plasma por encima de la interfase que contenía los PBMC y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo Falcon llenado posteriormente con 50 ml de PBS. Se centrifugó la mezcla (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO₂ al 5 % en estufa de incubación celular hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de destrucción, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 100 nM por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a una proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la destrucción de células tumorales después de 24 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % por cuantificación de LDH liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin construcción biespecífica. Los resultados muestran la destrucción específica de diana de las tres líneas celulares diana FoIR1⁺ inducida por TCB 36F2 y TCB 16D5 (figura 10).

Ejemplo 18

50

Generación de anticuerpos anti-TIM3

Inmunización de ratones Los ratones NMRI se inmunizaron genéticamente, usando un vector de expresión de plásmido que codifica Tim-3 humana de longitud completa mediante la aplicación intradérmica de 100 µg de ADN de vector (plásmido 15304_hTIM3-fl), seguido de electroporación (2 pulsos cuadrados de 1000 V/cm, duración de 0,1 ms, intervalo de 0,125 s; seguido de 4 pulsos cuadrados de 287,5 V/cm, duración de 10 ms, intervalo de 0,125 s). Los ratones recibieron 6 inmunizaciones consecutivas los días 0, 14, 28, 42, 56, 70 y 84. Se extrajo sangre los días 36, 78 y 92 y se preparó suero, que se usó para la determinación de valores mediante ELISA (véase a continuación). Los animales con los valores más altos se seleccionaron para administrarles una dosis de refuerzo el día 96, mediante inyección intravenosa de 50 µg de quimera de Fc humana recombinante de Tim-3 humana, y los anticuerpos

60

monoclonales se aislaron mediante tecnología de hibridoma, mediante fusión de esplenocitos a la línea celular de mieloma 3 días después del refuerzo.

Determinación de los valores en suero (ELISA) La quimera de Fc humana recombinante de Tim-3 humana se inmovilizó en una placa NUNC Maxisorp de 96 pocillos a 0,3 µg/ml, 100 µl/pocillo, en PBS, seguido de: bloqueo de la placa con proteína C al 2 % en PBS, 200 µl/pocillo; aplicación de diluciones sucesivas de antisueros, por duplicado, en proteína C al 0,5 % en PBS, 100 µl/pocillo; detección con anticuerpo antimurino de cabra conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16000). Para todas las etapas, las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C. Entre todas las etapas, las placas se lavaron 3 veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS. Se reveló la señal mediante adición de BM Blue POD Substrate soluble (Roche), 100 µl/pocillo; y se detuvo mediante adición de HCl 1 M, 100 µl/pocillo. Se leyó la absorbancia a 450 nm, frente a 690 nm como referencia. Se definió el valor como la dilución de antisueros dando como resultado una señal semimáxima.

Ejemplo 19

Caracterización de anticuerpos anti-Tim3

ELISA para Tim3 Las placas de estreptavidina Nunc-Maxi Sorp (MicroCoat n.º 11974998/MC1099) se recubrieron con 25 µl/pocillo de ECD-Tim3-His-Biotina (biotinilada con BirA ligasa) y se incubaron a TA durante 1 h mientras se agitaban a 400 rpm. Después del lavado (3x90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 µl de muestras de aTim3 o anticuerpo de referencia aTIM3 F38-2E2 (Biolegend) diluido (1:2) y se incubaron durante 1 h a TA. Después del lavado (3x90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 µl/pocillo anticuerpo de oveja anti-POD murino (GE NA9310V) en dilución 1:9000 y se incubó a TA durante 1 h con agitación a 400 rpm. Después del lavado (4x90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato TMB (Calbiochem, n.º CL07) y se incubó hasta una DO de 1,5-2,5. A continuación, se detuvo la reacción mediante la adición de 25 µl/pocillo de solución de HCl 1 N. La medición tuvo lugar a 370/492 nm. Los resultados del ELISA se muestran como valores de CE50 [ng/ml] de forma resumida en la tabla 17 a continuación.

ELISA en células para Tim3 La línea celular CHO-K1 adherida se transfectó de manera estable con el plásmido 15312_hTIM3-fl_pUC_Neo que codifica Tim3 humana de longitud completa y la selección con G418 (marcador de resistencia a la neomicina en el plásmido) se sembró a una concentración de 1,2 x 10E6 células/ml en placas de fondo plano de 384 pocillos y se cultivó durante la noche.

Al día siguiente, se añadieron 25 µl/pocillo de muestra de Tim3 o de un anticuerpo de referencia aTim3 F38-2E2 sin acida (Biolegend, 354004) y se incubó durante 2 h a 4 °C (para evitar la internalización). Después del lavado (3x90 µl/pocillo de PBST (BIOTEK Washer: Prog. 29, 1 x 90), las células se fijaron mediante eliminación del tampón residual y adición de 50 µl/pocillo de glutaraldehído al 0,05 %: dilución 1:500 de glutaraldehído al 25 % (Sigma, ref. G5882) en tampón 1x PBS y se incubaron durante 1 h a TA. Después del lavado (3x90 µl/pocillo de PBST (BIOTEK Washer: Prog. 21, 3x90 GreinLysin), se añadieron 25 µl/pocillo de anticuerpo secundario para la detección (anticuerpo de oveja anti-POD murino; fragmento F(ab')₂ unido a POD de rábano picante; GE NA9310), seguido de incubación durante 2 h a TA mientras se agitaba a 400 rpm. Después del lavado (3x90 µl/pocillo de PBST (BIOTEK Washer: Prog. 21, 3x90 GreinLysin), se añadieron 25 µl/pocillo de solución de sustrato TMB (Roche 11835033001) y se incubó hasta una DO de 1,5-2,5. A continuación, se detuvo la reacción mediante la adición de 25 µl/pocillo de solución de HCl 1 N. La medición tuvo lugar a 370/492 nm. Los resultados del ELISA de células se enumeran como valores "CE50 CHO-Tim3" [ng/ml] de forma resumida en la tabla 17 a continuación.

Tabla 17: Afinidades de unión de anticuerpos ejemplares (ELISA y BIACORE)

Ensayo	Tim3_0018	Tim3_0021	Tim3_0028	Tim3_0026	Tim3_0033	Tim3_0038
Afinidad KD [nM]	3,4 / 1,1	204 / 4,1	173 / 2,8	6,2 / 1,5	n.f. / 3,1	7,6 / 0,6
Tim3 mono/bivalente						
CE50 ELISA [nM]	0,56		0,22			0,501
CE50 ELISA [ng/ml]	94	47	37	47	1321	83
CE50 CHO-Tim3 [nM]	0,52		0,32			0,17
CE50 CHO-Tim3 [ng/ml]	87	73	53	69	3710	29

Caracterización por BIACore de los anticuerpos anti-Tim3 Se ha usado un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar los parámetros cinéticos de la unión entre varias moléculas de unión a Tim3 murina, así como referencias comerciales que se unen a Tim3 humana. Por lo tanto, se inmovilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón mediante acoplamiento de amina a la superficie de un chip sensor CM5 (BIAcore). A continuación, se capturaron las muestras y se unió ECD-Tim3 hu/cy a ellas. La superficie del chip sensor se regeneró después de cada ciclo de análisis. La constante de equilibrio K_D se obtuvo finalmente ajustando los datos a un modelo de interacción de Langmuir 1:1. Aproximadamente 12000 unidades de respuesta (UR) de 30 µg/ml de anticuerpo anti-IgG de ratón (GE Healthcare n.º BR-1008-38) se acoplaron a los puntos 1, 2, 4 y 5 de las cubetas de lectura 1-4 (los puntos 1, 5 son de anticuerpos activos y los puntos 2, 4 son de anticuerpos de referencia) de un chip sensor CM5 en un BIAcore B4000

a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare.

La muestra y el tampón de migración fueron HBS-EP⁺ (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v, pH 7,4). La temperatura de la cubeta de lectura se configuró a 25 °C y la del compartimento de muestras a 12 °C. El sistema se cebó con tampón de migración. Las muestras se inyectaron durante 30 segundos con una concentración de 200 µg/ml y se unieron a los puntos 1 y 5 de cada cubeta de lectura, lo que permitió la medición de ocho muestras en paralelo. A continuación, se inyectó un conjunto completo (ECD-Tim3 monomérico de macaco cangrejero, ECD-Tim3 monomérico humano y ECD-Tim3 dimérico humano fusionado a huFc) de diferentes concentraciones (véase la tabla X) sobre cada muestra durante 240 s, seguido de un tiempo de disociación de 30/1800 s (véase la tabla 1). Cada ciclo de análisis (captura de muestra, punto 1 y 5, inyección de ECD-Tim3) se regeneró a continuación con una inyección durante 30 segundos de glicina-HCl pH 1,7. El caudal se ajustó a 30 µl/min para todo el ensayo. Finalmente, los datos de doble referencia se introdujeron en un modelo de interacción de Langmuir 1:1 con el programa informático de evaluación BIAcore B4000. Los valores de K_D resultantes se muestran en las tablas 17 y 18.

Tabla 18: Afinidades de unión determinadas por los valores K_D de BIAcore obtenidos por medición cinética de SPR, n.f. significa que no pudo hallarse el valor, muy probablemente debido a la falta de unión o a una unión débil.

Muestra	K_D huTim3 (25 °C) [M]	K_D huTim3Fc (25 °C) [M]	K_D cyTim3 (25 °C) [M]
TIM3-0016	3,29E-09	1,09E-09	2,16E-08
Variante de TIM3-0016 (0018)	3,40E-09	1,11E-09	4,19E-08
TIM3-0021	2,04E-07	4,07E-09	n.f.
TIM3-0022	1,26E-07	1,52E-09	2,84E-08
TIM3-0026	6,23E-09	1,52E-09	n.f.
TIM3-0028	1,73E-07	2,77E-09	n.f.
TIM3-0030	3,11E-09	1,28E-09	n.f.
TIM3-0033	n.f.	3,05E-09	n.f.
TIM3-0038	7,56E-09	5,69E-10	n.f.
Anticuerpo de referencia Biologend F38-2E2	1,36E-08	7,50E-09	1,68E-07
Anticuerpo de referencia USB 11E365	1,34E-08	7,73E-09	1,41E-07

20 Ejemplo 20

Generación de derivados de anticuerpos anti-Tim3

Derivados de anticuerpos quiméricos Los anticuerpos anti-tim-3 quiméricos se generaron amplificando las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos anti-TIM3 de ratón Tim3-0016, variante de Tim3-0016 (0018), Tim3-0021, Tim3-0022, Tim3-0026, Tim3-0028, Tim3-0030 y Tim3-0033, Tim3-0038 a través de PCR y clonándolos en vectores de expresión de cadena pesada como proteínas de fusión con cadena principal de IgG₁ humana / CH1-bisagra-CH2-CH3 humana con mutaciones LALA y PG (leucina 234 a alanina, leucina 235 a alanina, prolina 329 a glicina) anulando funciones efectoras y vectores de expresión de cadena ligera como proteínas de fusión para C-kappa humana. Los plásmidos de LC y HC se cotransfectaron a continuación en HEK293 y se purificaron de los sobrenadantes después de 7 días mediante procedimientos estándar para la purificación de anticuerpos.

Eliminación del sitio de glucosilación NYT: Modificación de la posición 1 de HVR-L1 en Tim3-0016, variante de Tim3_0016 (denominada 0018 o Tim3_0018) mediante sustitución de N por Q o S. Las mutaciones dentro de la región variable de la cadena V ligera de Tim3_0016 y la variante de Tim3_0016 (0018) se generaron mediante mutagénesis *in vitro* usando el "kit de mutagénesis relámpago dirigida al sitio Quick Change" de Agilent de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mediante este procedimiento, la asparagina (N) del motivo NYT del sitio de glucosilación en la HVR-L1 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 4) se reemplazó por glutamina (Q) (dando como resultado SEQ ID NO: 11 = Tim3_0016_HVR-L1 variante 1_NQ) o, de forma alternativa, la asparagina (N) se reemplazó por serina (S) (dando como resultado SEQ ID NO: 12 = Tim3_0016_HVR-L1 variante 2_NS). En ambos, el motivo NYT del sitio de glucosilación se modificó con éxito. Los plásmidos de LC y HC que codifican las variantes se cotransfectaron a continuación en HEK293 y se purificaron de los sobrenadantes después de 7 días mediante procedimientos estándar para la purificación de anticuerpos. Los mutantes generados se sometieron a prueba por ELISA en Tim3 humana, ELISA en Tim3 de macaco cangrejero y ELISA celular en células CHO-K1 adheridas que expresan Tim3 humana de longitud completa. Se encontró que todos los mutantes generados mostraban aún más unión funcional a TIM3 humana (hu), TIM3 de macaco cangrejero (cy) o TIM3 humana en células CHO que los anticuerpos originales Tim3_0016 o la variante del anticuerpo Tim3_0016 Tim3_0018, respectivamente.

Tabla 19:

Mutantes sometidos a prueba	Hu bioq.		Cy bioq.		unión celular CHO-Tim3	
	Valores de CE50 [ng/ml] en relación con el valor máx. de las muestras	Punto de inflexión [ng/ml]	Valores de CE50 [ng/ml] en relación con el valor máx. de las muestras	Punto de inflexión [ng/ml]	Valores de CE50 [ng/ml] en relación con el valor máx. de las muestras	Punto de inflexión [ng/ml]
aTim3 F38 2E2	73,2	88,3	423,0	209871,3	150,2	224,3
aTim3 0018	15,1	15,3	14,6	14,6	26,4	29,4
aTim3 0018 MutNQ	12,0	10,8	13,2	10,8	13,4	12,8
aTim3 0018 MutNS	10,3	6,5	11,9	6,5	11,2	11,1
aTim3 0016 MutNQ	7,6	5,7	8,3	5,7	6,3	5,4
aTim3 0016 MutNS	8,5	5,5	9,7	5,5	9,1	8,5

Ejemplo 21

5 Marcado fluorescente de anticuerpo monoclonal purificado

El marcado fluorescente del anticuerpo monoclonal derivado de hibridoma se llevó a cabo usando el kit de marcado de anticuerpos monoclonales Alexa Fluor 488 (fabricado por Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del marcado, se confirmó que cada anticuerpo estaba realmente marcado con Alexa Fluor 488 (a continuación en el presente documento denominado "Alexa-488") mediante el análisis FACSCalibur (fabricado por BD Biosciences) para células RPMI-8226 y células Pfeiffer que expresan TIM-3.

Ejemplo 22

15 Clasificación de grupos de epítomos de unión mediante ensayo de competencia basado en FACS

La relación de los epítomos entre los anticuerpos anti-TIM3 generados y seis anticuerpos anti-TIM3 de referencia se analizó mediante un ensayo de competencia de unión basado en FACS. Los anticuerpos anti-TIM3 de referencia fueron los siguientes: anticuerpos 4177 y 8213 como se describe en el documento US2012/189617, anticuerpos 1.7E10 y 27.12E12 como se describe en el documento WO2013/06490; anticuerpo 344823 (Clon 344823, fabricado por R&D Systems) y anticuerpo F38-2E2 (Clon F38-2E2, fabricado por BioLegend y R&D Systems). En resumen, se permitió que el anticuerpo de prueba interactuara con y se uniera a las células RPMI-8226 que expresan TIM-3 (ATCC® CCL-155™) y, a continuación, se evaluó mediante un procedimiento de citometría de flujo si otro anticuerpo anti-TIM-3 también se podría unir a las células que expresan TIM-3.

En resumen, las células RPMI-8226 que expresaban TIM3 humana se incubaron con Human BD Fc Block durante 10 min a TA y se tiñeron en dos configuraciones experimentales diferentes para excluir el impacto sobre la unión de la diferencia en la afinidad de los anticuerpos sometidos a prueba:

1) con anti-TIM3 purificado divulgado (10 µg/ml en tampón de tinción BD durante 0,5 h a 4 °C), que se conjugó con Alexa*488 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes A-20181) con un promedio de 2,7 fluoróforos por anticuerpo. A continuación, a) se añadieron anticuerpos anti-TIM3 recombinantes de referencia sin marcar (1-4) o control de isotipo (10 µg/ml) durante 0,5 h a 4 °C en BD SB y, después del lavado con BD SB, se tiñeron con Ab anti-huFcγ marcados con PE (JIR, 109-116-098, 1:200, 0,5 h a 4 °C en BD SB) o b) se añadieron anticuerpos anti-TIM3 de referencia marcados con PE (5-6) disponibles o controles de isotipo apropiados (10 µg/ml) durante 0,5 h a 4 °C en BD SB. Después del lavado y la centrifugación, las señales MFI de las células RPMI-8226 teñidas se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

Tabla 20: Resumen de la caracterización de epítomos.

	% máx. de inhibición de la unión					
	TIM3-0016	TIM3-0018	TIM3-0026	TIM3-0022	TIM3-0028	TIM3-0038
clon 4177	1	-9	29	79	-3	0
clon 8213	-2	9	9	9	38	29
clon 1-7E10	-5	15	24	0	20	7
clon 27-12E12	-1	4	22	40	82	94
clon 344823	0	0	3	102	107	99
clon F38-2E2	-7	-6	2	77	75	94

100	
100	
100	
100	

Los resultados del cartografiado de los grupos de epítomos basado en FACS muestran que Tim3_0016 y la variante de Tim3_0016 Tim3_0018 no muestran competencia de unión con ningún anticuerpo anti-TIM3 de referencia sometido a prueba y se sugirió que estos Ab reconocieron un nuevo epítomo diferente de los epítomos que reconocieron todos los anticuerpos anti-TIM3 de referencia descritos anteriormente, mientras que Tim3_0022, Tim3_0026, Tim3_0028 y Tim3_0038 compiten en diferente grado por la unión a TIM3 expresada en la superficie en células JRPMI-8226 con varios competidores.

Ejemplo 23

Efecto de los anticuerpos anti-TIM3 humanos sobre la producción de citocinas en una reacción de linfocitos mixta (RLM)

Se usó una reacción de linfocitos mixta para demostrar el efecto que tiene el bloqueo de la vía de TIM-3 sobre las células linfocíticas efectoras. Los linfocitos T en el ensayo se sometieron a prueba para evaluar la activación y su secreción de IFN-gamma en presencia o ausencia de un mAAb anti-TIM3.

Se aislaron linfocitos humanos de sangre periférica de un donante sano mediante centrifugación por gradiente de densidad usando Leukosep (Greiner Bio One, 227 288). En resumen, se diluyó la sangre heparinizada con tres volúmenes de PBS y se colocaron alícuotas de 25 ml de la sangre diluida en capas en tubos Leukosep de 50 ml. Después de la centrifugación a 800 x g durante 15 min a temperatura ambiente (sin rotura), las fracciones que contenían linfocitos se recogieron, se lavaron en PBS y se usaron directamente en un ensayo funcional o se resuspendieron en medio de congelación (10 % de DMSO, 90 % de FCS) a 1,0E+07 células/ml y se almacenaron en nitrógeno líquido. En el ensayo de RLM se usó una proporción 1:1 de células diana/respondedoras (es decir, cada cultivo de RLM contenía -2,0E+05 PBMC de cada donante en un volumen total de 200 µl). Los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 Tim3_0016, variante de Tim3_0016 (Tim3_0018), Tim3_0021, Tim3_0022, Tim3_0026, Tim3_0028, Tim3_0030, Tim3_0033, Tim3_0038 y F38-2E2 (BioLegend) se añadieron a cada cultivo en diferentes concentraciones de anticuerpos. No se usó ningún anticuerpo ni anticuerpo de control de isotipo como control negativo y se usó IL-2 rec hu (20 EU/ml) como control positivo. Las células se cultivaron durante 6 días a 37 °C. Después del día 6, se tomaron 100 µl de medio de cada cultivo para la medición de citocinas. Los niveles de IFN-gamma se midieron usando el kit OptEIA ELISA (BD Biosciences).

Los resultados se muestran en la tabla 21 (secreción/liberación de IFN-g). Los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 promovieron la activación de linfocitos T y la secreción de IFN-gamma de manera dependiente de la concentración. Los anticuerpos anti-TIM3 Tim3_0021, Tim3_0022, Tim3_0028 y Tim3_0038 reducen la liberación de la citocina inflamatoria (IFN-gamma) más que el anticuerpo F38-2E2. Tim3_0016, la variante de Tim3_0016 (Tim3_0018), Tim3_0033 y Tim3_0038 mostraron una liberación similar en comparación con el anticuerpo F38-2E2. Por el contrario, los cultivos que contenían el anticuerpo de control de isotipo no mostraron un incremento en la secreción de IFN-gamma.

Tabla 21: Porcentaje de liberación de IFN-gamma inducida por anticuerpos anti-Tim3 en comparación con IL-2 rec hu (20 EU/ml) (= 100 %) como control positivo y ausencia de anticuerpo como control negativo (donantes)

Concentración de compuesto	RLM + IL-2 20 U/ml	Isotipo IgG2a	F38-2E2	Tim3 0016	Tim3 0018	Tim3 0021	Tim3 0022	Tim3 0026	Tim3 0028	Tim3 0030	Tim3 0033	Tim3 0038	Isotipo hlgG1
40 µg/ml		2	36	33	36	112	58	25	40	14	35	51	0
10 µg/ml	100	0	26	22	30	108	38	16	38	4	30	38	5
1 µg/ml		0	7	7	12	101	18	18	12	3	0	1	0

Ejemplo 24

Internalización de anticuerpos anti-TIM-3 en células que expresan TIM-3

Los anticuerpos específicos de TIM-3 descritos en el presente documento se pueden internalizar en células que expresan TIM-3, incluyendo células de linfoma, mieloma múltiple y de LMA que expresan TIM-3. Por ejemplo, se muestra que los anticuerpos específicos de TIM-3 divulgados y fragmentos de los mismos se internalizan en células CHO TIM3 recombinantes que expresan TIM-3 humana de forma estable según se evalúa por ELISA basado en células, citometría de flujo (FACS) y microscopia confocal.

Células CHO-K1 transfectadas de forma estable con Tim3 (clon 8) (4x10⁴ células/pocillo/100 µl) se sembraron en MTP de 98 pocillos usando medio de cultivo fresco. Después de la unión celular durante la noche, se retiró el medio de

cultivo celular y se añadieron los anticuerpos de prueba a las células (10 µg/ml en medio de cultivo celular) y se incubaron durante 0,5 horas a 4 °C. Como referencia se usó un anticuerpo comercial de ratón antihumano (TIM3 MAB11E365 (US Biological, T5469-92P). Después del lavado (2 veces con medio de cultivo celular) y la centrifugación, las células se incubaron durante 3 horas a a) 4 °C o b) 37 °C en 200 µl de medio de cultivo celular. La internalización se produce típicamente a 37 °C, pero no a 4 °C, lo que proporciona otro control para la reacción. A continuación, las células se fijaron con 100 µl/pocillo de glutaraldehído al 0,05 % (Sigma, ref. G5882) en 1x PBS durante 10 min a temperatura ambiente (TA). A esto le siguieron tres etapas de lavado con 200 µl de PBS-T y se añadió el anticuerpo secundario de oveja anti-POD murino (fragmento F(ab')₂ unido a POD de rábano picante; GE NA9310)) durante 1 hora a TA. Después de las etapas finales de lavado (3x PBS-T), se añadió sustrato TMB (Roche, ref. 11835033001) durante 15 min y se detuvo el revelado del color usando HCl 1 N. Las DO finales se determinaron por medición a 450/620 nm en un lector de ELISA. Este procedimiento ELISA en células se usó para la evaluación del rendimiento medio de la capacidad de internalización de los anticuerpos de prueba que se purificaron a partir de sobrenadantes de hibridoma.

El porcentaje de internalización se calculó como sigue:

$$\text{Internalización [\%]} = (1 - \text{DOMuestra}_{37\text{ °C}} / \text{DOMuestra}_{4\text{ °C}}) * 100$$

Los resultados se muestran en las figs. 29A y B para (Internalización). Casi todos los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 sometidos a prueba se internalizaron bien de forma similar en células CHO-K1 transfectadas de forma estable con TIM3 después de 3 h de incubación a 37 °C (no se muestran todos los datos).

La determinación de los valores de CE50 de internalización (dependencia del tiempo), así como la comparación de la cinética de la internalización dependiendo de la monovalencia frente a la bivalencia se estimó mediante FACS para los candidatos seleccionados.

En resumen, se sembraron células CHO-K1 que expresan de forma estable TIM3 humana (4x10⁵ células/pocillo/50 µl) en MTP de fondo en V de 98 pocillos usando medio de cultivo fresco y se incubaron con Redimune[®] NF Liquid durante 10 min a TA para bloquear la unión inespecífica. A continuación, se añadieron 50 µl/pocillo del anti-TIM3 purificado seleccionado (10 µl/ml en medio de cultivo celular) y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Después del lavado (con medio de cultivo celular) y la centrifugación, las células se incubaron durante 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 24 h a a) 4 °C o b) 37 °C en 200 µl de medio de cultivo celular. A continuación, las células se lavaron con PBS/BSA al 1 % y se añadieron anticuerpo secundario de cabra anti-F(ab)₂ de IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488 durante 1 hora a 4 °C. Después del lavado y la centrifugación, se añadieron 125 µl de CellFix (BD Bioscience, 1:1000) y se analizaron las señales MFI de las células teñidas mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

El porcentaje de internalización se calculó como sigue:

$$\text{Internalización [\%]} = (1 - \text{MFI}_{\text{muestra}_{37\text{ °C}}} / \text{MFI}_{\text{muestra}_{4\text{ °C}}}) * 100$$

Ejemplo para la evaluación de la internalización dependiente del tiempo de los anticuerpos anti-TIM3 Tim3_0016, variante de Tim3_0016 (Tim3_0018), Tim3_0021, Tim3_0028, Tim3_0030, Tim3_0033, Tim3_0038 en células RPMI-8226 (ATCC[®] CCL-155[™]):

Los anticuerpos anti-TIM3 divulgados actualmente se internalizan rápidamente en células RPMI-8226 que expresan TIM3 (ATCC[®] CCL-155[™]) a un nivel alto. Los experimentos se realizaron como se describe anteriormente con células RPMI-8226 que expresan TIM3 (ATCC[®] CCL-155[™]) en lugar de células CHO-K1 recombinantes que expresan huTIM3. Los resultados se muestran en la tabla 22. Se usaron los siguientes anticuerpos como anticuerpos anti-TIM3 de referencia: anticuerpo 8213 como se describe en el documento US2012/189617, anticuerpo 27.12E12 como se describe en el documento WO2013/06490. Tim3_0016, la variante de Tim3_0016 (Tim3_0018) y Tim3_0038 se usaron como versiones quiméricas de IgG1 humana.

Tabla 22: Porcentaje de internalización en el punto de tiempo indicado (0 min establecido como 0 por ciento).

Anticuerpo	Porcentaje de internalización de anticuerpos anti-TIM3				
	30 min	60 min	120 min	240 min	26 h
8213	22	22	43	52	72
27.12E12	19	22	25	46	59
Tim3_0016	33	52	55	66	87
Tim3_0018	39	41	80	70	88
Tim3_0021	70	75	74	78	77
Tim3_0028	50	59	67	68	83
Tim3_0033	75	81	82	82	80
Tim3_0038	22	20	45	46	63

Los resultados muestran que los anticuerpos sometidos a prueba se internalizan rápidamente en un alto porcentaje

en comparación con los anticuerpos de referencia en células RPMI-8226 (ATCC® CCL-155™).

Ejemplo 25

5 Unión de anticuerpos anti-TIM-3 a monocitos humanos aislados que expresan TIM-3

Los monocitos CD14+ se aislaron de sangre periférica anticoagulada de donantes sanos por centrifugación por gradiente de densidad usando Ficoll-Paque (GE Healthcare) (véanse los protocolos generales en los manuales de usuario o visite www.miltenyibiotec.com/protocols) y posterior selección positiva por medio de CD14 MicroBeads. En primer lugar, las células CD14+ se marcan magnéticamente con CD14 MicroBeads. A continuación, la suspensión celular se carga en una columna MACS® que se coloca en el campo magnético de un separador MACS. Las células CD14+ marcadas magnéticamente quedan retenidas en la columna. Las células no marcadas atraviesan la columna y esa fracción celular está empobrecida en células CD14+. Después de retirar la columna del campo magnético, las células CD14+ retenidas magnéticamente se pueden eluir como la fracción celular seleccionada positivamente. Después de la centrifugación a 200 x g durante 10 min a temperatura ambiente, los monocitos se recogieron y se usaron directamente en un ensayo de unión o se resuspendieron en medio de congelación (10 % de DMSO, 90 % de FCS) a 1,0E+07 células/ml y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Como se muestra en la literatura, los monocitos expresan constitutivamente TIM3 en su superficie. Se colocaron 1x10⁵ monocitos humanos CD14+ aislados (50 µl/pocillo) en MTP de fondo en V de 98 pocillos en medio de cultivo fresco y se incubaron con Redimune® NF Liquid durante 15 min a TA para bloquear la unión inespecífica. A continuación, se añadieron 50 µl/pocillo de los mAb anti-TIM3 divulgados o de los mAb anti-TIM-3 de referencia 344823 (R&D) y F38-2E2 (BioLegend) (10 µg/ml en medio de cultivo celular) y se incubaron durante 1 h a 4 °C. A continuación, las células se lavaron con PBS/BSA al 1 % y se añadieron anticuerpo secundario de cabra anti-F(ab')₂ de ratón marcado con PE (Jackson Lab 115-006-072) durante 1 hora a 4 °C. Después del lavado y la centrifugación, las señales MFI de las células teñidas se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

La unión específica se calculó como sigue:

Unión específica [MFI] = Media geom. MFI_{muestra} - Media geom. MFI_{control de isotipo}

Los resultados se muestran en la tabla 8: (Unión a monocitos humanos). Los clones de TIM3 Tim3_0016, Tim3_0018, Tim3_0020, Tim3_0028 y Tim3_0038 se unen a monocitos humanos de diferentes donantes incluso mejor que los Ab anti-TIM3 de referencia.

Tabla 23: Unión a monocitos humanos.

	donante 1 (CD14+)	donante 2 (CD14+)	donante 3 (CD14+)
Tim3_0016	2122	1634	1690
Tim3_0018	2326	1818	1943
Tim3_0020	1917	1377	1462
Tim3_0021	1134	951	1197
Tim3_0022	1468	1111	1235
Tim3_0026	1665	1016	900
Tim3_0030	1411	419	466
Tim3_0038	1637	1368	1401
Tim3_0028	1351	950	1607
Tim3_0033	480	328	595
IgG2b de ratón	0	13	0
IgG1 de ratón	144	55	213
mAb <TIM3> PE, IgG1 de ratón (clon F38-2E2; Biolegend)	516	493	460
mAb <TIM3> PE, IgG2A de rata (clon 344823, R&D)	1010	917	814
IgG2A-PE de rata	71	68	70

Ejemplo 26

40 Unión de anticuerpos anti-TIM-3 a monocitos de macaco cangrejero aislados que expresan TIM-3

Los monocitos CD14+ se aislaron de sangre periférica anticoagulada de macaco cangrejero (Covance) mediante centrifugación por gradiente de densidad usando Ficoll-Paque (GE Healthcare) (véanse protocolos generales en los manuales de usuario o visite www.miltenyibiotec.com/protocols) y la posterior selección positiva por medio de microperlas NHP CD14 MicroBeads. En primer lugar, las células CD14+ se marcan magnéticamente con CD14 MicroBeads. A continuación, la suspensión celular se carga en una columna MACS® que se coloca en el campo

magnético de un separador MACS. Las células CD14+ marcadas magnéticamente quedan retenidas en la columna. Las células no marcadas atraviesan la columna y esa fracción celular está empobrecida en células CD14+. Después de retirar la columna del campo magnético, las células CD14+ retenidas magnéticamente se pueden eluir como la fracción celular seleccionada positivamente. Después de la centrifugación a 200xg durante 10 min a temperatura ambiente, los monocitos se recogieron y se usaron directamente en un ensayo de unión o se resuspendieron en medio de congelación (10 % de DMSO, 90 % de FCS) a 1,0E+07 células/ml y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Como se muestra en la literatura, los monocitos expresan constitutivamente TIM3 en su superficie. Se colocaron 1x10⁵ monocitos de macaco cangrejero CD14+ aislados (50 µl/pocillo) en MTP de fondo en V de 98 pocillos en medio de cultivo fresco y se incubaron con Redimune® NF Liquid durante 15 min a TA para bloquear la unión inespecífica. A continuación, se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpo anti-TIM3 marcado con Alexa488 (10 µg/ml en medio de cultivo celular) y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Después del lavado y la centrifugación, las señales MFI de las células teñidas se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

La unión específica se calculó como sigue:

$$\text{Unión específica [MFI]} = \text{Media geom. MFI}_{\text{muestra}} - \text{Media geom. MFI}_{\text{control de isotipo}}$$

Los resultados se muestran en la tabla 9 (Unión a monocitos de macaco cangrejero). Los clones de TIM3 Tim3_0016, Tim3_0018, Tim3_0026, Tim3_0028 y Tim3_0030 se unen a los monocitos de macaco cangrejero de diferentes macacos cangrejeros donantes.

Tabla 24: Unión a monocitos de macaco cangrejero.

	cyno1 (16719M) CD14+	cyno2 (17435M) CD14+	cyno3 (30085F) CD14+
AF+PI	75	83	84
humTIM3-Alexa488 R&D (34482)	158	121	143
IgG2A-Alexa488 de rata	84	86	91
humTIM3 A488 F38-2E2 (NOVUS Biol)	135	136	124
IgG1-Alexa 488 de ratón	72	82	83
Tim3_0016-A488	157	177	187
variante de Tim3_0016 0018-A488	301	480	417
Tim3_0022 A488	115	134	138
Tim3_0026 A488	137	184	197
Tim3_0028 A488	3936	2996	4090
Tim3_0038 A488	97	107	120
Tim3_0020 A488	274	378	354
Tim3_0021 A488	348	473	399
Tim3_0030 A488	119	163	144
Tim3_0033 A488	71	81	83
TIM3 (4177) A488	78	83	85
TIM3 (8213) A488	75	83	87

Ejemplo 27

Unión de anticuerpos anti-TIM-3 a líneas celulares de LNH y MM que expresan TIM-3

La capacidad de unión de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados y de dos clones de anticuerpos anti-TIM3 de referencia (1) 4177 y (2) 8213 (Kyowa) se analizó mediante FACS. En resumen, las células de linfoma de linfocitos B que expresan TIM3 humana (ejemplificadas como células Pfeiffer) y las células de mieloma múltiple (ejemplificadas como células RPMI-8226) se incubaron con Human BD Fc Block durante 10 min a TA para bloquear la unión inespecífica. A continuación, se colocaron 2 x 10⁵ células (50 µl/pocillo) en MTP de fondo en V de 98 pocillos y se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpo anti-TIM3 marcado con Alexa488 (10 µg/ml en tampón de tinción BD) y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Después del lavado y la centrifugación, las señales MFI de las células teñidas se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

La unión específica se calculó como sigue:

$$\text{Unión específica [MFI]} = \text{Media geom. MFI}_{\text{muestra}} - \text{Media geom. MFI}_{\text{control de isotipo}}$$

Los resultados se muestran en las figs. 2A y 2B (Unión a células RPMI-8226 y Pfeiffer).

Ejemplo 10: Actividad citotóxica de anticuerpos anti-TIM-3 en células de LNH y MM que expresan TIM-3

Los anticuerpos específicos de TIM3 conjugados con exotoxina de *Pseudomonas* (PE24) destruyen eficazmente las células que expresan TIM3. La actividad citotóxica de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados y de un clon de anticuerpo anti-TIM3 de referencia disponible comercialmente 11E365 (disponible en US Biological) se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega. En resumen, a 5 x 10³ células CHO-K1 recombinantes que expresan TIM-3 humana (50 µl/pocillo en MTP de 98 pocillos, por triplicado) o 2 x 10⁴ células de linfoma de linfocitos B que expresan TIM3 humana (50 µl/pocillo en MTP de 98 pocillos, por triplicado) (ejemplificadas como células Pfeiffer) o células de mieloma múltiple (ejemplificadas como células RPMI-8226) se añadieron 25 µl/pocillo de dilución sucesiva 1:5 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados con la concentración más alta de 10 µg/ml o medios apropiados para células sin tratar o control de isotipo para células tratadas no diana. El tratamiento varía desde 10 µg/ml hasta 1 ng/ml por triplicado. Todos los anticuerpos se usaron como versiones de Fcγ de ratón de longitud completa. Para la conjugación de la exotoxina de *Pseudomonas* se añadieron 10 µg/ml de Fab específicos de fragmentos Fcγ de ratón conjugados con PE24 y se incubaron durante 3 días a 37 °C. Se usó la cicloheximida como inhibidor conocido de la síntesis de proteínas en eucariotas como control positivo. La viabilidad de las células tratadas se midió con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega.

La actividad citotóxica se calculó como sigue:

$$\text{Inhibición relativa [\%]} = (1 - (\text{Emuestra} - \text{Econtrol negativo}) / (\text{Econtrol positivo} - \text{Econtrol negativo})) * 100$$

Los resultados se muestran en la tabla 25.

Tabla 25: Actividad citotóxica de mAb anti-TIM3 en líneas celulares recombinantes de LNH y MM que expresan TIM-3 en formato de tipo sándwich.

Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	CI50 [nM]		
	células CHO recTIM3	células Pfeiffer	RPMI-8226
Tim3_0016	0,04	0,09	0,55
Variante 1 de Tim3_0016 (Tim3_0018)	0,05	0,10	0,66
Tim3_0020	0,07	0,11	>64
Tim3_0021	0,04	0,10	5,9
Tim3_0022	0,02	0,07	0,36
Tim3_0023	0,03	0,08	>64
Tim3_0026	0,03	0,08	>64
Tim3_0030	0,03	0,10	>64
Tim3_0033	0,11	0,20	0,79
Tim3_0038	0,01	< 0.002	0,16
Clon 11E365 (US Biological)	0,7	1,2	1,1
Células sin Ab	-	-	-
Células + <mFc> Fab PE	-	-	-
IgG2A + <mFc> Fab PE	-	-	-
Cicloheximida	135	181	245

Todos los clones TIM3 sometidos a prueba son altamente potentes (intervalo de CI50 0,01-0,2 nM) en células CHO-K1 recombinantes que expresan TIM-3 humana de forma estable y células Pfeiffer que expresan niveles altos y moderados de TIM-3 e incluso más potentes en cuanto a su actividad citotóxica que el clon 11E365 de anticuerpo anti-TIM-3 de referencia con internalización potente de US Biological. Los clones de TIM3 0016, 0018, 0021, 0022, 0033 y 0038 también son potentes en células RPMI-8226, expresando un nivel de TIM-3 5 veces menor que las células CHO TIM3 recombinantes.

Ejemplo 28: Comparación de la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados frente a dos anticuerpos anti-TIM3 de referencia 1.7E10 y 27.12E12 (como se describe en el documento WO2013/06490).

La actividad citotóxica de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados y de dos anticuerpos anti-TIM3 de referencia, los anticuerpos anti-TIM3 de referencia 1.7E10 y 27.12E12 como se describe en el documento WO2013/06490, se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente. Todos los anticuerpos se usaron con formato de IgG1 humana de longitud completa, incluida la parte del Fcγ humano. En este experimento, la conjugación de la exotoxina de *Pseudomonas* se logró a través de Fab específicos del fragmento Fcγ humano conjugado a PE24 (10 µg/ml) que se añadieron e incubaron durante 5 días a 37 °C.

Los resultados se muestran en la tabla 26.

Tabla 26: Comparación de la actividad citotóxica de mAb anti-TIM3 en líneas celulares de LNH y MM que expresan TIM-3.

Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	células Pfeiffer		células RPMI-8226	
	Destrucción máx.	CI50 rel. [nM]	Destrucción máx.	CI50 rel. [nM]
Cicloheximida	100 [%]	271	100 [%]	111
1.7E10	60,3 [%]	0,68	65,7 [%]	2,544
27-12E12	75,7 [%]	0,02	86,6 [%]	0,111
Tim3_0016	84,9 [%]	0,05	86,6 [%]	0,063
variante de Tim3_0016 (Tim3_0018)	82,9 [%]	0,06	88,1 [%]	0,081
Tim3_0026	78,3 [%]	<0,02	83,1 [%]	0,067
Tim3_002	82,6 [%]	<0,02	83,8 [%]	0,047
Control de isotipo hlgG1	3,2 [%]	N.A	0,4 [%]	N.A

5

Todos los clones TIM3 divulgados son altamente activos (intervalo de CI50 0,02-0,08 nM) en células Pfeiffer y RPMI-8226 que expresan TIM-3 e incluso más potentes en cuanto a su actividad citotóxica que el clon 27.12E12 de anticuerpo anti-TIM-3 de referencia con internalización potente. Todos los anticuerpos se compararon como conjugados de exotoxina de *Pseudomonas* (PE24) usando la misma exotoxina de *Pseudomonas* en las mismas condiciones.

10

Ejemplo 28

Actividad citotóxica de las construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en líneas celulares de MM, LNH y LMA (que expresan TIM3, pero no PSMA).

15

La actividad citotóxica se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente. Se incubaron diluciones sucesivas 1:5 de fragmentos Fab de anticuerpos anti-TIM3 divulgados directamente conjugados a PE24 con la concentración más alta de 50 µg/ml o medio apropiado para células no tratadas o control Fab-PE24 anti-PSMA sin unión para células tratadas no diana con 7,5 x 10³ células Pfeiffer o 2 x 10³ células RPMI-8226 (50 µl/pocillo en MTP de 98 pocillos) durante 4 días a 37 °C. El tratamiento varía desde 50 µg/ml hasta 8 ng/ml por triplicado. Se usó cicloheximida como control positivo.

20

Los resultados se muestran en la tabla 27.

25

Tabla 27: Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en líneas celulares de MM, LNH y LMA.

Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	RPMI-8226		Karpas-299		CMK		TF-1		MOLM-13	
	Destrucción máx.	CI50 [nM]	Destrucción máx.	CI50 [nM]	Destrucción máx.	CI50 [nM]	Destrucción máx.	CI50 [nM]	Destrucción máx.	CI50 [nM]
Cicloheximida	100 [%]	281	100 [%]	113	100 [%]	149,0	100 [%]	207	100 [%]	156
Anti_PSMA	10,5 [%]	N.D.	40,1 [%]	N.D.	8,98 [%]	N.D.	5,27 [%]	N.D.	18,9 [%]	N.D.
Tim3_0022	99,1 [%]	1,9	98,8 [%]	10	67,1 [%]	255	58,6 [%]	299	58,5 [%]	579
Tim3_0016	99,3 [%]	1,1	99,2 [%]	4	64,8 [%]	225	54,2 [%]	534	62,7 [%]	459

30

Todas las construcciones Fab-PE24 sometidas a prueba de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados son altamente potentes (intervalo de CI50 1-10 nM) en células de MM (RPMI-8226) y de LNH (Karpas-299) que expresan un nivel moderado de TIM-3 y demuestran una actividad citotóxica significativa en líneas celulares de LMA (CMK, TF-1, MOLM-13) que expresan niveles muy bajos de TIM-3.

Ejemplo 29

Actividad citotóxica de inmunocombinados (combinados de exotoxina A de *Pseudomonas* (construcciones Fab-PE24) de anticuerpos anti-TIM3 divulgados en células madre/progenitoras de LMA primarias de pacientes recidivantes/resistentes

Se obtuvieron células CD34+ de sangre periférica de pacientes recidivantes/resistentes de AICells, LLC, Alameda, CA, EE. UU. Después de la confirmación de la pureza y la viabilidad de todas las muestras (intervalo de pureza 84-94 % e intervalo de viabilidad 95-99 %), se evaluó el nivel de expresión de TIM-3 por FACS como se describe en el ejemplo 7 usando mAb anti-TIM-3 344823 (R&D). (véase la fig. 31). Todas las muestras de células madre/progenitoras (CD34+) de LMA primarias (4/4) sometidas a prueba de pacientes recidivantes/resistentes demuestran una expresión homogénea de TIM-3 a diferentes niveles.

Para la evaluación de la actividad citotóxica de las construcciones Fab-PE24 de los clones anti-TIM3 0016 y 0022 divulgados en células CD34+ de LMA primarias, se incubaron 1x10⁴ células (50 µl/pocillo en MTP de 98 pocillos, por triplicado) con diluciones sucesivas 1:5 de fragmentos Fab con la concentración más alta de 50 µg/ml o medios apropiados para células no tratadas o control de Fab-PE24 anti-PSMA sin unión para células tratadas no diana durante 3 días a 37 °C. Se usó cicloheximida como control positivo. La actividad citotóxica se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente en el ejemplo 28.

Los resultados se muestran en la tabla 28. (Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en células CD34+ de LMA primarias).

Tabla 28: Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en células CD34+ de LMA primarias.

	D1; células PB0136 CD34+ de LMA		D2; células PB0142 CD34+ de LMA		D3; células PB0135 CD34+ de LMA		D4; células PB0193 CD34+ de LMA	
Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	Destrucción máx.	CI50 [nM]	Destrucción máx.	CI50 [nM]	Destrucción máx.	CI50 [nM]	Destrucción máx.	CI50 [nM]
Cicloheximida	100 [%]	212	100 [%]	262	100 [%]	121	100 [%]	208
anti-PSMA	2 [%]	N.D.	8 [%]	N.D.	18 [%]	N.D.	12 [%]	N.D.
TIM3 0022-cFP	38 [%]	>691	75 [%]	107	31 [%]	>691	57 [%]	375
TIM3 0016-cFP	48 [%]	>691	79 [%]	30	44 [%]	>691	69 [%]	116

Las construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 Tim3_0016 y Tim3_0022 son altamente potentes en muestras de LMA primarias (2/4) (PB0142 y PB0135) (intervalo de CI50 30-116 nM) y demuestran una actividad citotóxica significativa en todas las células madre/progenitoras (CD34+) de LMA primarias (4/4) que expresan diferentes niveles de TIM-3.

Ejemplo 30

Comparación de la potencia de las construcciones Fab-PE24 de anticuerpos anti-TIM3 seleccionados en líneas celulares de LNH y MM

La evaluación de la actividad citotóxica de las construcciones Fab-PE24 acopladas a sortasa de anticuerpos anti-TIM3 divulgados seleccionados se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente en el ejemplo 28.

Los resultados se muestran en la tabla 29.

Tabla 29: Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de anticuerpos anti-TIM3 seleccionados en células de LNH y MM.

	células Pfeiffer		células RPMI-8226	
Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	Destrucción máx.	CI50 [nM]	Destrucción máx.	CI50 [nM]

Cicloheximida	100 [%]	271,1	100 [%]	153
anti-PSMA	25,2 [%]	N.D.	21,5 [%]	N.D.
TIM3 0022	99,9 [%]	1,58	99,6 [%]	2,14
TIM3 0016	99,6 [%]	0,77	99,2 [%]	0,61
TIM3 0021	98,4 [%]	2,15	99,1 [%]	3,61
TIM3 0033	99,8 [%]	5,30	99,7 [%]	5,73
TIM3 0038	99,6 [%]	0,47	98,3 [%]	0,32

Se demostró una alta potencia citotóxica con las construcciones Fab-PE24 de todos los anticuerpos anti-TIM3 divulgados seleccionados (intervalo de CI50 0,3-5 nM) en células de LNH (Pfeiffer) y MM (RPMI-8226) que expresan un nivel moderado de TIM-3.

La actividad citotóxica más alta se observó con las construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 Tim3_0016 y Tim3_0038 divulgados.

Ejemplo 31

Comparación de la actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 frente al conjugado IgG total-amatoxina del mismo clon del anticuerpo anti-TIM-3 divulgado en células Pfeiffer

La evaluación de la actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 conjugada del clon anti-TIM3 0016 divulgado frente a la IgG total del mismo clon conjugada con amatoxina (de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO2012/041504 (conjugado a través del átomo de C6' del aminoácido 4 de amatoxina, en particular a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C6' del aminoácido de amatoxina, y en el que el anticuerpo anti-TIM3 está conectado por un conector a través de un resto de urea)) se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente en el ejemplo 12. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30: Actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 frente al conjugado IgG total-amatoxina del clon anti-TIM3 0016 en células de LNH

células Pfeiffer	Destrucción máx.	CI50 [nM]
Cicloheximida	100 [%]	163
Isotipo hlgG1-amatoxina	28 [%]	N.D.
TIM-3 0016-amatoxina	93,3 [%]	0,81
TIM-3 0016-PE24	99,8 [%]	0,25

La actividad citotóxica del clon anti-TIM-3 0016 conjugado con amanitina (CI50 0,8 nM) es comparable a la actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 del mismo clon (CI50 0,3 nM) en células de LNH (Pfeiffer) que expresan un nivel moderado de TIM-3.

Ejemplo 32

Procesamiento de muestras de pacientes y tumores

Se recogieron lesiones tumorales sólidas recién extirpadas y derrames neoplásicos de 34 pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico, 7 pacientes con cáncer de ovario y 1 paciente con carcinoma de células renales (CCR). Las lesiones tumorales sólidas se disociaron mecánicamente y se hidrolizaron usando accutasa (PAA), colagenasa IV (Worthington), hialuronidasa (Sigma) y DNasa de tipo IV (Sigma) directamente después de la escisión. Se prepararon suspensiones unicelulares. La fracción celular de los derrames neoplásicos se aisló mediante centrifugación por gradiente de densidad usando Histopaque-1119 (Sigma). Todas las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso posterior. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Ética local (Ethikkommission Nordwestschweiz).

Ejemplo 33

Caracterización de muestras tumorales

Todas las muestras tumorales se caracterizaron exhaustivamente mediante citometría de flujo multicolor. Se usaron los siguientes anticuerpos para el análisis por citometría de flujo: α -CD4-PE, α -CD8-PE-Cy7, α -CD11b-PerCP-eFluor710, α -CD45-PE-Cy7, α -CD45-PerCP-Cy5.5, α -CD137-FITC, α -BTLA-4-PE, α -CTLA-4-PE, α -ICOS-FITC, α -IFN- γ -FITC, α -Lag-3-APC (todos de eBioscience), α -CD3-PECF594, α -CD25-BV605, α -CD69-FITC, α -Epcam-FITC, α -granzima B-PE, α -caspasa activa 3-PE, α -PD-1-BV605, estreptavidina-BV711 (todos de BD Bioscience), α -CD45RA-BV421, α -CCR7-AlexaFluor647, α -FoxP3-AlexaFluor647, α -Tim-3-BV421, α -Tim-3-BV605 (todos de Biolegend). Las células muertas se tiñeron con el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD® Fixable near-IR o el kit de tinción de

células muertas LIVE/DEAD® Fixable Blue (Invitrogen). Para las tinciones intracelulares se usaron tampones de fijación y permeabilización de eBioscience. Se adquirieron muestras para el análisis por citometría de flujo en un BD LSR Fortessa. Los kits ELISA de IL-2, IFN- γ y TNF humanos se obtuvieron todos de BD Bioscience.

5 Los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ (CD45⁺ CD3⁺) se caracterizaron para determinar la expresión de los marcadores de superficie PD-1, Tim-3, CTFA-4, Fag-3, BTFA, CD25, CD69, CD137, ICOS, CD45RA y CCR7. Las células tumorales (CD45⁻ Epcam⁺) se caracterizaron para determinar la expresión de FolR1 comparando la unión de un anticuerpo específico de FolR1 con su control de isotipo correspondiente. Para el tratamiento con TCB anti-FolR1 solo se usaron las muestras que dieron positivo para la expresión de FolR1 y para el tratamiento con catumaxomab se usaron las
10 muestras que expresaron EpCAM, respectivamente.

Ejemplo 34

Tratamiento *ex vivo* de muestras tumorales con TCB anti-FolR1

15 Los hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos positivos para FolR1 se descongelaron, se lavaron y se sembraron en placas de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos (BD Falcon) con una densidad de 3×10^5 células/200 μ l/pocillo en medio completo (DMEM + piruvato de sodio (1 mM) + AA MEM no esenciales (1x) + L-glutamina (2 mM) + penicilina/estreptomicina (100 ng/ml) + 2-mercaptoetanol (50 nM) + ciproxina (1 mg/ml) + suero humano al 10 %). Las
20 muestras se cultivaron en presencia o ausencia de TCB anti-FolR1 o TCB DP47 a una concentración de 2 nM durante 24 h. La activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ (CD45⁺ CD3⁺) tras el tratamiento con TCB anti-FolR1 se determinó mediante citometría de flujo multicolor midiendo la expresión de los marcadores de superficie celular CD25, CD69, CD137, ICOS, PD-1 y Tim-3. Además, se determinó la expresión de granzima B e IFN- γ mediante tinción intracelular. La concentración de IL-2 en los sobrenadantes del cultivo celular se midió mediante ELISA (kit ELISA de IL-2 humana, BD OptEIA) siguiendo las instrucciones del fabricante.
25

Ejemplo 35

Tratamiento *ex vivo* de muestras tumorales con catumaxomab

30 La TCB trifuncional catumaxomab (Removab®) se obtuvo de Fresenius. Las condiciones experimentales fueron similares a las indicadas anteriormente para TCB anti-FolR1. En resumen, se cultivaron hidrolizados tumorales o derrames neoplásicos positivos para EpCAM en presencia o ausencia de catumaxomab a una concentración de 10 ng/ml durante 24 h. El análisis de linfocitos T positivos CD8⁺ y CD4⁺ (CD45⁺ CD3⁺) se realizó como se describe
35 anteriormente.

Ejemplo 36

Ensayo de destrucción

40 Para determinar la destrucción de células tumorales inducida por TCB anti-FolR1, se cocultivaron 3×10^4 células Skov3 marcadas con CFSE con las muestras tumorales en presencia o ausencia de TCB anti-FolR1 a una concentración de 2 nM durante 24 h en placas de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos. La proporción E:T (E: células efectoras CD45⁺ CD3⁺; T: células diana FolR1⁺ del tumor y células Skov3 añadidas) se ajustó a 1:1 en cada pocillo y se calculó
45 el número de células de las muestras tumorales añadidas para cada muestra de acuerdo con la caracterización previa por citometría de flujo. La destrucción celular de las células Skov3 se determinó por citometría de flujo midiendo la caspasa 3 activada y el marcador vivo/muerto Live/Dead-near-IR. El ensayo se realizó por triplicado. La destrucción mediada por TCB anti-FolR1 se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: % de destrucción específica = $100 - [(\% \text{ de células Skov3 vivas en la muestra tratada con TCB anti-FolR1} / \% \text{ de células Skov3 vivas en la muestra sin tratar}) \times 100]$.
50

Para comparar la capacidad de destrucción de linfocitos T inducida por TCB anti-FolR1 entre muestras tumorales y para excluir factores adicionales que inhiben la funcionalidad de los linfocitos T, tales como la expresión de PD-L1 en las células tumorales, se añadieron exógenamente células Skov3 FolR1⁺ marcadas con CFSE a los hidrolizados tumorales y se ajustó la proporción E:T a 1:1, esencialmente como se describe anteriormente. A continuación, se midió la destrucción inducida por TCB anti-FolR1 de las células Skov3 marcadas con CFSE, lo que permitió también incluir las muestras tumorales FolR1⁻ en el análisis. Dado que algunos tumores de la cohorte inicial no se pudieron usar para caracterizar la destrucción de células tumorales mediada por TCB debido a una cantidad muy baja de células efectoras, se analizó una cohorte separada de 12 hidrolizados tumorales y 5 derrames neoplásicos de 15 pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) y dos pacientes con carcinoma ovárico epitelial (COE). Se caracterizaron
60 todas las muestras para determinar su contenido de células efectoras CD3⁺ y células diana FolR1⁺ (fig. 39). La destrucción de células tumorales de linfocitos T CD3⁺ de pacientes se comparó con la de linfocitos T derivados de PBMC de donantes sanos. Se observó una heterogeneidad sustancial en la destrucción de células tumorales entre pacientes individuales ($26 \pm 11,8$ %) después de 24 h (fig. 12O). Cabe destacar que los linfocitos T CD3⁺ de donantes sanos indujeron una destrucción significativamente mejor que los TIF ($42,8 \pm 9,7$ %, $p=0,013$). La exposición a una TCB de control sin unión a un antígeno tumoral (TCB DP47) no indujo ninguna destrucción de células tumorales.
65

Ejemplo 37**Estimulación policlonal con anticuerpos anti-CD3/CD28**

5 Se recubrió previamente una placa de fondo plano de 96 pocillos con 0,5 µg/ml de anti-CD3ε (clon OKT3, Biolegend) durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se eliminó la solución de anticuerpo y la placa se lavó ampliamente. Las suspensiones tumorales congeladas se descongelaron, se lavaron y se cultivaron a 3x10⁵ células/200 µl/pocillo en medio completo con 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD28 (clon 28.2, eBioscience) durante 24 h. Después de 24 h de incubación, las células se recogieron, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores de activación, por ejemplo, funciones efectoras de linfocitos T y CD25, por ejemplo, granzima B e IFN-γ en linfocitos T CD8⁺. Se recogieron los sobrenadantes para ELISA de IL-2, IFN-γ y TNF-α, que se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 38**Restablecimiento de la función de los linfocitos T por bloqueo de PD-1**

20 Los hidrolizados tumorales se estimularon mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 agonistas como se describe anteriormente en presencia o ausencia de 10 µg/ml de anticuerpo anti-PD-1 (MDX5C4) por pocillo y se incubaron durante 24 h. Después de 24 h, las células se recogieron, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Se recogieron los sobrenadantes para ELISA de IL-2, IFN-γ y TNF-α, que se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 39**Activación de linfocitos T en hidrolizados tumorales y derrames neoplásicos por TCB anti-FolR1**

30 Roche Glycart proporcionó los anticuerpos biespecíficos de linfocitos T que se unen a CD3 y al receptor de folato 1 (TCB anti-FolR1 basada en Mov19 y el anticuerpo de control TCB DP47). El anticuerpo anti-PD-1 5C4 se describe en la patente de EE. UU. n.º 8.008.449. Se usó el anticuerpo anti-TIM3 F38-2EL. Para la caracterización por citometría de flujo de la expresión de FolR1, se usó el anticuerpo anti-FolR1-APC (aa25-233) de LifeSpanBiosciences y su control de isotipo correspondiente (Biolegend). Se caracterizaron las lesiones tumorales de 15 pacientes con tumores FolR1⁺ para determinar la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FolR1. Las muestras consistieron en 9 suspensiones unicelulares y 6 derrames neoplásicos derivados de pacientes con CPNM (n=7), cáncer de ovario (n=7) y cáncer de células renales (n=1). La cantidad de linfocitos T CD3⁺ y de células tumorales FolR1⁺ fue altamente variable entre pacientes (CD3⁺: media de 33,9 % ± desviación estándar de 16,6 %, FolR1⁺: 17,1 % ± 16,8 %). La caracterización de la expresión de los receptores inhibidores PD-1, Tim-3, CTLA-4, Lag- y BTLA en linfocitos T reveló una gran heterogeneidad entre los pacientes (fig. 11A-B). Mientras que los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores mostraron niveles elevados de PD-1, Tim-3 y CTLA-4 (31,6 % ± 25 %; 22,2 % ± 20,8 % y 18,7 % ± 14,4 %, respectivamente), Lag-3 y BTLA solo se expresaron en una minoría de células en todos los pacientes de esta cohorte (3,5 % ± 4,9 % y 2,3 % ± 1,7 %, respectivamente). Los receptores inhibidores en linfocitos T CD4⁺ se distribuyeron de forma similar, con una expresión ligeramente mayor de CTLA-4.

45 Para determinar la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FolR1, se cultivaron muestras de tumor en presencia o ausencia de TCB anti-FolR1 o del control TCB DP-47. A continuación, se caracterizaron los linfocitos T por citometría de flujo multicolor para determinar la expresión de marcadores de activación y funciones efectoras de los linfocitos T, como se describe anteriormente. Las figuras 12A-O revelan una gran heterogeneidad en la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FolR1 entre pacientes. En particular, mientras que la gran mayoría de los pacientes ya expresaban CD69 antes de iniciar el tratamiento, se observó una regulación por incremento de CD25, CD137 e ICOS, que variaba del 9 al 80 %, del 2,5 al 50 % y del 3,5 al 71 %, respectivamente. Se observó la adquisición de funciones efectoras tales como la secreción de IFN-γ, la desgranulación de CD107 y la expresión de granzima B, en un intervalo del 3,7 al 59 %, una tasa de cambio de 1-7 o 1,3-64 veces, respectivamente (fig. 12A-I). Los receptores inhibidores PD-1 y TIM3 se regularon por incremento adicionalmente como un marcador de activación tras el tratamiento con TCB anti-FolR1, independientemente de su valor de referencia de expresión. La exposición a TCB DP-47 no indujo ninguna activación de linfocitos T. La regulación por incremento de CD25 e ICOS inducida por la estimulación con TCB anti-FolR1 fue significativamente más fuerte en linfocitos T CD8⁺ periféricos de donantes sanos que en linfocitos T CD8⁺ derivados de tumores (p=0,002 y p<0,001, respectivamente; fig. 12J, fig. 12L, fig. 12M). La secreción de citocinas efectoras IFN-γ, IL-2 y TNF de linfocitos T tras la estimulación con TCB anti-FolR1 disminuyó en gran medida entre los TIL en la mayoría de los tumores en comparación con las PBMC de donantes sanos (p=0,0047, p<0,001 y p=0,006, respectivamente; fig. 12N). La secreción de perforina inducida por TCB anti-FolR1 fue altamente variable en los TIL y se vio gravemente alterada en un subconjunto de pacientes (fig. 12N).

65 De forma similar, a pesar de una regulación por incremento menor de la granzima B, las TCB anti-FolR1 indujeron la activación y adquisición de funciones efectoras de los linfocitos T CD4⁺ (fig. 25A-I). Para evaluar si la abundancia de linfocitos T intratumorales o la expresión de FolR1 afecta a la activación de los linfocitos T tras la exposición a TCB,

se correlacionó la regulación por incremento de los marcadores de activación con la proporción E:T (E: linfocitos T CD45⁺ CD3⁺ efectoras; T: células FoIR1⁺) y con el porcentaje y el nivel de expresión del antígeno tumoral de las células FoIR1⁺ (fig. 13A-C). Este último se determinó por medio de la intensidad de fluorescencia media de FoIR1 en células tumorales (CD45⁺ EpCAM⁺) usando citometría de flujo (fig. 13C). Sin embargo, ninguno de estos parámetros influyó en la activación de los linfocitos T, es decir, incluso cantidades bajas de células FoIR1⁺, proporciones E: T altas o infiltración deficiente de linfocitos T han sido suficientes para una regulación por incremento eficaz de los marcadores de activación y funcionales. Además, la presencia de poblaciones de células potencialmente inmunosupresoras, tales como los linfocitos T reguladores o las células mieloides inmaduras, no influyó en la activación de los linfocitos T ni en la función de los linfocitos T.

Ejemplo 40

Activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 inversamente correlacionada con la expresión de PD-1 y Tim-3

La alta expresión de receptores inhibidores se ha descrito como un rasgo característico de linfocitos T agotados. Por lo tanto, un estado disfuncional de los linfocitos T infiltrantes de tumores puede afectar a la eficacia de las TCB anti-FoIR1 y puede ser responsable, al menos en parte, de la activación heterogénea de los linfocitos T tras la exposición a TCB. Para ello, se correlacionó la coexpresión de receptores inhibidores, determinada antes de iniciar el tratamiento, con la regulación por incremento inducida por TCB anti-FoIR1 de los marcadores de activación y las funciones efectoras de los linfocitos T. De este modo, tanto la expresión de PD-1 como la de Tim-3 en linfocitos T CD8⁺ se correlacionaron negativamente con la activación de linfocitos T determinada por la expresión de CD25, CD137 e ICOS. Los linfocitos T CD8⁺ con una alta expresión de PD-1 o Tim-3 mostraron un efecto marginal sobre el tratamiento con TCB anti-FoIR1, mientras que los linfocitos T con una expresión baja de estos receptores inhibidores se podrían activar fuertemente tras el tratamiento con TCB anti-FoIR1 (fig. 14A-I). La medición de la secreción de IL-2 inducida por TCB anti-FoIR1 normalizada al contenido de linfocitos T en las muestras reveló las mismas dependencias de la expresión de PD-1 y Tim-3 (fig. 15A-C), mientras que la regulación por incremento inducida por TCB anti-FoIR1 de granzima B era menos dependiente de la expresión previa de estos receptores inhibidores (fig. 14J-L). De forma interesante, el valor de referencia de expresión de CTLA-4, Lag-3 y BTLA en linfocitos T CD8⁺ no se correlacionó con la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 (fig. 26A-C). La expresión de receptores inhibidores en linfocitos T CD4⁺ tenía mucha menos capacidad predictiva de la activación de linfocitos T CD4⁺ inducida por TCB anti-FoIR1 en comparación con la expresión de los mismos receptores en linfocitos T CD8⁺.

Ejemplo 41

Destrucción de células tumorales inducida por TCB anti-FoIR1 inversamente correlacionada con la expresión de PD-1 y Tim-3

Para investigar la destrucción de células tumorales inducida por TCB anti-FoIR1 a una proporción E:T ajustada de 1:1, se añadieron exógenamente células Skov3 marcadas con CFSE a los hidrolizados tumorales que contenían una cantidad previamente determinada de linfocitos T CD3⁺ usando citometría de flujo multicolor. La destrucción de células Skov3 inducida por TCB anti-FoIR1 se determinó midiendo la caspasa 3 activada y un marcador vivo/muerto. De acuerdo con la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 medida por la regulación por incremento de CD25, la destrucción específica tras la exposición a TCB anti-FoIR1 se correlacionó negativamente con la expresión única o coexpresión de PD-1 y TIM3 en linfocitos T CD8⁺. Además, la destrucción inducida por TCB anti-FoIR1 también se vio influida por el valor de referencia de expresión de CTLA-4 y la coexpresión de PD-1 y CTLA-4. Sin embargo, el impacto de la expresión de CTLA-4 en la destrucción de células tumorales inducida por TCB anti-FoIR1 fue menos pronunciado en comparación con la expresión de PD-1 y Tim-3.

Ejemplo 42

Tratamiento de lesiones tumorales recientes con catumaxomab: activación de linfocitos T infiltrantes de tumores usando catumaxomab y correlación con la expresión de receptores inhibidores

Para determinar en qué medida el catumaxomab induce la activación de los linfocitos T y confirmar los hallazgos descritos anteriormente usando una segunda molécula biespecífica de linfocitos T independiente, se expusieron 4 hidrolizados tumorales de pacientes con CPNM a catumaxomab, un anticuerpo biespecífico trifuncional que reconoce CD3 en linfocitos T y EpCAM en células tumorales. A continuación, se caracterizaron los linfocitos T por citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores de activación y funciones efectoras de los linfocitos T (fig. 17A-D). Tras la validación de los datos anteriores para TCB anti-FoIR1, se observó una sorprendente heterogeneidad en la activación de linfocitos T inducida por catumaxomab. En consecuencia, el valor de referencia de expresión de los receptores inhibidores difirió entre los pacientes (fig. 17E-H).

El análisis de la activación y la función efectora de linfocitos T tras el tratamiento con catumaxomab reveló dos grupos de pacientes de acuerdo con la expresión de PD-1 y/o Tim-3 en linfocitos T CD8⁺, lo que confirma los hallazgos con TCB anti-FoIR1 (fig. 18A-R). Las células con expresión de PD-1^{baja}, TIM3^{baja} e, incluso más pronunciado, tanto PD-

^{1baja} como Tim-3^{baja}, no pudieron ser activadas por catumaxomab, mientras que en los linfocitos T con expresión de PD-1^{alta}, TIM3^{alta} y PD-1^{alta}/Tim-3^{alta} se observó una regulación por incremento sustancial de CD25, CD69, CD137, ICOS, granzima B e IFN- γ .

5 Ejemplo 43

Estimulación policlonal de linfocitos T infiltrantes de tumores por CD3/CD28 - Fenotipado inmunitario de subconjuntos de linfocitos T infiltrantes de tumores en muestras de carcinoma de pulmón no microcítico

10 Se investigó la expresión de receptores de linfocitos T coinhibidores y marcadores de diferenciación en subconjuntos de linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ y CD3⁺ CD4⁺ infiltrantes de tumores de 34 pacientes con CPNM usando citometría de flujo multicolor. La mayoría de los tumores mostraron una alta expresión del receptor inhibidor PD-1 (fig. 19A-B), un importante regulador del agotamiento de linfocitos T. Cabe destacar que la expresión de otros inhibidores de puntos de control tales como Tim-3, CTLA-4, LAG-3 o BTLA mostró una variación sustancial entre los linfocitos T obtenidos de diferentes tumores (fig. 19A-B).

15 Ejemplo 44

La expresión acumulada de receptores inhibidores define la disfunción de los linfocitos T

20 En este ejemplo se usó la estimulación policlonal en una dosis subóptima para evaluar el impacto de los receptores inhibidores sobre la función de los linfocitos T. El efecto de la estimulación con anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28 sobre la activación de los linfocitos T, ejemplificado por la expresión de CD25, y sobre la función efectora de los linfocitos T, analizada por la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2, así como la expresión de granzima B varió sustancialmente entre los pacientes según se determinó mediante citometría de flujo (figura 20A-B) y ELISA (figura 20C-E). Cabe destacar que se observaron diferentes niveles de función de linfocitos T, que variaban desde las poblaciones de linfocitos T que presentaban una función de linfocitos T ampliamente preservada (es decir, expresión mantenida de CD25 y granzima B, así como producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α) hasta aquellas con función de linfocitos T anulada (pérdida de expresión de CD25 y granzima B y de producción de citocinas).

30 Para analizar el impacto de múltiples receptores inhibidores sobre la funcionalidad de los linfocitos T, se definió la puntuación de receptor inhibidor (iR) como un marcador de la expresión acumulada de receptores inhibidores en los linfocitos T. Para ello, se analizó el porcentaje de expresión de PD-1, Tim-3, CTLA-4, Lag-3 y BTLA en todas las muestras de CPNM y se definió y calculó una puntuación basada en la mediana y los intervalos intercuartílicos de cada receptor expresado para cada muestra (por ejemplo, fig. 21F). Los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores que presentan una puntuación iR alta indicativa de la expresión de múltiples receptores inhibidores mostraron un efecto marginal sobre la estimulación policlonal, que se correlaciona con su estado altamente disfuncional, mientras que los linfocitos T con una puntuación iR baja se podrían activar fuertemente tras la estimulación policlonal (fig. 21A-E). La regulación por incremento de las funciones efectoras de los linfocitos T, indicada por la producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α , no solo se correlaciona con la expresión acumulada de receptores inhibidores, sino de manera similar con la expresión de PD-1 y Tim-3, así como con la coexpresión de ambos receptores (fig. 22A-I), lo que indica una contribución significativa de PD-1 y TIM3 a la disfunción de los linfocitos T.

45 Ejemplo 45

Expresión de receptores inhibidores

50 La expresión única y acumulada de receptores inhibidores se incrementa con la progresión del tumor. La expresión de receptores inhibidores se correlacionó con el estadio del tumor y la progresión del tumor. El número de células positivas para PD-1, Tim-3 y LAG-3 se incrementó claramente en los estadios tumorales avanzados (fig. 21G-K). No se observó una correlación clara para la expresión de CTLA-4, lo que puede indicar que este receptor actúa por medio de un mecanismo inhibitorio diferente. El BTLA se expresó en general a un nivel bajo y solo se encontró un pequeño incremento en los estadios tumorales avanzados (fig. 21K). Se observó un incremento significativo en la expresión acumulada de receptores inhibidores, como se refleja en la *puntuación iR*, en pacientes con cánceres con afección ganglionar y estadios tumorales avanzados, mientras que el tamaño del tumor primario no se correlacionó significativamente con la *puntuación iR* (fig. 21L-M). Estos datos sugieren una regulación por incremento gradual y continua de los receptores inhibidores, durante la progresión del tumor, que muy probablemente estén implicados en el agotamiento de linfocitos T en el CPNM.

60 Los receptores inhibidores se expresan gradualmente en los linfocitos T infiltrantes de tumores. Para explorar el papel de la expresión simultánea de distintos receptores inhibidores sobre linfocitos T individuales, se analizó la expresión concomitante de estos receptores en linfocitos T CD8⁺ (figs. 32, 33) en relación con la expresión de cualquiera de los cinco receptores analizados. La expresión se muestra como matriz cromática, mostrando el porcentaje de expresión para los pacientes individuales (fig. 32) o como un trazado de radar, que muestra la expresión como media y desviación estándar de los cuatro receptores respectivos en linfocitos T CD8⁺, preseleccionados para el quinto punto de control inmunitario indicado (fig. 33). Los linfocitos T CD8⁺ PD-1⁺ expresaron en promedio los porcentajes más bajos de otros

receptores inhibidores, mientras que los linfocitos T CD8⁺ BTLA⁺ expresaron los otros cuatro receptores inhibidores en niveles altos, lo que indica que BTLA marca un subconjunto de linfocitos T en particular agotado (figs. 32, 33). Se observó un incremento en el número de receptores inhibidores coexpresados desde los linfocitos T CD8⁺ Tim-3⁺ pasando por los linfocitos T CD8⁺ CTLA-4⁺ hasta los linfocitos T CD8⁺ LAG-3⁺ (figs. 32, 33). Estos hallazgos sugieren una adquisición gradual de receptores inhibidores con PD-1 como un marcador temprano ampliamente expresado, mientras que la regulación por incremento de BTLA se produce bastante tarde durante el agotamiento de los linfocitos T.

Ejemplo 46

El bloqueo de PD-1 puede restablecer parcialmente la función de los linfocitos T

La recuperación de la función de los linfocitos T por anticuerpos bloqueantes anti-PD-1 depende del nivel de expresión de PD-1. Dado que se encontró una clara correlación entre la expresión de receptores inhibidores, en particular PD-1 y Tim-3, y la activación de los linfocitos T tras la estimulación policlonal, el bloqueo de las vías de PD-1 o PD-1/Tim-3 podría restablecer la función de los linfocitos T. Sin embargo, la adición de un anticuerpo bloqueante de PD-1 (5C4) o el bloqueo combinado de PD-1 y Tim-3 tras la estimulación con anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28 podrían restablecer la función efectora de los linfocitos T, tal como la producción y secreción de IL-2, IFN- γ y TNF- α solo en algunos pacientes, mientras que en otros pacientes solo se observó un efecto marginal (fig. 23A-D). Como se observó en un modelo murino de infección crónica por LCMV (Blackburn *et al.*, PNAS 105(39): 15016 (2008)), se identificaron subconjuntos con expresión de PD-1^{alta} y PD-1^{int} en linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores de pacientes con CPNM. En resumen, se podrían identificar los subconjuntos con expresión de PD-1^{alta}, PD-1^{int} y PD-1^{neg} en función de su intensidad de fluorescencia medida. Se analizaron células de 33 pacientes para determinar la expresión de PD-1 para definir parámetros uniformes para el discernimiento reproducible de los tres subconjuntos. El análisis cubrió todo el espectro de niveles de expresión de PD-1 e incluyó muestras tumorales con poblaciones PD-1^{neg} o PD-1^{alta} claramente diferenciadas. Esto permitió establecer los límites de este análisis, que a continuación se aplicó a todas las muestras.

Solo los subconjuntos de linfocitos T que expresan PD-1^{int} parecían recuperar la activación tras el bloqueo de PD-1 o PD-1/Tim-3 combinado, mientras que no se observó ningún efecto en la activación de los linfocitos T tras el bloqueo en las células con PD-1^{alta} (fig. 24). Este último subconjunto puede presentar un fenotipo más agotado que parece ser resistente al bloqueo de PD-1 solo.

Este hallazgo fue confirmado en linfocitos T activados por TCB anti-FoIR1. Los linfocitos T se estimularon con FoIR1 como se describe anteriormente. El bloqueo de PD-1 fortaleció aún más la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 de los linfocitos T de un subconjunto de pacientes.

La medición de la secreción de IFN- γ , TNF e IL-2 inducida por TCB anti-FoIR1 normalizada al contenido de linfocitos T en las muestras reveló que, en las poblaciones de células de pacientes con una cantidad sustancial de células con expresión de PD-1^{alta} (aproximadamente > 15 %), no se pudieron secretar estas citocinas. Por el contrario, la secreción de citocinas se podría inducir en la mayoría de las poblaciones de células de pacientes con una menor cantidad de células con expresión de PD-1^{alta} (aproximadamente < 15 %) (figura 27A-C). En el último grupo, la adición de un anticuerpo bloqueante de PD-1 o el bloqueo combinado de PD-1 y Tim-3 tras la estimulación con TCB anti-FoIR1 incrementó la producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α (figura 28A-F). Por lo tanto, el subconjunto con expresión de PD-1^{alta} puede presentar un fenotipo más agotado que parece ser resistente al bloqueo de PD-1 solo.

Por tanto, las funciones efectoras de los linfocitos T, tal como la producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α , se podrían recuperar en los TIL de algunos pacientes con CPNM, mientras que en otros pacientes solo se podría lograr una recuperación marginal de las funciones de los linfocitos T. El incremento de la producción de citocinas tras la exposición a la estimulación anti-CD3/CD28 en combinación con el anticuerpo bloqueante de PD-1 se comparó con el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ PD-1^{alta} de la población positiva para PD-1 por paciente. El incremento de la expresión de citocinas tras el bloqueo de PD-1 se correlacionó inversamente con el porcentaje de linfocitos T PD-1^{alta}, lo que indica que los pacientes que expresan un mayor número de linfocitos T PD-1^{alta} responden mal al bloqueo de PD-1 solo (fig. 24A-C). Dado que la disfunción de los linfocitos T se correlaciona con la expresión de múltiples receptores inhibidores (es decir, pacientes con una *puntuación iR* alta) y la respuesta a un tratamiento dirigido a PD-1 se correlaciona con los niveles de expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8⁺, se analizó adicionalmente la expresión de Tim-3, CTLA-4, LAG-3 y BTLA en linfocitos T CD8⁺ PD-1^{alta} y PD-1^{int}. Sorprendentemente, los linfocitos T PD-1^{alta} expresaron niveles significativamente mayores de receptores adicionales en comparación con los subconjuntos con PD-1^{int} (fig. 34). Por tanto, PD-1^{alta} y PD-1^{int} pueden identificar dos poblaciones de linfocitos T distintas en las que los linfocitos T PD-1^{alta} pueden presentar un fenotipo más agotado, que no se puede recuperar mediante el bloqueo de PD-1 solo.

Los datos presentados en el presente documento proporcionan por primera vez un análisis fenotípico y funcional exhaustivo de linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores de pacientes con CPNM. Los datos muestran que estas células poseen principalmente un fenotipo de memoria efectora (CCR7-CD45RAbaja) y muestran una gran heterogeneidad en la expresión de receptores inhibidores tales como PD-1, Tim-3, CTLA-4, LAG-3 y BTLA. No obstante, se observó un claro incremento del número de receptores expresados en linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de tumores en

fase tardía, lo que refleja el progreso de la disfunción de los linfocitos T durante el desarrollo del tumor. Los datos presentados en el presente documento muestran que las funciones efectoras de los TIL se vieron afectadas en la gran mayoría de los pacientes, y que el deterioro se correlacionó con la expresión de receptores inhibidores. Para recuperar la función de los linfocitos T en un entorno clínicamente relevante, se combinaron la estimulación policlonal de los linfocitos T con la inhibición de PD-1 mediada por anticuerpos. El efecto del bloqueo de PD-1 sobre la funcionalidad de los linfocitos T varió entre los TIL de diferentes pacientes, pero se podría predecir evaluando el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que expresan PD-1 en niveles altos.

Aquí, se pudo demostrar que la funcionalidad de los TIL se puede correlacionar con y se ve afectada en gran medida por el número y el nivel de expresión de los receptores inhibidores. Cabe destacar que, incluso los linfocitos T que expresan niveles bajos de receptores inhibidores, mostraron cierto grado de alteración de la funcionalidad, ya que la secreción de IL-2 estaba alterada en la gran mayoría de los pacientes.

En general, la activación y la función efectora de los linfocitos T CD8⁺ se correlacionaron inversamente con la expresión acumulada de receptores inhibidores, lo que indica una contribución directa de diferentes vías inhibitorias a la disfunción de los linfocitos T en el CPNM.

El análisis de cinco receptores inhibidores en linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores mostró un claro incremento de la expresión única y acumulada de estos receptores inhibidores en tejidos tumorales de pacientes con CPNM que presentaban ganglios linfáticos afectados por tumores y estadios tumorales avanzados. La expresión de CTLA-4 difería de los otros cuatro receptores con el mayor porcentaje de células positivas en las fases iniciales, lo que puede indicar un papel distinto de CTLA-4 en la regulación de la inmunidad de los linfocitos T (Topalian *et al.*, Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N. Engl. J. Med. 366, 2443 (Jun 28, 2012)). El análisis de coexpresión de receptores inhibidores adicionales en células individuales, en relación con la expresión de un receptor dado, mostró una expresión gradual, con regulación por incremento temprana y tardía de PD-1 y BTLA, respectivamente. Esto puede reflejar el dinamismo del proceso de agotamiento de los linfocitos T.

Los hallazgos presentados en el presente documento subrayan la relevancia clínica de la expresión de receptores inhibidores durante la progresión tumoral de CPNM, asociada con el fallo progresivo del control inmunitario del crecimiento tumoral. Aquí se documentan dos poblaciones de linfocitos T infiltrantes de tumores CD8⁺ caracterizadas por tener diferentes niveles de expresión de PD-1 (subconjuntos PD-1^{alta} y PD-1^{int}). La aparición de linfocitos T PD-1^{alta} no se correlacionó con el porcentaje de expresión de PD-1. De forma interesante, se observó que el efecto del bloqueo de PD-1 está correlacionado con los niveles de expresión de PD-1, con efectos mínimos sobre la reactividad de los TIL con altas proporciones de subpoblaciones PD-1^{alta}. Estos hallazgos están en consonancia con experimentos realizados en un modelo murino de infección crónica por LCMV en el que el subconjunto de linfocitos T CD8⁺ específicos para DbGP33 PD-1^{int} se podría restablecer tras el bloqueo de PD-1. Por el contrario, el subconjunto de PD-1^{alta} parecía más "agotado", es decir, presentaba signos de agotamiento funcional y respondía mal al bloqueo de PD-1. Por tanto, el nivel de expresión de PD-1 puede representar un marcador novedoso para definir distintos subconjuntos de linfocitos T en cánceres humanos y puede servir como marcador predictivo de respuestas al tratamiento con anticuerpos bloqueantes de PD-1.

Ejemplo 47

Activación de linfocitos T de donantes sanos y de pacientes con cáncer por TCB anti-FoIR1

Para evaluar el efecto de las TCB anti-FoIR1 sobre la activación de linfocitos T, se cultivaron conjuntamente leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) de donantes sanos con la línea celular de cáncer de ovario FoIR1⁺ Skov3 (fig. 40A). Tras la exposición a concentraciones crecientes de TCB anti-FoIR1 que variaban desde 0,6 pM hasta 2 nM durante 24 h, se observó una fuerte activación de los linfocitos T CD8⁺ con regulación por incremento de CD25, CD137 e ICOS. Además, los linfocitos T secretaron IL-2, IFN- γ y TNF. La exposición a TCB DP47, una TCB dirigida contra un antígeno irrelevante, no indujo ninguna activación de linfocitos T (fig. 40B y C).

Ejemplo 48

La expresión de receptores inhibidores es muy diversa en los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores

Dado que los linfocitos T residentes en tumores muestran con frecuencia un fenotipo altamente disfuncional, la heterogeneidad observada en la activación de linfocitos T entre diferentes pacientes después de la estimulación con TCB anti-FoIR1 se puede deber a una funcionalidad alterada de los TIL. Un rasgo característico de los linfocitos T disfuncionales tanto en infecciones víricas crónicas como en tumores es la sobreexpresión de receptores inhibidores. Para ello, se determinó la expresión de los puntos de control inmunitarios PD-1, Tim-3, CTLA-4, Lag-3 y BTLA en linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores en todas las muestras de tumores. Se observó una alta diversidad en cuanto a la frecuencia y la expresión combinada de estos receptores entre diferentes tumores; se observó que PD-1 era el receptor inhibidor más destacado con el mayor porcentaje de expresión (60,2 \pm 30 %), seguido de Tim-3 (29,5 \pm 24,4 %), CTLA-4 (24,6 \pm 17,6 %), Lag-3 (7,0 \pm 5,9 %) y BTLA (3,9 \pm 2,6 %) (fig. 35F). Como se describe previamente en un modelo murino de infección vírica crónica (Blackburn *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(39): 15016-21)

y, como se muestra en el presente documento, en tumores humanos, la población PD-1⁺ se podría dividir en una subpoblación con expresión de PD-1^{alta} y PD-1^{int} (fig. 35A). El análisis de receptores inhibidores adicionales expresados en estos subconjuntos particulares mostró una expresión significativamente mayor de todos los demás receptores inhibidores, incluyendo Tim-3, CTLA-4, Lag-3 y BTLA, en la subpoblación PD-1^{alta} en comparación con la expresión de estos receptores en los subconjuntos PD-1^{int} y PD-1^{neg} (fig. 36A-D). Por lo tanto, se usó el porcentaje de linfocitos T PD-1^{alta} del subconjunto CD8⁺ como marcador sustituto para la expresión acumulada de receptores inhibidores. Las muestras tumorales se dividieron de acuerdo con la frecuencia de linfocitos con PD-1^{alta} en dos grupos con frecuencias elevadas (tumores con PD-1^{alta} abundante) y bajas (tumores con PD-1^{alta} escasa) de linfocitos T con expresión de PD-1^{alta}, respectivamente. Se eligió un valor de corte del 30 % de expresión de PD-1^{alta} para separar los dos grupos. El porcentaje de células PD-1^{alta} varió del 39,1 al 60,5 % en el grupo con PD-1^{alta} abundante (49,5 ± 7,9 %) y del 2,65 al 19,5 % en el grupo con PD-1^{alta} escasa (8,4 ± 5,7 %; fig. 36E). El valor de corte se validó en una segunda cohorte de 14 pacientes con CPNM y 2 pacientes con cáncer de ovario con una distribución similar en la frecuencia de células PD-1^{alta}, donde se observaron resultados comparables tras la estimulación policlonal por anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 (fig. 39).

Ejemplo 49

La activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 depende en gran medida del nivel de expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8⁺

Se analizó si la expresión de receptores inhibidores se podría correlacionar con una funcionalidad disminuida de los linfocitos T tras el tratamiento con TCB anti-FoIR1. De acuerdo con los resultados descritos en el ejemplo 41 anterior, la activación de linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1, como se ejemplifica por la expresión de CD25, CD137 e ICOS ($p=0,028$; $p<0,001$ y $p=0,008$, respectivamente), y las funciones efectoras de los linfocitos T, indicadas por la secreción de IFN- γ , IL-2, TNF, así como de perforina, se vieron significativamente afectadas en los tumores con expresión de PD-1^{alta} abundante en comparación con los tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa ($p=0,019$; $p=0,007$; $p=0,028$ y $p=0,029$, respectivamente; fig. 37A-G). De forma similar, los tumores con expresión de PD-1^{alta} abundante mostraron una citotoxicidad significativamente reducida tras la estimulación por TCB anti-FoIR1, mientras que se pudo observar una fuerte destrucción de células tumorales en la mayoría de los tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa ($p=0,021$; fig. 37H).

Ejemplo 50

El bloqueo de PD-1 restablece la función de los linfocitos T inducida por TCB anti-FoIR1 solo en los tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa

Dado que el nivel de expresión de PD-1 en TIL se correlaciona con la eficacia de la TCB anti-FoIR1, se analizó si el bloqueo del eje de PD-1/PD-L1 en combinación con el tratamiento con TCB anti-FoIR1 podría restablecer la función de los linfocitos T. Se observó que, tras el tratamiento combinado con TCB anti-FoIR1 y el anticuerpo bloqueante de PD-1 nivolumab (MDX5C4), la secreción de las citocinas efectoras IFN- γ , TNF e IL-2, así como de perforina, se podía incrementar solo en algunos de los tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa. Por el contrario, en tumores con expresión de PD-1^{alta} abundante, el bloqueo de PD-1 no provocó ninguna respuesta (fig. 38A-D). Cabe destacar que la destrucción de células tumorales citotóxicas no se pudo mejorar en linfocitos T de tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa ni de tumores con expresión de PD-1^{alta} abundante mediante el bloqueo adicional de PD-1 (fig. 38E).

Los ejemplos expuestos en el presente documento describen la capacidad inmunomoduladora de una TCB específica para CD3 y FoIR1 en lesiones de cáncer primario de pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma ovárico epitelial (COE) y carcinoma de células renales (CCR). En comparación con los linfocitos T periféricos completamente funcionales de donantes sanos, se observó una heterogeneidad sustancial en la destrucción de células tumorales y la activación de linfocitos T inducidas por TCB anti-FoIR1 entre diferentes muestras de tumores humanos, lo que da como resultado un deterioro parcial o completo de la función de los linfocitos T en la mayoría de los pacientes. El análisis exhaustivo de la expresión de receptores inhibidores en la superficie celular de los linfocitos T intratumorales reveló que la eficacia de la activación de los linfocitos T por TCB anti-FoIR1 se correlaciona inversamente con los niveles de expresión de PD-1. Los pacientes con tumores con expresión de PD-1^{alta} abundante mostraron un deterioro de la activación y la función efectora de linfocitos T tras el tratamiento con TCB anti-FoIR1. Adicionalmente, estos pacientes no respondieron al bloqueo de PD-1, en contraste con sus homólogos que presentan expresión de PD-1^{alta} escasa. Por tanto, la bioactividad de los anticuerpos biespecíficos se ve considerablemente obstaculizada por la disfunción de los linfocitos T, que está orquestada, al menos en parte, por la expresión mantenida y altamente diversa de los receptores inhibidores.

Se observó una fuerte regulación por incremento de los marcadores de activación de linfocitos T, la secreción de citocinas efectoras y la destrucción de células tumorales tras la estimulación por TCB anti-FoIR1 en PBMC de donantes sanos (fig. 40). Sin embargo, en marcado contraste, las funciones efectoras de los linfocitos T variaron en gran medida y, en general, disminuyeron en los linfocitos T intratumorales. En particular, la capacidad de destrucción y la producción de citocinas efectoras fue significativamente menor en los TIL con pérdida completa de la producción de IL-2 y secreción gravemente alterada de TNF e IFN- γ en la mayoría de los tumores.

Se documentó la expresión de los receptores inhibidores PD-1, Tim-3, CTLA-4, Lag-3 y BTLA en linfocitos T CD8⁺ intratumorales. PD-1 mostró la expresión más amplia de todos los receptores inhibidores analizados. Las observaciones de infecciones murinas crónicas por LCMV de Blackburn sugieren la presencia de subconjuntos de linfocitos T positivos para PD-1 que son funcionalmente distintos y que se pueden separar en función de los niveles de MFI usando citometría de flujo (Blackburn *et al.*, PNAS 105(39): 15016 (2008)). Cabe destacar que los subconjuntos de linfocitos T PD-1^{alta} mostraron una alta coexpresión de Tim-3 y CTLA-4 y, en menor medida, de Lag-3 y BTLA, mientras que sus homólogos con PD-1^{int} expresaron solo niveles bajos de otros receptores inhibidores, comparables a los linfocitos T PD-1^{neg}. La frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ PD-1^{alta} difirió en gran medida entre los pacientes y permitió discriminar entre tumores con expresión de PD-1^{alta} abundante y escasa. A diferencia de los pacientes con un fenotipo con expresión de PD-1^{alta} escasa, la activación de linfocitos T mediada por TCB anti-FoIR1 y la destrucción de células tumorales se vieron significativamente alteradas en tumores que mostraban un fenotipo con expresión de PD-1^{alta} abundante. Estos datos amplían y confirman observaciones previas de que la activación y la función efectora de los linfocitos T CD8⁺ se correlaciona con la coexpresión de múltiples puntos de control inmunitarios (Sakuishi *et al.*, J Exp Med 2010;207(10):2187-94; Fourcade *et al.*, J Exp Med 2010;207(10):2175-86; Grosso *et al.*, J Immunol 2009; 182(11):6659-69; Matsuzaki *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2010;107(17):7875-80; Fourcade *et al.*, Cancer Res 2012;72(4):887-96). Por lo tanto, la frecuencia de los linfocitos T PD-1^{alta} puede ser útil como marcador sustituto de la funcionalidad de los TIL tras la activación por TCB, así como servir como marcador predictivo de las respuestas terapéuticas al tratamiento con TCB. Este perfil inmunitario podría guiar la selección de pacientes que es probable que respondan a la inmunoterapia, tal como las TCB. Su correlación con los beneficios clínicos queda por determinar en intervenciones clínicas prospectivas.

Una vía prometedora para mejorar la eficacia terapéutica de las TCB se basa en el bloqueo de señales inhibitoras en los linfocitos T. Dado que PD-1 era el receptor inhibidor expresado de manera más destacada en todos los tumores analizados, se evaluó si el bloqueo de PD-1 podría potenciar las funciones efectoras de los linfocitos T tras la activación por TCB. Cabe destacar que se observó el incremento de la secreción de citocinas efectoras tras el tratamiento combinado con TCB anti-FoIR1 y anti-PD-1, aunque solo en tumores con expresión de PD-1^{alta} escasa. Por tanto, es evidente que se necesitan estrategias terapéuticas novedosas que exploren la transformación de linfocitos T con expresión de PD-1^{alta} en PD-1^{int} para incrementar la susceptibilidad al bloqueo de PD-1/PD-L1.

De manera extraordinaria, no se observó ninguna mejora en la destrucción de células tumorales tras el bloqueo concomitante de PD-1 en todas las muestras de tumor. Por tanto, el bloqueo de un único punto de control inmunitario puede no ser suficiente para restablecer la capacidad citolítica de los TIL. Sin embargo, en un modelo de tumor de ratón, se ha demostrado que el bloqueo del eje de PD-1/PD-L1 incrementa la infiltración de linfocitos T en los tumores (Curran *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(9):4275-80), una característica de este tratamiento que el enfoque *in vitro* no pudo abordar. Por tanto, el efecto terapéutico del bloqueo de PD-1 *in vivo* podría resultar no solo de la mejora de la citotoxicidad de los linfocitos T intratumorales residuales, sino de la funcionalidad mantenida de los linfocitos T recién infiltrados. Se ha demostrado que la activación de linfocitos T inducida por TCB regula por incremento la expresión de PD-1, lo que puede dar lugar a una resistencia secundaria en presencia de PD-L1 expresado tanto en células tumorales como en células inmunitarias infiltrantes, como ha quedado demostrado recientemente con una TCB específica de Her2 y con una TCB específica del antígeno carcinoembrionario (CEA) (Junttila *et al.*, Cancer Res 2014; 74(19):5561-71; Osada *et al.*, Cancer Immunol Immunother 2015). Es importante destacar que el bloqueo del eje de PD-1/PD-L1 podría restablecer completamente la función de los linfocitos T inducida por TCB tanto *in vitro* como en un modelo de tumor de ratón. Estas observaciones indican que la coadministración de inhibidores de puntos de control puede prevenir la resistencia secundaria, lo que puede aumentar el estado disfuncional de los TIL y limitar la eficacia terapéutica de las TCB. Resulta evidente que se necesita investigar más para determinar los regímenes de combinación óptimos de inhibidores de puntos de control y TCB. También será fundamental identificar receptores de linfocitos T inhibidores y activadores con funciones no redundantes como dianas terapéuticas potenciales.

Los presentes hallazgos indican claramente que anticuerpos biespecíficos tales como las TCB anti-FoIR1 pueden hacer que los linfocitos T provoquen la regulación por incremento de moléculas coestimuladoras, produzcan citocinas inflamatorias y adquieran función citolítica. Se han observado diferentes estados de disfunción de los linfocitos T, que están orquestados, al menos en parte, por la expresión de receptores inhibidores y, en algunos casos, reducen la eficacia de las TCB. Dado que las funciones efectoras inducidas por TCB anti-FoIR1 solo se podrían restablecer parcialmente mediante el bloqueo de PD-1, los resultados sugieren una regulación inmunitaria bastante compleja, que utiliza múltiples vías y definitivamente no redundantes para mantener la disfunción de los linfocitos T dentro del entorno del tumor.

Secuencias

Secuencias de aminoácidos de modos de realización ejemplares

1) Moléculas de unión a FoIR útiles en formato de la cadena ligera común, cadena pesada variable

ES 2 984 937 T3

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
16A3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARNYYAGVTPFDYWGQGT ^L LVTVSS	1
18D3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARNYYTCGSSAFDYWGQGT ^L LVTVSS	2
15H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARNYYLFS ^T SFDYWGQGT ^L LVTVSS	3
15B6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARNYYIGIVPFDYWGQGT ^L LVTVSS	4
21D1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARNYYVGVSPFDYWGQGT ^L LVTVSS	5
16F12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARNFTVLRVPFDYWGQGT ^L LVTVSS	6
15A1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARNYYIGVVF ^D YWGQGT ^L LVTVSS	7
15A1_CDR1	SY ^Y MH	8
15A1_CDR2	IINPSGGSTSYAOKFQ ^G	9
15A1_CDR3	NYYIGVVTFDY	10
19E5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARGEKRRYTSFDYWGQGT ^L LVTVSS	11
19E5_CDR1	SY ^Y MH	8
19E5_CDR2	IINPSGGSTSYAOKFQ ^G	9
19E5_CDR3	GEWRRYTSFDY	12
19A4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY ^Y MHWVRQAPGGGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMTRDTSTSTVYME ^L SSLRSEDTA VYYCARGGWIRWEHFDYWGQGT ^L LVTVSS	13
19A4_CDR1	SY ^Y MH	8
19A4_CDR2	IINPSGGSTSYAOKFQ ^G	9
19A4_CDR3	GGWIRWEHFDY	14
16D5	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLSCAASGFTF ^S NAWMSWVRQAPGK ^G LE WVGRIRKSKTDGGT ^T DYAAAFVKG ^R FTLSRDSKNTLYLQ ^M NSLK ^T ED TAVYYCTTFW ^E WSWYDYWGQGT ^L LVTVSS	15
16D5_CDR1	NAWMS	16
16D5_CDR2	RIKSKTDGGT ^T DYAAPVKG	17
16D5_CDR3	PW ^E WSWYDY	18
15E12	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLSCAASGFTF ^S NAWMSWVRQAPGK ^G LE WVGRIRKSKTDGGT ^T DYAAAFVKG ^R FTLSRDSKNTLYLQ ^M NSLK ^T ED TAVYYCTTFW ^E WSWYDYWGQGT ^L LVTVSS	19
15E12_CDR1	NAWMS	16

ES 2 984 937 T3

15E12_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
15E12_CDR3	PWEWSYFDY	20
21A5	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLE WVGRIRKSKTDGGTTDYAAPVKGRTTISRDDSKNTLYLQNNOLKTED TAVYYCTTPWEWAWFDYWGQGTLLVTVSS	21
21A5_CDR1	NAWMS	16
21A5_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
21A5_CDR3	PWEWAWFDY	22
21G8	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLE WVGRIRKSKTDGGTTDYAAPVKGRTTISRDDSKNTLYLQNNOLKTED TAVYYCTTPWEWAYFDYWGQGTLLVTVSS	23
21G8_CDR1	NAWMS	16
21G8_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
21G8_CDR3	PWEWAYFDY	24
19H3	QVQLVQSGAEVRRKPGASVKVSCKASQYTFYSYMHWVHQAPGQGLE WMGIINPSSGGSTSYAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTA VYYCARTGKSRFGSYMDYWGQGTLLVTVSS	25
19H3_CDR1	SYMH	8
19H3_CDR2	IINPSSGGSTSYAQKFGQ	9
19H3_CDR3	TGWSRWGYMDY	26
20G6	QVQLVQSGAEVRRKPGASVKVSCKASQYTFYSYMHWVHQAPGQGLE WMGIINPSSGGSTSYAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTA VYYCARGEWIYYHFDYWGQGTLLVTVSS	27
20G6_CDR1	SYMH	8
20G6_CDR2	IINPSSGGSTSYAQKFGQ	9
20G6_CDR3	TGWSRWGYMDY	28
20H7	QVQLVQSGAEVRRKPGASVKVSCKASQYTFYSYMHWVHQAPGQGLE WMGIINPSSGGSTSYAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTA VYYCARGEWIYYHFDYWGQGTLLVTVSS	29
20H7_CDR1	SYMH	8
20H7_CDR2	IINPSSGGSTSYAQKFGQ	9
20H7_CDR3	VGWYRWGYMDY	30

2) Molécula de unión a CD3, cadena ligera común (CLC)

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
cadena ligera común (VL) para CD3	QAVVTQEPSTLVSPGGFVTLTCGSSSTGAVTTSNYANWVQEKP GQAFRGLICGTNKRAPGTPARFSGSLLGCKAALFLSGAQPED EAEYYCALWYSNLWVFGGCTKLTVL	31
cadena ligera común_CDR1 para CD3	GSSTGAVTTSNYAN	32
cadena ligera común_CDR2 para CD3	GTNKRAP	33
cadena ligera común_CDR3 para CD3	ALWYSNLWV	34

ES 2 984 937 T3

cadena linera común (VLCL) para CD3	QAVVTQEP SLTVSPCGT VTLTCCSS TPGAVT TPSNYANWVQEK F GQAFRGLIGG TNKRAPGT PARFSGSLIGGKAAL TL SQAQPED EAEYYCALWYSNLWVFGCG TNLT VLGQPKAAPSVTL FP FSSE ELQANKATLVCLISDFYPCAVTVAWKADSS SP VKACVETTTFS KQSNKYAASSYLSLTFEQNKSHRSYS SCQV THEGSTVEKTV A PTECS	35
-------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

3) Molécula de unión a CD3, cadena pesada

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
cadena pesada variable (VH) para CD3	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASGFTF STYAMN WVRQAPGKG LEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SR DDSKNTLYLQMN SL RAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWFAYWGQGT LV TVSS	36
cadena pesada (VH)_CDR1 para CD3	TYAMN	37
cadena pesada (VH)_CDR2 para CD3	RIRSKYNNYATYYADSVK G	38
cadena pesada (VH)_CDR3 para CD3	HGNFNGNSYVSWFAY	39
cadena pesada completa (VHCH1) para CD3	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASGFTF STYAMN WVRQAPGKG LEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTI SR DDSKNTLYLQMN SL RAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWFAYWGQGT LV TVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VS WNSGALTS GVH TFFPAVLQSSGLYSLS SV TVFSSSLGTQTYICNVN HK PSNTK VD KKVEPKSC	40
cadena pesada constante CH1 para CD3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VS WNSG ALTS GVH TFFPAVLQSSGLYSLS SV TVFSSSLGTQTYICNVN HK PSNTK VD KKVEPKSC	84

4) Moléculas de unión a FolR útiles para el formato crossfab

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
11F8_VH	QVQLVQSGAEVVKKPGSSV RV SCKASGGTFS SYAIS WVRQAPGQGLE WMGGIIPIFSTANYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARAVFYRAWYSFDYWGQGT LV TVSS	41
11F8_VH_CDR1	SYAIS	42
11F8_VH_CDR2	GIIPIFGTANYAOKFQ G	43
11F8_VH_CDR3	AVFYRAWYSFDY	44
11F8_VL	DIQMTQSPSTLSASV GD RVITTCRASQSISSWLA WY QQKPKAPKL LIYDASSLES GV PSRFSGSGSGTEFTLTIS SL QPD DF ATYYCQ QYT SPFP TF GGQTKVEIK	45
11F8_VL_CDR1	RASQSISSWLA	46
11F8_VL_CDR2	DASSLES	47
11F8_VL_CDR3	QQYTSFPPT	48
36F2_VH	QVQLVQSGAEVVKKPGASV KV SCKASSYTFSTSYMH WVR QAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAOKFQGRVTMT HD TSTSTVYME LS SLRSEDTA VYYCARSPFTGFHLDYWGQGT LV TVSS	49
36F2_VH_CDR1	SYMH	8

ES 2 984 937 T3

36F2_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
36F2_VH_CDR3	SFFTGFHLDY	50
36F2_VL	EIVLTQSPFGLSLSPFGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQOKFGQAFR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQY TNEHYTFCQGTKVEIK	51
36F2_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
36F2_VL_CDR2	GASSRAT	53
36F2_VL_CDR3	QQYTNEHYTT	54
9D11_VH	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAFGGGLE WMGIINPSGGGPTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTA VYYCARGDFANLDYWGQGTLLVTVSS	55
9D11_VH_CDR1	SYMH	8
9D11_VH_CDR2	IINPSGGGPTSYAQKFQG	56
9D11_VH_CDR3	GDFAWLDY	57
9D11_VL	DIIVMTQSPFLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGVYY CMQASIMNRTFCQGTKVEIK	58
9D11_VL_CDR1	RSSQSLHNSNGYNYLD	59
9D11_VL_CDR2	LGSNRAS	60
9D11_VL_CDR3	MQASIMNRT	61
9D11_VL N95S	DIIVMTQSPFLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGVYY CMQASIMSRTFCQGTKVEIK	62
9D11_VL N95S_CDR3	MQASIMSRT	63
9D11_VL N95Q	DIIVMTQSPFLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGVYY CMQASIMQRTFCQGTKVEIK	64
9D11_VL N95Q_CDR3	MQASIMSRT	65
9D11_VL T97A	DIIVMTQSPFLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGVYY CMQASIMNRAFGQGTKVEIK	66
9D11_VL T97A	MQASIMNRA	67
9D11_VL T97N	DIIVMTQSPFLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSCTDFTLKI SRVEAEDVGVYY CMQASIMNRFNGQGTKVEIK	68
9D11_VL T97N_CDR3	MQASIMNRN	69
5D9_VH	QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAFGGGLE WMGIINPSGGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTA VYYCARSYIDMDYWGQGTLLVTVSS	70
5D9_VH_CDR1	SYMH	8
5D9_VH_CDR2	IINPSGGGSTSYAQKFQG	9
5D9_VH_CDR3	SYIDMDY	71

ES 2 984 937 T3

5D9_VL	EIVLTQSPFGLSLSPGERATLSCRASQEVSSSYLANVQOKFGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQD NWSPTFGQGTKVEIK	72
5D9_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
5D9_VL_CDR2	GASSRAT	53
5D9_VL_CDR3	QQDNWSPT	73
6B6_VH	QVQLVQSGAEVKKPEASVKV9SCNASGTFSTSYIMNWFQAPFQGLE WMGLINPSGGSTSYAQKFGQVMTTRDTSTSTVYMEIGSLRSEDTA VYYCARAYVDMDYWGQGTLLVTVSS	74
6B6_VH_CDR1	SYIMH	8
6B6_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFG	9
6B6_VH_CDR3	SYVDMDY	75
6B6_VL	EIVLTQSPFGLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLANVQOKFGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQD IWSPTFGQGTKVEIK	76
6B6_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
6B6_VL_CDR2	GASSRAT	53
6B6_VL_CDR3	QQDIWSPT	77
14E4_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGEGLE WVSALISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNGLRAEDTA VYYCAKDSYVEWYAFDYWGQGTLLVTVSS	78
14E4_VH_CDR1	SYAMS	79
14E4_VH_CDR2	AISGSGGSTYYADSVKG	80
14E4_VH_CDR3	DSSYVEWYAFDY	81
14E4_VL	EIVLTQSPFGLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLANVQOKFGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDSTLTISRLEPEDFAVYYCQQP TSSPITFG QGTKVEIK	82
14E4_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
14E4_VL_CDR2	GASSRAT	53
14E4_VL_CDR3	QQPTSSPIT	83

5) Molécula de unión a CD3 útil para el formato crossfab

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
cadena pesada (VH) para CD3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWFQAPG KGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQGTLLVTVSS	36
cadena pesada (VH)_CDR1 para CD3	TYAMN	37
cadena pesada (VH)_CDR2 para CD3	RIRSKYNNYATYYADSVKG	38
cadena pesada (VH)_CDR3 para CD3	HGNFNGNSYVSWFAY	39
cadena ligera (VL) para CD3	QAVVTQEPFLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKP GQAFRGLIGGINKRAFPTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPED EAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
cadena	GSSTGAVTTSNYAN	32

ligera_CDR1 para CD3		
cadena ligera_CDR2 para CD3	GTNKRAP	33
cadena ligera_CDR3 para CD3	ALWYSNLWV	34
pETR12940: cadena ligera común cruzada (VLCH1) para CD3	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKP GQAFRGLIGGTNKRAPGTFARFSGSLLGGKAALTLSGAQPED EASYICALWYSNLWVFGGKTLTVLSSASTKGPSVFFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVLDYFFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVE PKSC	86
cadena pesada cruzada (VHCk) para CD3; por ejemplo, en pCON1057	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSA SVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVYVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	87
CD3-CH1	ASTGQPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVLDYFFPEPVTVSWN SGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEVEPKSC	85
CD3-ckappa	VAAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVYVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	88

6) Secuencias de aminoácidos ejemplares de anticuerpos biespecíficos anti-CD3-FcR en formato crossmab invertido 2+1

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
VHCH1[9D11]_V HCL[CD3]_Fc(bo tón)_PGLALA pCON1057	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGGGLE WMGIINFGSGGPTSYAQKFKQGRVIMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTA VYYCARGDFAWLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGG TAAIGCLVLDYFFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVEPKSCDGGGSGGGG SEVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGL EWVSRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFF PSDEQLKSGTASVYVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCFPCFAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SFTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNARTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKANGQPPEPOVYITLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNNVFSCSVMHREALHNNHYTQRSLSLSPGK	94

ES 2 984 937 T3

9D11_Fc(ojal)_P GLALA_HVRF	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASEYTFSTSYMMHWVRQAPGQGLE WMGIINPSCGGPTSYAQKFKQGRVTMTROTSTSTVYMEISSLRSEDTA VYYCARGDFAWLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGG TAAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALITSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSS VVTVFSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCP AFEAAGGPPSVFLFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKEFN WYVDGVEVHNAKTKFREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPFSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSPFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSQSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	95
9D11_LC pCON1063	DIIVMTQSFLSLPVTTPGEPASTISCRSSQSLHNGNYLOWYLOKPG QSPQLLIYLGSNRASGVPEPFGSGSGSTDEFTLKI SEVEAEDVGVYY CMQASIMNRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLNSGTASVV CLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL TLISKADYERHKVYACEVTHOGLSSFPVTKSFNRGEC	96
VLCH1[CD3] pETR12940	QAVVTEQEPSLTVSPGGTIVTLTCGSSSTGAVTTSNYANWVQEKFGQAF RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFCGGTKLTVLSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSECTAALGC LVKDYFPEFVTVSWNSGALITSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKEVEPKSC	86
CH1	ASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGAL TSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHHKPSNT KVDKKEVEPKSCD	428
VHCH1[36F2]_V HCL[CD3]_Fc(bo tón)_PGLALA pCON1056	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASEYTFSTSYMMHWVRQAPGQGLE WMGIINPSCGGSTSYAQKFKQGRVTMTHTDTSTSTVYMEISSLRSEDTA VYYCARSFFTGFHLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSG GGTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALITSGVHTFFPAVLQSSGLYSL SSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKEVEPKSCDGGGGSGG GGSEVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMHWVRQAPGK GLEWVSRIRSKYNNYATYADSVKGRFTISRDDSRNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCVRNIGNEFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSSASVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLISKADYERHKVYACEVTHOGLSSFPVTKSF NRGECDKTHTCPFCPAFEAAGGPPSVFLFFPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKEFNWYVDGVEVHNAKTKFREQYNSTYRVVSVLTVL VLRQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSYMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	393
36F2-Fc(ojal) PGLALA pCON1050	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASEYTFSTSYMMHWVRQAPGQGLE WMGIINPSCGGSTSYAQKFKQGRVTMTHTDTSTSTVYMEISSLRSEDTA VYYCARSFFTGFHLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALITSGVHTFFPAVLQSSGLYSL SSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCP CFEFAAAGGPPSVFLFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKFREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPFSRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSPFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSQSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	394

ES 2 984 937 T3

LC de 36F2 pCON1062	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRFGQAFR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY TNEHYTFCGGTKVEIKRTPVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYFREAKVQWQVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYERKHVVYACEVTHXGLSSPVTKSFNRGEC	395
VLCH1 para CD3 pETR12940	QAVVTQPELTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQRKPEQAF RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAAITLSCAQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFCGGTKLTVLSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHHKPSHTKVDKKVEPKSC	86

7) Secuencias de aminoácidos ejemplares de anticuerpos biespecíficos anti-CD3-FcR con cadena ligera común

VHCH1[16D5]_V HCH1[CD3]_Fc(botón) pCON999	EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIRKSKTDCGTTDYAAPVEGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTTPWENSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICNVNHHKPS NTKVDKRVKVEPKSCDGGGGGGSSSEVQLLESQGGGLVQPPGSL RLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSNWFAYWCGQGTLVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSG LYSLSSVTVPSLSSLTQTYICNVNHHKPSHTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPFKPKDTLMISKTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLKQDNLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTRNQVSLWCLVKGFYPSDIAVENESNGQPE NNYKTTFPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKERWQQGNVFSCSVMEE ALHRRHTQKSLSLSPGK	89
VHCH1[16D5]_F c(ojal) pCON983	EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPG KGLEWVGRIRKSKTDCGTTDYAAPVEGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTTPWENSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSLTQTYICNVNHHKPS NTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPFKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTIISKAKGQPREPQVCTLPFSRDELTRNQVSLSCAVKGFYPS DIAVENESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSEFFLVSKLTVOKSEW QQGNVFSCSVMHEALHRRFTQKSLSLSPGK	90
CD3_cadena ligera común pETR13197	QAVVTQEPSELTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKP GOAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAAITLSCAQPED EAEYYCALWYSNLWVFCGGTKLTVLQPKAAPSVTLPFPSSSE ELQANKATLVCLISDFYFGAVTVANKADSSPVKAGVETTTFS KQSNKKAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCQVTRREGSTVEKTV PTECS	35

<p>VHCH1[CD3]_V HCH1[16D5]_Fc (botón)_PGLALA pETR13932</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFG NSYVSWFAYWGQGTLLVTVSEA STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEVEPKSCDK THTCFFPCFAPFAAAGGFSV FLFPFKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVTLHQQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTIISKAKGQPR EPQVYITLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ FENNYKTTTPVLDSDGSEFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFPSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>91</p>
<p>CD3_Fc(botón)_ PGLALA pETR13917</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFG NSYVSWFAYWGQGTLLVTVSSA STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEVEPKSCDK THTCFFPCFAPFAAAGGFSV FLFPFKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVTLHQQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTIISKAKGQPR EPQVYITLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ FENNYKTTTPVLDSDGSEFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFPSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>92</p>
<p>Fc(ojal)_PGLAL A_HVRF pETR10755</p>	<p>DKTHTCFFCFAPPELLCGP SVFLFPFKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVTLHQQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIISK AKGQPREPQVYITLPPCRDEL TKNQVSLVCAVKGFYPSDIA VEWESNGQFENNYKTTTPVL DSDGSEFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFPSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>	<p>93</p>
<p>VHCL[CD3]_Fc (botón)_PGLALA pETR13378</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFG NSYVSWFAYWGQGTLLVTVSEA SVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVYVCLLHNFYPRAAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS RDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGECDKTHTCFFCFAPFAA AGGFSVFLFPFKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVTLHQQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTIISKAKGQPREPQVYITL PPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQFEN NYKTTTPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFPSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>98</p>

<p>16D5 invertida 2+1 con N100A en CDR H3 pETR14096</p>	<p>EVQLVLESGGGLVLPFGGSLRLSCAASGFTTF3NANMMSWVRQAPG KGLEKVGRIKSKTDCGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGF SVFFLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSCLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKKPS NTKVDKKVEPKSCDGGGGGGGGSEVQLLESQGGVLPFGGSL RLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPFGKGLEWVSRIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGASVVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSC LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPCPAPFAAAGGFSVFLFFPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVRFNRYVDGVEVHNAKTEPREEQYNSTYRVVS VLTVLRHQQDNLNRESEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLFPCEDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMRE ALRNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>99</p>
<p>16D5 invertida 2+1 con S100aA en CDR H3 pETR14097</p>	<p>EVQLVLESGGGLVLPFGGSLRLSCAASGFTTF3NANMMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDCGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGF SVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSCLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKKPS NTKVDKKVEPKSCDGGGGGGGGGGSEVQLLESQGGVLPFGGSL RLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPFGKGLEWVSRIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHG NFGNAYVVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTS GGTAALGCLVVDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSC LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPCPAPFAAAGGFSVFLFFPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVRFNRYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLRHQQDNLNGKEYSKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLFPCEDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMRE ALRNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>100</p>
<p>cadena ligera fusionada a CH1 para CD3; Fc_PGLALA; pETR13862</p>	<p>QAVVTCPEPSLTVSPGGTTLTCESSTEAVTTSNYANKVQEXP GQAFRGLIGGYNKRAPGTPARFSGSLGCKAALTLSGAQPED EAEYYCALNYSNLWVFGGSKLTVLSSASTRGFQVFFLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSCLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPCPAPFAAAGGFSVFLFFPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVRFNRYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLRHQQDNLNRESEYKCKVSNKALGAPIERTISKAKGQ PREPQVYTLFPCEDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYETTFPVLESDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALRNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>101</p>
<p>VH de 16D5 fusionada a cadena kappa constante; pETR13859</p>	<p>EVQLVLESGGGLVLPFGGSLRLSCAASGFTTF3NANMMSWVRQAPG KGLEWVGRIKSKTDCGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSSASVAAP SVFTLFPFSDDEQLKSGTASVVCLLMNFYFREAKVQWQVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV HQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>102</p>

VH fusionada a cadena lambda constante para CD3; pETR13860	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPG KGLEWVSRIIRSKYNNHYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYIQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNGFENSYVSWFAYWGQGLVTVSSA SPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSEFVKAGVETTTFSKQSNKRYAASSYLSLTPEQWKSRRSY SCQVTHESSTVEKTVAPTECS	103
IGHV1-46*01 (X92343), más elemento JH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYM HWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVT MTRDTSITSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARGGSGGS FDYWGQGLVTVSS	104
IGHV1-69*06 (L22583), más elemento JH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI WVRQAPGQGLEWMGGHPHFGTANYAQKFGQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSGGSM DAWGQGTFTVTVSS	105
IGHV3-15*01 (X92216), más elemento JH4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSNAWMS WVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGGSG GSFDYWGQGLVTVSS	106
IGHV3-23*01 (M99660), más elemento JH4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGSGGS FDYWGQGLVTVSS	107
IGHV4-59*01 (AB019438), más elemento JH4	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSW IRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGSGGSGFDYW GQGLVTVSS	108
IGHV5-51*01 (M99686), más elemento JH4	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGHYPGSDTRYSPSFQGGQVTI SADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYVCARGGSGGSGF DYWGQGLVTVSS	109
Anticuerpo específico anti-CD3 basado en la cadena ligera CH2527 humanizada	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAIFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVL	110
hVK1-39 (elemento J JK4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK	111
VL7_46-13 (cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 humanizado)	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYAN WVQEKPGQAIFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVL	112

8) Variantes de 16D5 con afinidad reducida ejemplares

- a. Variantes de la cadena ligera con afinidad reducida ejemplares

5

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
K53A aa	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAIFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVL	113

ES 2 984 937 T3

K53A_VL_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
K53A_VL_CDR2	GTNARAF	396
K53A_VL_CDR3	ALWYSNLWV	34
S93A aa	QTVVYTOEPLTIVSFGQIVYTLTQGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRQLIGS TNKRAPGT PARFEGSLLGGKAALTLSGVQFEDEREYYCALWYANLWVFGGGT RLIVL	114
S93A_VL_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
S93A_VL_CDR2	GTNKRAP	33
S93A_VL_CDR3	ALWYANLWV	397

b. Variantes de la cadena pesada con afinidad reducida ejemplares

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
S35H aa	EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWRQAPGKGLEWYGRHK SKTDGGTTDYAAPVKGFRFTISRDDSKNTLYLQNSLKTEDTAVYYCTTPWEW SWYDYWGQGTLVTVSSAS	115
S35H_VH_CDR1	NAWMH	398
S35H_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
S35H_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
G49S aa	EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSRHK SKTDGGTTDYAAPVKGFRFTISRDDSKNTLYLQNSLKTEDTAVYYCTTPWEW SWYDYWGQGTLVTVSSAS	116
G49S_VH_CDR1	NAWMS	16
G49S_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
G49S_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
R50S aa	EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRHK SKTDGGTTDYAAPVKGFRFTISRDDSKNTLYLQNSLKTEDTAVYYCTTPWEW SWYDYWGQGTLVTVSSAS	117
R50S_VH_CDR1	NAWMS	16
R50S_VH_CDR2	SIKSKTDGGTTDYAAPVKG	399
R50S_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
W96Y aa	EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRHK SKTDGGTTDYAAPVKGFRFTISRDDSKNTLYLQNSLKTEDTAVYYCTTPYEW SWYDYWGQGTLVTVSSAS	118
W96Y_VH_CDR1	NAWMS	16
W96Y_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
W96Y_VH_CDR3	PYEWSWYDY	400
W98Y aa	EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRHK SKTDGGTTDYAAPVKGFRFTISRDDSKNTLYLQNSLKTEDTAVYYCTTPWEY SWYDYWGQGTLVTVSSAS	119
W98Y_VH_CDR1	NAWMS	16
W98Y_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
W98Y_VH_CDR3	PWEYSWYDY	232

5 9) Modos de realización ejemplares adicionales generados a partir de una colección de presentación en fagos (CDR subrayadas)

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
90D7 aa	<u>QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRFQAPGQGLEWNGIIN</u> <u>PSGGSTSYAQKFOG</u> RVITMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARNYITIV <u>SPFDYWGQGTLLVTVSSAS</u>	120
90D7_VH_CDR1	SYMH	8
90D7_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFOG	9
90D7_VH_CDR3	NYTIVVSPFDY	233
90C1 aa	<u>QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRFQAPGQGLEWNGIIN</u> <u>PSGGSTSYAQKFOG</u> RVITMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARNYIFIGS <u>VANDYWGQGTLLVTVSSAS</u>	121
90C1_VH_CDR1	SYMH	8
90C1_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFOG	9
90C1_VH_CDR3	NYFIGSVANDY	234
5E8 VH aa	<u>QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRFQAPGQGLEWNGIIN</u> <u>PSEGSTSYAQKFOG</u> RVITMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARGLTYSM <u>DYWGQGTLLVTVSSAS</u>	122
5E8_VH_CDR1	SYMH	8
5E8_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFOG	9
5E8_VH_CDR3	GLTYSMDY	235
5E8 VL aa	<u>DIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLIHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLL</u> <u>IYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEARSDVGVYYCMQALQIPNTIFG</u> <u>QGTKVEIKRT</u>	123
5E8_VL_CDR1	RSSQSLIHSNGYNYLD	59
5E8_VL_CDR2	LGSNRPAS	60
5E8_VL_CDR3	MQALQIPNT	236
12A4 VH aa	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRFQAPGKGLEWVSAIS</u> <u>GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKAYALD</u> <u>YWGQGTLLVTVSSAS</u>	124
12A4_VH_CDR1	SYAMS	79
12A4_VH_CDR2	AISGSGGSTYYADSVKGR	80
12A4_VH_CDR3	YAYALDY	237
12A4 VL aa	<u>EIVLTQSPFTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPKGAPRLLIYGA</u> <u>SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQHGSSSTFGQGTVE</u> <u>EIKRT</u>	125
12A4_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
12A4_VL_CDR2	GASSRAT	53
12A4_VL_CDR3	QQHGSSST	238
7A3 VH aa	<u>QVQLVQSGAEVKKFGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRFQAPGQGLEWNGIIN</u> <u>PSGGSTSYAQKFOG</u> RVITMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARGDFSAG <u>RLMDYWGQGTLLVTVSSAS</u>	126
7A3_VH_CDR1	SYMH	8
7A3_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFOG	9
7A3_VH_CDR3	GDFSAGRLMDY	239
7A3 VL aa	<u>DIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLIHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLL</u> <u>IYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTIISRVEARSDVGVYYCMQALQTPPTIF</u> <u>GGTKVEIKRT</u>	127
7A3_VL_CDR1	RSSQSLIHSNGYNYLD	59
7A3_VL_CDR2	LGSNRPAS	60
7A3_VL_CDR3	MQALQTPPTIF	240

ES 2 984 937 T3

6E10_VH_aa	<u>QVQLVQSGAEVVKKPKASVKVSKKASGYTFTSY^{YMH}HWVROAPGQGLEWMGIIIN</u> <u>PSSGGSTSYAQKFQG</u> <u>RVIMTRDTSTSTVYMELSLSEEDTAVYYCARGDYNAF</u> <u>DYMSGGTLVTSSAS</u>	128
6E10_VH_CDR1	SYMH	8
6E10_VH_CDR2	IINPSSGGSTSYAQKFQG	9
6E10_VH_CDR3	GDYNAFDY	241
6E10_VL_aa	<u>DIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKFGQSPOLL</u> <u>IYLGSNRASGVFDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAWHSPTFGQ</u> <u>QGTKVEIKRT</u>	129
6E10_VL_CDR1	RSSQSLLSHNGYNYLD	59
6E10_VL_CDR2	LGSNRAS	60
6E10_VL_CDR3	MQAWHSPT	242
12F9_VH_aa	<u>QVQLVQSGAEVVKKPKASVKVSKKASGYTFTSY^{YMH}HWVROAPGQGLEWMGIIIN</u> <u>PSSGGSTSYAQKFQG</u> <u>RVIMTRDTSTSTVYMELSLSEEDTAVYYCARGATYTM</u> <u>DYMSGGTLVTSSAS</u>	130
12F9_VH_CDR1	SYMH	8
12F9_VH_CDR2	IINPSSGGSTSYAQKFQG	9
12F9_VH_CDR3	GATYTM	243
12F9_VL_aa	<u>DIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKFGQSPOLL</u> <u>IYLGSNRASGVFDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFG</u> <u>QGTKVEIKRT</u>	131
12F9_VL_CDR1	RSSQSLLSHNGYNYLD	59
12F9_VL_CDR2	LGSNRAS	60
12F9_VL_CDR3	MQALQTPIT	244

10) Variantes de sitios de glucosilación de 9D11: cadena ligera variable de modos de realización ejemplares (CDR subrayadas)

Variante	Secuencia	SEQ ID NO
N95S	<u>DIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKFGQSPOLL</u> <u>IYLGSNRASGVFDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASIMSRIFG</u> <u>QGTKVEIK</u>	132
12F9_VL_CDR1	RSSQSLLSHNGYNYLD	59
12F9_VL_CDR2	LGSNRAS	60
12F9_VL_CDR3	MQASIMSRIT	63
N95Q	<u>DIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKFGQSPOLL</u> <u>IYLGSNRASGVFDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASIMQRTIFG</u> <u>QGTKVEIK</u>	133
N95Q_VL_CDR1	RSSQSLLSHNGYNYLD	59
N95Q_VL_CDR2	LGSNRAS	60
N95Q_VL_CDR3	MQASIMQRT	65
T97A	<u>DIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKFGQSPOLL</u> <u>IYLGSNRASGVFDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASIMNRAFG</u> <u>QGTKVEIK</u>	134
T97A_VL_CDR1	RSSQSLLSHNGYNYLD	59
T97A_VL_CDR2	LGSNRAS	60
T97A_VL_CDR3	MQASIMNRA	67

T97N	DIYMTQSFSLSLPVTPEEPASISCPSSQSLLHANEYNYLEWYLQKPGQSPQLL IYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASIMNRF QGTVEIK	135
T97N_VL_CDR1	RSSQSLLHSMGYNYLD	59
T97N_VL_CDR2	LGSNRRAS	60
T97N_VL_CDR3	MQASIMNRF	69

11) Variantes de desaminación

Variante	Secuencia	SEQ ID NO
16D5_VH_D52dE	EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIN SKTEGGTTDYAAPVKGKRFITSRDSSKNTLYLQMSLKTEDTAVYYCTTPWEW SWYDYWGQGTLLVTVSS	248
16D5_VH_D52dQ	EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIN SKTEGGTTDYAAPVKGKRFITSRDSSKNTLYLQMSLKTEDTAVYYCTTPWEW SWYDYWGQGTLLVTVSS	249
CD3_VH N100A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIR SKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNF GASVSWFAYWGQGTLLVTVSS	250
CD3_VH S100aA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVERIE SKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNASVSWFAYWGQGTLLVTVSS	251
16D5 [VHCH1]- CD3[VHCH1- N100A]- Fc(botón)_PGLA LA	EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVERIK SKTEGGTTDYAAPVKGKRFITSRDSSKNTLYLQMSLKTEDTAVYYCTTPWEW SWYDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVYTVPSSSLGTQTYICNVNHE PSNTKVDKKEPKSCDGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVERIESKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFPGASVSWFAYWGQGTLLVTVSSASTEG PSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSVYTVPSSSLGTQTYICNVNHEPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC PFCFAPFAAAGGSPVFLFPFKFKDTLMIISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNKY VIGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYEVVSVLTVLHQDMLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHREALHN RYTQKSLSLSPGK	252
16D5-Fc(ojal)- PGLALA	EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVERIK SKTEGGTTDYAAPVKGKRFITSRDSSKNTLYLQMSLKTEDTAVYYCTTPWEW SWYDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVYTVPSSSLGTQTYICNVNHE PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPFCFAPFAAAGGSPVFLFPFKFKDTLMIISRTPE VTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVIGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYEVVSVLTVL HQDMLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPFSRDELTKN QVLSLCAVKGIFYPSDIAVEWENKNGQPENNYKTTTPVLSDDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFPSCSVMHREALHNFFYTKSLSLSPGK	253
CD3-CLC	QAVVTOEPLTYSFGGTVTLTGGSSGAVTTSNYANWVQEKPGQAFEGLIIGG TNKRAPGTFAAPFSGSLGGKAALTLGGAQPEDEEYCALNYSNLTVFGGGT KLTVLGQFKAAPSVTLFPFSEELQANKATLVCLISDFYFCAVTVAWKADSS FVEAGVETPTPKQSNRYAASSXLSLTPAQWKSRRSYSCQVTHEGSTEVEK VAFTECS	254

<p>16D5 [VHCH1]- CD3[VHCH1- S100aA]- Fc(botón)_PGLA LA</p>	<p>EYQLVESCQGLVYKPGGSLRLSCLAAASGFTTFSNANWVVRQAPGEGLEWVGRFX SEEDGGTIDYAAPVKGRFTISRDDSENTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCTTPEWE SWYDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEEF YTVSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKH PSNTKVDKKVDFPKSCDGGGGGG GGREYQLLESQGLVQPGGSLRLSCLAAASGFTTFSYAMNHWVRQAPGEGLEWVS FIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLPAEDTAVYYCVRH ENEGNAYVSWFAYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFFFLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEEFVTVSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ YICNVNKHKPSNTKVDKKVDFPKSCDKHTTCFPCFAPFAAAGGPPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTGVVVDVSHEDFEVDFNHWYVDGVEVHNAKIKPREEQYNSTYR YVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPLEKTIISKAKGQPREPQVYTLTPF CRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYETTPFVLDSDGCSFF LYSKLTVDEKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>255</p>
<p>9D11 [VHCH1]- CD3[VHCL- N100A]- Fc(botón)_PGLA LA</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGCTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWMGLIN PSCGFTSYAQKFGQGRVITRDTSSTSYVMELSSLRSEDTAVYYCARQDFAWL DYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEEFVTV SWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKHKPSN TKVDEKVEPKSCDKHTTCFPCFAPFAAAGGPPSVFLFPKPKDLMISRTPEVT SYAMNHWVRQAPGEGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNLSLPAEDTAVYYCVRHGRFGASVSWFAYWGQGTILVTVSSASVAAPSV FIFPPSEDEQLKSGTASVVCLLNNFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSLSTLTLSLSEADYKHKVYACEVTHQGLSPVTPSSFNRRGECDEHT CFPCFAPFAAAGGPPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTGVVVDVSHEDFEVDFNHW YVDGVEVHNAKIKPREEQYNSTYRYSVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APLEKTIISKAKGQPREPQVYTLTPFCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKITEFPVLDSDGCSFFLYSKLTVDEKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>256</p>
<p>9D11-Fc(ojal)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVVSCHASGCTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWMGIIN PSCGFTSYAQKFGQGRVITRDTSSTSYVMELSSLRSEDTAVYYCARQDFAWL DYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEEFVTV SWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKHKPSN TKVDEKVEPKSCDKHTTCFPCFAPFAAAGGPPSVFLFPKPKDLMISRTPEVT GVVVDVSHEDFEVDFNHWYVDGVEVHNAKIKPREEQYNSTYRYSVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALGAPLEKTIISKAKGQPREPQVCTLPPSEDELTKNQV LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYETTPFVLDSDGCSFFLVSKLTVDEKSR WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>257</p>
<p>9D11_LC [N95Q]</p>	<p>DIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLIHLNGSYNYLDWYLQRPGQSPQLL IYLQSNRRASGVPDFRFSGEGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYVCMQASIMQRTPG QGTKEVEIKRTVAAPSVFIFPPQDEQLKSGTASVVCLLNNFYFREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>	<p>258</p>
<p>CD3_VLCH1</p>	<p>QAVVTQEPQLTVSPQGTVTLTCCGSGTCAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGG ENKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSAQFEDAAYCALWYSNLSLVVFGGST KLTVLSSASTKGPSVFFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEEFVTVSWNSGA LTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKHKPSNTKVDK VEPKSC</p>	<p>259</p>
<p>9D11 [VHCH1]- CD3[VHCH1- S100aA]- Fc(botón)_PGLA LA</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVVSCHASGCTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWMGIIN PSCGFTSYAQKFGQGRVITRDTSSTSYVMELSSLRSEDTAVYYCARQDFAWL DYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEEFVTV SWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNKHKPSN TKVDEKVEPKSCDGGGGGGGGGSEVQLLESQGLVQPGGSLRLSCLAAASGFTT SYAMNHWVRQAPGEGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSENTL YLQMNLSLPAEDTAVYYCVRHGRFGNAYVSWFAYWGQGTILVTVSSASVAAPSV</p>	<p>260</p>

	<p>FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPFAKQVQKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQGLSSFPVTRKSNRGECDKRTHT CFPCEAPEAAGGSPSVFLFPPPKFDLMIISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREFOVYTLTPFCRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>	
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

12) TCB anti-FoIR1 basadas en Mov19 de modos de realización ejemplares (CDR subrayadas)

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
pETR11646 VH-CH1- Fc(ojal) PG/LALA de Mov19	<p>QVQLQDSGAEIYKPGASVKISCKASGYSTFGYFMNVYRQSHGKSLIEWIGRIN <u>PYDGDTFYNQNFKD</u>KATLTVDKSSNTAHMELLESLTSEDFAVYYCTYDGSRA <u>MDYWGQGT</u>TVVSGASTKGPSVFPPLAPSEKSTEGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVYTVFSSSLGTQTYICNVNKKPS NTKVDRKVEPKSCDRTHCFPCPAPEAAGGSPSVFLFPPPKDPLMIISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREFOVCTLPSSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFPSCSVMEALHNNHYTQKSLSLSPGK</p>	136
pETR11647 VH-CH1-CD3 VH-CL- Fc(botón) PG/LALA de Mov19	<p>QVQLQDSGAEIYKPGASVKISCKASGYSTFGYFMNVYRQSHGKSLIEWIGRIN <u>PYDGDTFYNQNFKD</u>KATLTVDKSSNTAHMELLESLTSEDFAVYYCTYDGSRA <u>MDYWGQGT</u>TVVSGASTKGPSVFPPLAPSEKSTEGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVYTVFSSSLGTQTYICNVNKKPS NTKVDRKVEPKSCDGGCGGCGGSEFVQIVESCKGLVQPKGSLMLSCAASGFT <u>FNFIAMN</u>VYRQAPGKGLEWVRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSSNTLI LYLDQNNLKTEDTAMYYCRRHNFQNSIVSWFAYWGQGTFLVTVSAASVAAPS VTIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPFAKQVQKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQGLSSFPVTRKSNRGECDKRTHT CFPCEAPEAAGGSPSVFLFPPPKFDLMIISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREFOVYTLTPFCRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMEAL NNNHYTQKSLSLSPGK</p>	137
pETR11644 LC de Mov19	<p>DIELTQSPASLAVSLGORATISCKKASQSVSFACTSLMHYTHOKPQQPKLLI <u>YRASNLEA</u>CVPTRFSGSGSTFDFTLTIHPVEEELAKTYQQSREYFPYFCG GYKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPFAKQVQKVDN ALQSGNSQESVTEQDPSKSTYLSSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQGLSSFP VTRKSNRGECDKRTHT</p>	138

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
Fc de hu IgG1	<p>DETECTCPCEAPEALLGGPSVFLFPPPKDPLMIISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALGAPIEKTISKAKGQPREFOVYTLTPFCRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVN HEALHNNHYTQKSLSLSPGK</p>	245

5

13) TCB anti-FoIR1 adicionales con moléculas de unión de afinidad intermedia (CDR de acuerdo con Kabat, subrayadas)

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
Variante de 16D5 W96Y/D52E_VH	<p>EVQLVESGGALVVKPGASLFLSCAASGFTSRHAKGVYRQAPGKGLEW <u>VGRIRL</u>SNTEGGTEDYAAPVKGRPTISRDDSSNTLIYLDQNSLKTEDTA <u>VYYCTTPYENSWYDYGQST</u>LVTVSS</p>	401
W96Y/D52E_VH CDR1	N&K&S	16
W96Y/D52E_VH CDR2	RIXSKTEGGT EDYAA PVKG	402
W96Y/D52E_VH	RYENSWYDY	400

CDR3		
Variante de 16D5 W96Y/D52E_VL	QAVVTQEPSELTVSPGGTVTLFCGSSSEGA VTT SNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGYNKRAFGT PARF SGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
W96Y/D52E_CD3- VHCH1_Fc- botón_PGLALA pETR14945	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRAAMSWVRQAPGKGLEW VGRIRKSTEGGTTDYAAPVKGRTIISRDPSKNTLYLQMSLKTEDTA VYYCTTFYENSWYDYNGGGTLVTVSSASTKGPSTVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVVDYFPEFVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSV VTVFSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGGGGGSE VQLLSSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMWVRQAPGKGLEW SEINSEYNNYATYYASSVKGRTIISRDPSKNTLYLQMSLRAEDTAV YYCVREGNFGNSYVSWFAIWDGGTLVTVSSASTKGPSTVFLAPSSKS TSGCTAALGCLVVDYFPEFVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCTCP CPAPFAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDFEVKF NHWYVDGVEVHNARTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYECK VSNKALQAPIERTISRAEGQPREPQVYTLPPQDELTKNQVSLTCLV NGYFSSDI AVEWES NGQFENNYKTPPVLDSDGGFFLYSKLTVDKSR WQQGHWVFSGVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK	403
W96Y/D52E_Fc- oal_PGLALA_HVRF pETR14946	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRAAMSWVRQAPGKGLEW VGRIRKSTEGGTTDYAAPVKGRTIISRDPSKNTLYLQMSLKTEDTA VYYCTTFYENSWYDYNGGGTLVTVSSASTKGPSTVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVVDYFPEFVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSV VTVFSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCTCPAP EAACGQPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDFEVKFNHWY VDGVEVHNARTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYECKVSNK ALQAPIERTISRAEGQPREPQVYTLPPQDELTKNQVSLTCLVNGYFSS DI AVEWES NGQFENNYKTPPVLDSDGGFFLYSKLTVDKSRWQQG HWVFSGVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK	404
14B1 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEW VSAISGGGGSTYYADSVKGFRTIISRDPSKNTLYLQMSLRAEDTAVY YCARGDYRIRYFDYNGGGTLVTVSSASTKGPSTVFLAPSSKSTSGG	405
14B1 VL	SEELTQDFAYSV ALGQPTVRIITC GGDELSSYYAS WYQOK FGQAFVLI YGKNNRPSGTFDFRFGSSSGHTASLTITGAQAEDEADYVY NSRESPP TGLVYFDGGSTRLTVL	406
14B1[EE]_CD3[VLCH 1]_Fc-botón_PGLALA pETR14976	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGGGGSTYYADSVKGFRTIISRDPSKNTLYLQMSLRAEDTAVY YCARGDYRIRYFDYNGGGTLVTVSSASTKGPSTVFLAPSSKSTSGG AALGCLVVDYFPEFVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSV TVFSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGGGGGQA VVTQEPSELTVSPGGTVTLTCSSESTGAVTTSN YANWVQ ERPGQAFRGL IGGYNKRAPGT PARF SGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYEN LWVFGGCTELTVLSSASTKGPSTVFLAPSSSESTSGCTAALGCLVVDY FPEFVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVFSSSLGTQ TYICNVNHPKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCTCPAPFAAGGSPVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDFEVKFNHWYVDGVEVHNARTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYECKVSNKALQAPIERTIS RAEGQPREPQVYTLPPQDELTKNQVSLTCLVNGYFSSDI AVEWES NG QFENNYKTPPVLDSDGGFFLYSKLTVDKSRWQQGHWVFSGVNHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	407
14B1[EE]_Fc- oal_PGLALA pETR14977	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGGGGSTYYADSVKGFRTIISRDPSKNTLYLQMSLRAEDTAVY YCARGDYRIRYFDYNGGGTLVTVSSASTKGPSTVFLAPSSSESTSGG AALGCLVVDYFPEFVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSV TVFSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCTCPAPFA AGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDFEVKFNHWYVD GVEVHNARTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYECKVSNK ALQAPIERTISRAEGQPREPQVYTLPPQDELTKNQVSLTCLVNGYFSS DI AVEWES NGQFENNYKTPPVLDSDGGFFLYSKLTVDKSRWQQGHW VFSGVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK	408

14B1 LC[KK] lambda constante pETR14979	<p>SSSELTQDFAVSVALGQTVRIITCGSSDLRSYASWYDQKFGQAFLVLYI YGCHRRPFGCTPDRFSGSSSSCHTASLTITGQAQAEDEADYCHNSRESPP TGLVVFQGGTKLTVLGGPKAAPSVTLPFSSSKKLGANKATLVCLISD FYPGAVTVAMKADSSPVKAGVETTFPSQSNKYLASSVLSLTFEQW NSRRSYSCQVTHEGSI VEKTVAPTECK</p>	409
9C7 VH	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCHASGYTFPTSYIMHAWRQAPGQGLEW MGLINPFGGGSTSYAOKTQGRVTDITRDTSTSTVIMELSSLSSEDTAVY YCARGDWSYIMDYWGQGLTVTVSS</p>	410
9C7 VL	<p>DIYNTQSFLSLFVTPGEPASISCRSSQSELLHSHNGYNYLWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSSTDFTLKISRVEASDVGVYYCM QARQTPPTFGQGTKVEIK</p>	411
9C7[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-botón_PGLALA pETR14974	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCHASGYTFPTSYIMHAWRQAPGQGLEW MGLINPFGGGSTSYACKTQGRVTDITRDTSTSTVIMELSSLSSEDTAVY YCARGDWSYIMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVEDYFPPEFVTVSWNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYSLSSEVVE VPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDQGGGSGGGSGQAV VTQEPSLTVSPGGTVTLTQGSSTGAVTTSNYANWVQEKFGQAFRGLI GGTNKRAPGTPDRFSGKLLGGKAALTLGGAQPEDEAZYYCALWYSNL WYFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYT EEFVTVSWNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYSLSSEVVTVPSSSLGTQY YICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPPSVFLFP PKPKDTLMISTRTEVTCVYVQVSHEDPEVEKFNWYVDGVEVHNARTK REZQYNSTYRVVSVLTVLHQDKLNGKEYEKCKVSNKALGAPIENTISK AKGQPREPQVYTLPPKDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTFPVLDSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHEAL HHHYTTQKSLSLSPGK</p>	412
9C7[EE]_Fc- ojal_PGLALA pETR14975	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCHASGYTFPTSYIMHAWRQAPGQGLEW MGLINPFGGGSTSYACKTQGRVTDITRDTSTSTVIMELSSLSSEDTAVY YCARGDWSYIMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVEDYFPPEFVTVSWNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYSLSSEVVE VPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPPSVFLFPKPKDTLMISTRTEVTCVYVQVSHEDPEVEKFNWYVDG VEVHNARTKPREZQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYEKCKVSNKAL GAPIENTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLTCAVKGFYPS DIAVEWESNQQPENNYKTTFPVLDSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNV FPCSVNREALHHYTTQKSLSLSPGK</p>	413
9C7 LC [RK] pETR14980	<p>DIYNTQSFLSLFVTPGEPASISCRSSQSELLHSHNGYNYLWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSSTDFTLKISRVEASDVGVYYCM QARQTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDRKLKSGTASVYCLIN NFFYREAKVQWYVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLASSLTLSKA DYERHNQVYACEVTHQGLESPVTKSFRRGEC</p>	414

14) Secuencias de antígenos

Antígeno	Secuencia	SEQ ID NO
hu FolR1	<p>MAQHTTQLLLLLLVVVAVVGEAQTRIAWARTELLAVCMNAEHEREKPGFEDKL HEQCRPWRKNAACCSNTSQAARKDVSYLKRFNWNHCCGEMAPACKRHFIQDTCL YECSPNLGFWIQQVDSWRKERVNLVFLCKEDCEQWEDCRTSYTCKSNWHRG WNTSGENKCAVGAACQPFHFYFFPTVLCNEIWHHSYKVSNYSRGSGRCIQM WFDQAQENFEEVARFYAAMSAGPFAAMFFILSLALMLLWLLS</p>	139
ECD de huFolR1-AcTev-Fc(botón)-marca de Avi	<p>RIAWARTELLAVCMNAEHEREKPGFEDKLHEQCRPWRKNAACCSNTSQAARKD VSYLRFNWNHCCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGFWIQQVDSWRKERV NFFLCKEDCEQWEDCRTSYTCKSNWHRGWNWTSQFNECAVGAACQPFHFYFP TPTVLCNEIWHHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPACGNFMEVVARFYAANKYDE QLYFGGCSPKSADKTHCPPCPAPELLOGGPSVFLFPFPEPKDTLMISTRTEVTC VYVQVSHEDPEVEKFNWYVDGVEVHNARTKPREZQYNSTYRVVSVLTVLHQDNL NGRSYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPKDELTKNQVSLNC LKGFYPSDIAVEWESNQQPENNYKTTFPVLDSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQG NVFPCSVNREALHHYTTQKSLSLSPGSGGLNDIPEAQKIEWHE</p>	140

Fc(ojal)	DKTHICYPFCAPAFELLGGFSVFLFFPKPKDTLMIKRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPRREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKESTKCKVSNK ALPAPTEKTIISKANGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGGFYPSDIYV EWESNGQPENNYETTPPVLDSGGSFLLYKSLTVDKSRWQQGNVPSGSVNHGAL MNRPTOKSLALSFGK	141
mu FolR1	MHLMTVQILLLWVAVVGEAQTWTARAKTELINVCMDAKHHEKFPPELWLS QCSFWKTRNSOCSNTSQAANKDVSYLIRFNVWNGCGEMAPACKERSFIQDTCL YECSPNLGFWIQQVVDQSWKKEKRLDVPFLCKEDCQRWEDDCHTSHTCKSNWHRG WNTSEG VHGCFCAGALCRTPFESYFPTPAALCEGLKSHSYKVSNSYRSGSGRCIQMW FDSAQGNPNEEVARFYAAAMNAGEMLSSTGSLLSLALMLQLWLLG	142
ECD de mu FolR1- AcTev- Fc(ojal)- marca de Avi	TRAPTELINVCMDAKHHEKFPPELWLDQCSFWKTRNSOCSNTSQAANKDVS YLIRFNVWNGCGEMAPACKERSFIQDTCLYECSPNLGFWIQQVVDQSWKKEKRLD VPFLCKEDCQRWEDDCHTSHTCKSNWHRGWNWTSFVHGCFCAGALCRTPFESY FPTPAALCEGLKSHSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMN VDEQLYFQGGSPKSAKSTHTCPCAPAFELLGGFSVFLFFPKPKDTLMIKRTPEV TCVVVDVSHEDPEVVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTIISKANGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL KLCIN KGFYPSDIYVWESNGQPENNYETTPPVLDSGGSFLLYKSLTVDKSRWQQGNV PSGSVNHGALMNRPTOKSLALSFGKSGGLNDIPEAQKIEWHE	143
cy FolR1	MAQRMTTQLLLLLLVVAVVGEAQTWTARAKTELINVCMDAKHHEKFPPELW LSQCSFWKTRNSOCSNTSQAANKDVSYLIRFNVWNGCGEMAPACKERSFIQDTCL YECSPNLGFWIQQVVDQSWKKEKRLDVPFLCKEDCQRWEDDCHTSHTCKSNWHRG WNTSEG VHGCFCAGALCRTPFESYFPTPAALCEGLKSHSYKVSNSYRSGSGRCIQMW FDPAQGNPNEEVARFYAAAMNAGEMLSSTGSLLSLALMLQLWLLG	144
ECD de cy FolR1- AcTev- Fc(ojal)- marca de Avi	RTARAKTELINVCMDAKHHEKFPPELWLDQCSFWKTRNSOCSNTSQAANKDVS YLIRFNVWNGCGEMAPACKERSFIQDTCLYECSPNLGFWIQQVVDQSWKKEKRLD VPFLCKEDCQRWEDDCHTSHTCKSNWHRGWNWTSFVHGCFCAGALCRTPFESY FPTPAALCEGLKSHSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMN VDEQLYFQGGSPKSAKSTHTCPCAPAFELLGGFSVFLFFPKPKDTLMIKRTPEV TCVVVDVSHEDPEVVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTIISKANGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL KLCIN KGFYPSDIYVWESNGQPENNYETTPPVLDSGGSFLLYKSLTVDKSRWQQGNV PSGSVNHGALMNRPTOKSLALSFGKSGGLNDIPEAQKIEWHE	145
hu FolR2	KYWRWHPILLLLLVCVATMCSAQDKTDLINVCMDAKHHEKFPPELWLDQCS FWKTRNSOCSNTSQAANKDVSYLIRFNVWNGCGEMAPACKERSFIQDTCLYECSP NLGFWIQQVVDQSWKKEKRLDVPFLCKEDCQRWEDDCHTSHTCKSNWHRGWNW TSEG VHGCFCAGALCRTPFESYFPTPAALCEGLKSHSYKVSNSYRSGSGRCIQMW FDPAQGNPNEEVARFYAAAMNAGEMLSSTGSLLSLALMLQLWLLG	146
ECD de hu FolR2- AcTev- Fc(botón)- marca de Avi	TMCSAQDKTDLINVCMDAKHHEKFPPELWLDQCSFWKTRNSOCSNTSQAANKDVS YLIRFNVWNGCGEMAPACKERSFIQDTCLYECSPNLGFWIQQVVDQSWKKEKRLD VPFLCKEDCQRWEDDCHTSHTCKSNWHRGWNWTSFVHGCFCAGALCRTPFESY FPTPAALCEGLKSHSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMN VDEQLYFQGGSPKSAKSTHTCPCAPAFELLGGFSVFLFFPKPKDTLMIKRTPEV TCVVVDVSHEDPEVVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTIISKANGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLKLCIN KGFYPSDIYVWESNGQPENNYETTPPVLDSGGSFLLYKSLTVDKSRWQQGNV PSGSVNHGALMNRPTOKSLALSFGKSGGLNDIPEAQKIEWHE	147
hu FolR3	NRWQINQLLLLLLVTRAGSAQFRRARATDLINVCMDAKHHEKFPPELWLDQCS FWKTRNSOCSNTSQAANKDVSYLIRFNVWNGCGEMAPACKERSFIQDTCLYECSP NLGFWIQQVVDQSWKKEKRLDVPFLCKEDCQRWEDDCHTSHTCKSNWHRGWNW TSEG VHGCFCAGALCRTPFESYFPTPAALCEGLKSHSYKVSNSYRSGSGRCIQMW FDPAQGNPNEEVARFYAAAMNAGEMLSSTGSLLSLALMLQLWLLG	148

<p>ECD de hu FoIR3- AcTev- Fc(botón)- marca de Avi</p>	<p>SARARTDLLVCHNAKHHKTPSPFSELYGQCSFWKKNACCTEASTSQELHEDY SRLYNFHWHDHCCKNEPTCKRHFIDDSCLYECSFNLGFWIRQVNGQSWRRERIEN VPLQREDCERWWSICRTSYTCSSNHHEGQHWNTSGINECFAGALCSTFESYFPT PAALCEGLNHSRSEKVSNYSRGSGKCIQNHFFKAGQGNFNEEVAKFYAAAMNAGA ESRGITDSVDEQLYFQGGSPKQADKTHTCPPCFAPELLSGFSVFLFPPKPKOT LMIKRTPEVTCVYVSVSHEDFEVEFHWYVYKGVESHAEKTEPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPTEKTLKAKAQOPREPQVYTLFPFRD ELTKNQVSLWCIVKGYFSDIAVENESMUDQFENNYKTTFFVLDSDESFYLYSK LEVDRSRWQGCNVFSCSUMHEALMHWYTKMSLSLSFGKSGGLNDYFRAQKIEW HE</p>	<p>149</p>
<p>hu CD3ε</p>	<p>MQSGTWRVRLALCLLQVGVWGGDGNBENGGITQTFYKVSIGSTTVILTCPTVF GSEILMQHNDKNIQGDDEDDKNIGSDPDHLSLKRFSELEDSGGYVCTFRGSKPE DANFPLYLAAAPVCCNCEMDVMSVATIVIVDICIQGLLLLVYVSKNREKA KPVIRGASAGGQFQHQCNKERPPFVYVNPQYEPKRGQRDLYSGLMORRI</p>	<p>150</p>

2) Secuencias de nucleótidos de modos de realización ejemplares

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
<p>16A3</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTC AATCTGGTGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG CTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACCTGGGTTCCGTC AAGCCCCGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAOCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGC AGAAATTCAGGGTCCGCTCAGGATGACCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCAACTACTACATCGGTGTTGTTACTTTCCG ACTAFTGGGGTCAAGGCACCCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	<p>151</p>
<p>15A1</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTC AATCTGGTGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG CTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACCTGGGTTCCGTC AAGCCCCGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAOCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGC AGAAATTCAGGGTCCGCTCAGGATGACCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCAACTACTACATCGGTGTTGTTACTTTCCG ACTAFTGGGGTCAAGGCACCCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	<p>152</p>
<p>18D3</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTC AATCTGGTGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG CTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACCTGGGTTCCGTC AAGCCCCGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAOCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGC AGAAATTCAGGGTCCGCTCAGGATGACCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCAACTACTACATCGGTGTTGTTACTTTCCG TCCACTAFTGGGGTCAAGGCACCCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	<p>153</p>
<p>19E5</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTTC AATCTGGTGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG NTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACCTGGGTTCCGTC AAGCCCCGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAOCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGC AGAAATTCAGGGTCCGCTCAGGATGACCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCGGTCAATGCGCTCCGTTACTACTTTCCG ACTAFTGGGGTCAAGGCACCCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	<p>154</p>

ES 2 984 937 T3

19A4	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGTGCTGAAAGTAAAAAAACCGGEGG CTTCGGTTAAAGTGGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCAATTAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGCC AGAAATTCAGGGTTCGGTTCACGATGACCCGGTGGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACCGCGTGGTTEGATCCGTTGGGAACATTTCC ACTATTGGGGTCAAGGCCACCTCGTAACGGTTTCTTCT</p>	155
15H7	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGTGCTGAAAGTAAAAAAACCGGEGG CTTCGGTTAAAGTGGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCAATTAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGCC AGAAATTCAGGGTTCGGTTCACGATGACCCGGTGGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACCGCAACTACTACTGTTCTGTACTTCTTTCC ACTATTGGGGTCAAGGCCACCTCGTAACGGTTTCTTCT</p>	156
15B6	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGTGCTGAAAGTAAAAAAACCGGEGG CTTCGGTTAAAGTGGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCAATTAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGCC AGAAATTCAGGGTTCGGTTCACGATGACCCGGTGGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACCGCAACTACTACTGTTCTGTACTTCTTTCC ACTATTGGGGTCAAGGCCACCTCGTAACGGTTTCTTCT</p>	157
16D5	<p>GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGTGCTGAAAGTAAAAAAACCGGEGG GTTCGGTTAAAGTGGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCAATTAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGCC AGAAATTCAGGGTTCGGTTCACGATGACCCGGTGGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACCGCAACTACTACTGTTCTGTACTTCTTTCC ACTATTGGGGTCAAGGCCACCTCGTAACGGTTTCTTCT</p>	158
15E12	<p>GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGTGCTGAAAGTAAAAAAACCGGEGG GTTCGGTTAAAGTGGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCAATTAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGCC AGAAATTCAGGGTTCGGTTCACGATGACCCGGTGGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACCGCAACTACTACTGTTCTGTACTTCTTTCC ACTATTGGGGTCAAGGCCACCTCGTAACGGTTTCTTCT</p>	159
21D1	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGTGCTGAAAGTAAAAAAACCGGEGG CTTCGGTTAAAGTGGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCAATTAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGCC AGAAATTCAGGGTTCGGTTCACGATGACCCGGTGGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGGCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACCGCAACTACTACTGTTCTGTACTTCTTTCC ACTATTGGGGTCAAGGCCACCTCGTAACGGTTTCTTCT</p>	160

16F12	<p>CAGGTGCAATTTGGTTC AATCTGGTGGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG NPTCCSTTAAAGTGAAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTCCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGSC AGAAATTTCCAGGGTCCGGTCAAGATGACCCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCCCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCCAACTTCACTGTTCGGGGTGTTCGGTTCC ACTATTGGGGTCAAGGCCACCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	161
21A5	<p>CACTCCCACTGCTTAAATCTGGTGGCTGAAAGTAAAAAACCGGGCG GTTCCCTGGGCTGTGAGCTCCGGGGCTTCCGGATTCACCTTCTCCAA CGCCTGGATGAGCTGGGTTCCGCCAGGCCCGCCCAAGGCTCCGAG TGGCTTGGTGTATATCAAGTCTAAAAACTGACGGTGGCACACAGGATT ACCCGGCTCCAGTTAAAGCTGGTTTTTACCATTTCGCCGCAAGGATAG CAAAAACACTCTCTATCTCCAGATCAACTCTCTCAAAACTGAAACAC ACCGCAGTCTTACTACTACTACCCTGGGGAAATGGGCTTGGTTCC ATTATTGGGGTCAAGGCCACCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	162
21G8	<p>GAGGTGCAATTTGGTTC AATCTGGTGGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG GTTCCCTGGGCTGTGAGCTCCGGGGCTTCCGGATTCACCTTCTCCAA CGCCTGGATGAGCTGGGTTCCGCCAGGCCCGCCCAAGGCTCCGAG TGGCTTGGTGTATATCAAGTCTAAAAACTGACGGTGGCACACAGGATT ACCCGGCTCCAGTTAAAGCTGGTTTTTACCATTTCGCCGCAAGGATAG CAAAAACACTCTCTATCTCCAGATCAACTCTCTCAAAACTGAAACAC ACCGCAGTCTTACTACTACTACCCTGGGGAAATGGGCTTGGTTCC ATTATTGGGGTCAAGGCCACCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	163
19H3	<p>CAGGTGCAATTTGGTTC AATCTGGTGGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG CTTCCKGTTAAAGTGAAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTCCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGSC AGAAATTTCCAGGGTCCGGTCAAGATGACCCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCCCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCCAAGTGGATCCGTTGGGGTTACATGG ACTATTGGGGTCAAGGCCACCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	164
20G6	<p>CAGGTGCAATTTGGTTC AATCTGGTGGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG CTTCCKGTTAAAGTGAAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTCCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGSC AGAAATTTCCAGGGTCCGGTCAAGATGACCCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCCCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCCAAGTGGATCCGTTGGGGTTACATGG ACTATTGGGGTCAAGGCCACCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	165
20H7	<p>CAGGTGCAATTTGGTTC AATCTGGTGGCTGAAGTAAAAAACCGGGCG CTTCCKGTTAAAGTGAAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTCCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGSC AGAAATTTCCAGGGTCCGGTCAAGATGACCCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCCCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCCAAGTGGATCCGTTGGGGTTACATGG ACTATTGGGGTCAAGGCCACCCTCGTAAACGGTTTCTTCT</p>	166

11F8_VH	<p>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAASECCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCCTCTGCAAGGCTCTCCGGAGGCACATTTCAGCAC CTACGGTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGACAAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCACTCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCAC AGAAATTCAGGGCAGGGTAACCACTTACTGCAGACAAATCCACGGAG CACAGCCTACATCGAECTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGCTGTTTCTACCGTGGCTTGGTACTCTT TCGACTACTGGGGCCAAGGGACCAACCTGACCGTCTCTCA</p>	167
11F8_VL	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCCACCCTGCTCTGCATCTGTAG GAGACCGTGTCAACATCACTTGCCTGTGCCAGTCAAGATATTAGTAG CTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGGAAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTATGATGCCCTCCAGTTTGGAAAGTGGCTTCCCATCACCTT TCAGCGSCAGTGGATCCGGGACAGAAATCACTCCACCATCAGCAG CTTCCAGCTGATGATTTTGCACCTTATTACTGCCAACAGTATAACC AGCCCAACCACCAACGTTTGGCCAGGGCACCAAAAGTGGAGATCAAG</p>	168
36F2_VH	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAAATCTGGTGCAGGTGAAGTAAAAAAACCGGGC CTTCCGTTAAAGTGCAGCTCCAAAGCATCCCGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCAGCTGGGTTCGTCAAGCCCCGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGC AGAAATTCAGGGTGGCTCAAGATGACCCATGACACTAGCACTTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTCTGAGAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACCTCTTCTTTEACTGGTTTCCAACTGGACT ATGGGGTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTCTCTCT</p>	169
36F2_VL	<p>GAAATCGTGTAAACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAAGATGTTAGCAG CAGCTACTTACCTGGTACCACCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCGGG CTCCTCACTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG CAGACTGGAGCCTGAAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCCAGCAGTAT ACCAACGAACATTATTATACGTTGGGCCAGGGACCAAGTGGAAA TCAAA</p>	170
9D11_VH	<p>CAGGTGCAATTGGTTCAAATCTGGTGCAGGTGAAGTAAAAAAACCGGGC CTTCCGTTAAAGTGCAGCTCCAAAGCATCCCGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCAGCTGGGTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGC AGAAATTCAGGGTGGCTCAAGATGACCCATGACACTAGCACTTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTCTGAGAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACCGGGTCACTTCCGCTTGGCTGGACTATTGGG GTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTCTCTCT</p>	171
9D11_VL	<p>GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGCTEACTCCAG CGGACCGGGGAGCCTTCTTCCCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCA CTCCACCGGCTACAACATATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGT CAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGGGCTTCCG GTGTACCGGACCGTTCTGCGGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCAC GTTGAAAATCAGCCGTTCTGAAAGCAGAAAGACCTGGGCGTTTATTAC TGTATGCAAGCAAGCAATTATGAACCGGACTTTTGGTCAAGGCACCA AGGTCCAAATTAAA</p>	172

ES 2 984 937 T3

9D11_VL N95S	GATATFTGTTATGACTCAATCTCCACTSTCTCTGCCGGTGAAGTCCAG GCGAACCAGGGGAGCAATTTCTTGGCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCA CTCCAAACGGGTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAAACGGGT CAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCG GTGTACCCGACCCCTTTCAGCCGCTCTGGATCCCGCACCGATTTCAC GTTGAAAATCAGCCGTETTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTAC TGTATGACAGGCAAGCATTATGAGCCGACTTTTGGTCAAGGCACCA AGGTCGAAATTAAA	173
9D11_VL N95Q	GATATFTGTTATGACTCAATCTCCACTSTCTCTGCCGGTGAAGTCCAG GCGAACCAGGGGAGCAATTTCTTGGCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCA CTCCAAACGGGTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAAACGGGT CAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCG GTGTACCCGACCCCTTTCAGCCGCTCTGGATCCCGCACCGATTTCAC GTTGAAAATCAGCCGTETTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTAC TGTATGACAGGCAAGCATTATGAGCCGACTTTTGGTCAAGGCACCA AGGTCGAAATTAAA	174
9D11_VL T97A	GATATFTGTTATGACTCAATCTCCACTSTCTCTGCCGGTGAAGTCCAG GCGAACCAGGGGAGCAATTTCTTGGCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCA CTCCAAACGGGTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAAACGGGT CAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCG GTGTACCCGACCCCTTTCAGCCGCTCTGGATCCCGCACCGATTTCAC GTTGAAAATCAGCCGTETTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTAC TGTATGACAGGCAAGCATTATGAGCCGACTTTTGGTCAAGGCACCA AGGTCGAAATTAAA	175
9D11_VL T97N	GATATFTGTTATGACTCAATCTCCACTSTCTCTGCCGGTGAAGTCCAG GCGAACCAGGGGAGCAATTTCTTGGCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCA CTCCAAACGGGTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAAACGGGT CAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCG GTGTACCCGACCCCTTTCAGCCGCTCTGGATCCCGCACCGATTTCAC GTTGAAAATCAGCCGTETTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTAC TGTATGACAGGCAAGCATTATGAGCCGACTTTTGGTCAAGGCACCA AGGTCGAAATTAAA	176
5D9_VH	CAGCTGCAATTCGTTCAATCTGGTCTGAAAGTAAAAAAACCGGGCG CTTCCGTTAAAGTGAAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTCCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCAATTAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGGC AGAAATTCAGGGTCCGGTCAAGGTEACCCGTGACACTAGCACTTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCCTGGTTCGAAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCTCTTACATCGACATGGACTATTGGGGTC AAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCTTCT	177
5D9_VL	GAAATCGTETPTAACGCAGTCTCCAGGCAACCCGTGTCCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCCTCTCTTGCAGGCCCCAGTCCAGAGTGTPTAGCAG CAGCTACTTAGCCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCGAGG CTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCGAGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG CAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCCAGCAGGAT AACTGAGCCCAACGTTCCGCCAGGEGACCAAGTGGAAATCAAA	178
6B6_VH	CAGCTGCAATTCGTTCAATCTGGTCTGAAAGTAAAAAAACCGGGCG CTTCCGTTAAAGTGAAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCACTGGGTTCCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCAATTAACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGGGC AGAAATTCAGGGTCCGGTCAAGGTEACCCGTGACACTAGCACTTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCCTGGTTCGAAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCTCTTACGTTGACATGGACTATTGGGGTC AAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCTTCT	179

6B6_VL	<p>GAAATCGTGTAAACGGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCCTCTCTTCCAGGGCCAGTCAGASTGTTAGCAG CAGCTACCTAGCCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGGCCAGGCTCCCAGG CTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCCAGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCCCGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG CAGACTGGAGCCCTGAAGATTTTCCAGTGTATTTACTGTCCAGCAGAT ATTTGGAGCCCAACSTTCCGGCCAGGGGACCAAAAGTGGAAATCAA</p>	180
14E4_VH	<p>GAGGTGCAATTEGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTUSTACAGCCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCTTGGCAGGCTCCGGATTCACCTTTAGCAG TTATGCCATEAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAG TGGCTCTCAGCTATTACTGCTACTGCTGCTAGCACATACTACCCAG ACTCCGTGAAGGGCCCGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAA CAGGCTGTATCTGCAGATGAACAGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCC GTATATTACTGTGCSAAAGACTCTTCTTACGTTGAATGGETACGCTT TCSACTACTGGGGCCAGGAACCCCTGGTCAACGCTCTCGAGT</p>	181
14E4_VL	<p>GAAATCGTGTAAACGGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCCTCTCTTCCAGGGCCAGTCAGASTGTTAGCAG CAGCTACTTTAGCCTGGTACACAGCAGAAACCTTGGCAGGCTCCCAGG CTCCTCATCTATCCACCATCCAGCAGGGCCACTGCCATCCCAGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCCCGGACAGACTCCACTCTCACCATCAG CAGACTGGAGCCCTGAAGATTTTCCAGTGTATTTACTGTCCAGCAGCA ACCAGCAGCCCAANTTACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAAGTGGAAATCA AA</p>	182
Cadena pesada (VHCH1) para CD3	<p>GAGGTGCAGCTTCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGGCT GGCGGATCTCTGAGACTEAGCTGTGCGCGCCAGCGGCTTCAGC PTCAGCACCTPAGGCCATGAACCTGGGTGGCGCCAGGCCCTTGGC AAAGGCTTGGAAATGGGTETCCCGGATCAGAAECAAGTACAAC AACTACGCCACCTTACTACCGGACAGCCGTTGAAGGGCCCGGCTC ACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCCTTCCGGGCGCAGGACACCGCCCTTETACTATTTGT GTGGGGCAGCGCAACTTCCGGCAACAGCTTATGTTGTCTTGGTFT GCCTACTTGGGGCCAGGGCCACCCCTCGTGAACCTGTCAAGGCT ASTACCAAGGCGCCAGGCTGTCTCCCGCTGGCACCCAGCAGC AAGAACACATCTGGGGAAACAGCGGCTCTGGGTTGTCTGGTG AAAGACTACTTCCCGAGCCCGTGGACCGTGTCTTGGAACTCT GGGCGCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCCGCTGCTG CAGAGCAGCGGCTGTACTCCCTGTCTCCCTGGTCAACCTG CCCTTACCTCCCTGGGAAACACAGACTATATATTTGTAATCTC AATCACAAAGCTTCCAAACACCAAAGTCCGAAAGAACTCGAG CCCAAGAGCTGC</p>	183
Cadena pesada cruzada (VHCk) para CD3	<p>GAGGTGCAGCTTCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGGCTGGCG GATCTCTGAGACTEAGCTGTGCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAC CTACGCCATGAACCTGGGTGGCGCAAGGCTTGGCAAGGCTCTGAA TGGGTGTCCCGGATCAGAAAGCAAGTACAACACTACGCCACCTACT ACGCCGACAGCGTGRAGGGCCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAG CAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCCTGGGGCCGAGGAC ACCGCCGTTACTATTTGTGTGGGACAGGCAACTTCCGGCAACAGCT ATTTCTCTTGGTFTTCCCTACTCCGGCCAGGCAACCTCGTCAACCT GTCAAGCGCTASTGTGGCGGCTCCCTCCGTTGTATCTTTCCCCCA TCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCCGCTCCGTTGTGTCTCTGC</p>	184

	<p>TGAACAATTTTACECTAGGGGAASCTAAAAGTSCAGTGGAAAAGTGGAA TAACCCACTGCACTGCCGCCAACFCCCAGGAATCTGTGACAGAACAG GACTCCAAAGGACAGGACCTACTCCCTGTGCTCCACCCTGACACTGT CTAAGGCTCATTATGAGAAACACAAAAGTCTACGCTCCGAAAGTCAC CCATCAGGGCCCTGAGCTCGCCCGTCCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GACTGT</p>	
Cebador de mutagénesis GAB7734 N95Q	<p>GCAGGCAAGCATTATGAGCCGGACTTTTGGTCAAGG</p>	185
Cebador de mutagénesis GAB7735 N95S	<p>CAGGCAAGCATTATGAGCCGGACTTTTGGTCAAGG</p>	186
Cebador de mutagénesis GAB7736 T97A	<p>CATTATGAAACCGCCCTTTTGGTCAAGGCCACCAAGGTC</p>	187
Cebador de mutagénesis GAB7737 T97N	<p>CATTATGAAACCGCAATTTTGGTCAAGGCCACCAAGGTC</p>	188
VHCH1[16 D5]_VHCH1[CD3]_Fc (botón)_P GLALA pCON999 (TCB invertida con 16D5 2+1: pCON999 + pCON983 + pETR1319 7)	<p>GAGGTGCAATTTGGTGAATCTGCTGGGCGCTCTGGTAAAACCCGGGCG GFTCCCTGCCCTCTGAGCTGCCCGCCCTCCCGEATTCACTTCTCCAA CGGTTGGATGAGCTGGGTTCCGCCAGGCGCCCGGGCAAAAGCCCTCGAG TGGTTGGTCCGATCAAGTCTAAAAGTGAAGGTTGCCACCCACCGGAT ACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTACCATTTCGCGGACGATAG CAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAAGTCTCTGAAAAGTGAAGAC ACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACG ATTAATTGGGGCCAGGRCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGCAC AAAGGGCCCTAGCGTGTTCCTCTGGCCCGCAGCAGCAAGAGCACA AGCGCGGAAACAGCGCCCTGGGCTGCTCGTGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGACAGCGGAGCCCTGACAAGCGG CGTGCAACTTTCCCTGCCCGTCTGCAGAGCAGCGGCTGTACTCC CTGAGCAGCGTGGTCAACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACTCAGA CCTACATCTGCAAGGTGAACCAAGGCGCAGCAACACCAAAGTGGAA CAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGTTCCGGAA GGCGCAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAACTGCGCCGGGCGACTGG TGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTT CACTTTCAGCACCTACGDCATGAACTGGGTGCGCCAGGECCTTGGC AAAGCCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACCT AGCCACCTACTACCGCCAGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCAACCATCAG CCGGACGACAGCAAGAACACCCCTGTACTGACATGACAGTGAACAGCCTG CGGGCCGAGGACACCCCGTGTACTAATGTGTGCGCGCAAGGCAACT TCGGCAACAGCTAATGTCTTGGTTTGGCTACTGGGGCCAGGGCAC CCTGCTGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCGCAAGGTGTTC CCGCTGGCACCCAGCAGCAAGAGGACATCTGGCGGACAGCCGCTC TGGGCTGTCTGGTGAAGAGCTACTTCCCGAGCCCGTGAACCTGTGC TTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTTCAGCC</p>	189

	<p>GTGCTGTCAGAGCACGCGCCCTGTACTECCCTGTCTCCCTCCGTTGGTCAACC TGCCCTCTTAGCTCCCTEGGAACACAGACATATATCTCTAATGTCAA TCACAAGCCCTTCCACACCAAAGTGGATAAGAAAGTCCGAGCCCAAG AGCTGCCACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCACGACCTGAAAG CTGCCAGGGGGACCGTCAAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGA CACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTEAGGTCACATGCGTGGTGGTGG GACGTTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACCTGG ACCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGCCGGAGGAGCA GTACAACAGCACCGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTTCTCCAACA AAGCCCTCCGGCCCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATGCCGGGT GAGCTGACCAAGAACAGGTCAAGCTGTGGTGGCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATGCGCCCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACCTACAAGACCAAGCCCTCCCGTCTGGACTCCGACCGC TCCCTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCCCTGACAAAGAGCGGTGGC AGCAGGGGAAGCTCTTCTCATGCTCCGTTGATCCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGSCAGAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG</p>	
<p>VHCH1[16 D5]_Fc(oja l)_PGLALA _HVRF pCON983</p>	<p>GAGGTGCAATTGGTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCCGGGCG GTTCCCTGGCTCTGAGCTGGCCGGCTTCCGGATTACCTTCTCCAA CCGGTGGATGAGCTGGCTTCCGCCAGGCCCCCGGCAAAAGGCTCGAG TGGGTTGGTCTGATCAAGTCTAAAACCTGACGGTGGCCACCACGGATT ACCGGCTCCAGTTAAAGTCTGTTTACCATTTCGCCGACCGATAG CAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACCTCTCTGAAAACCTGAAGAC ACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCTGGGAATGGTCTTGGTACG ATTATTTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGCAC CAAGGGCCCTCCGTTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAACC AGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGGCTCAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGAAGCTCTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCCGCCGCTGCTGCAGAGTTCTGGCCCTGTATAGC CTGAGCAGCGTGGTCAACCGTCCCTTCTAGCAGCCTGGGCAACCAGA CCTACATCTGCCAAGCTGAACCAAGCCCAAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCCA CCGTGCCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCACTCTTCCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACTATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCCAAGAACCCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTTGGACGGCTGGAGGTTGCATAATGCCAAGA CBAAGCTGGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAAGTACCGTGTGGTTCAG CGTCTEACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAGGCTCTCCAACAAGGCCCTGGGCGCCOCCATCGAGAAAA CCATCTECAAAGCCAAAGGGCAGCCOAGAGAACCACAGGTGTGCAC CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTGAGCCTC TCGTEGECAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCCACATCGCCGTTGGAST GGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAAACAACCTACAAAGAACCCAGCCCTC CGTGCCTGGACTCCGACGGCTCCCTTCTTCCCTGGTGGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCGCTTACCGCAGAAGAGCCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAG</p>	<p>190</p>
<p>CD3_cade na ligera común pETR1319 7</p>	<p>CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCCTGACAGTGTCTCCCTGGG GCACCCGTGACCCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGCCGCCGTGACCAC CAGCAACTAGCTCAACTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCTTC AGAGGACTGATGCGGCGCAGCAACAAAGAGAGCCCTGGGCACCCCTG CCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAAGGCCCGCCCTGACACT</p>	<p>191</p>

	<p>GTCYGGGGCCCCAGCCAGAAAGATGAGGGGCGAGTACTACTGCCGCCCTG TGSTACAGCAAACCTGTGTGGGTGTTCGGGGAGGCAACCAAGCTGACAG TCCTAGGTCAACCCCAAGGGCTGCCCCAGCGTGACCCCTGTTCCCCCC CAGCAGCGAGGAACCTGCAGGCCAACAAAGKCCACCCCTGCTTGCCTG ATCAGCGACTTCTACCCAGGCCGCCCTGACCCGTGCCCTGGAAGGCCG ACAGCAGCCCCCGTGAAGGGCCGGCGTGGAGACCAACCACCCAGCAA GCAGAGCAAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACC CCCGAGCAGTGGAAAGAGCCACAGGTCTCTACAGCTGCCAGGTGACCC ACGAGGGCAGCAACCTGTGGAGAAAACCCGTGGGCCCCACCCGAGTGCAG C</p>	
<p>VHCH1[C D3]_VHCH 1[16D5]_F c(botón)_P GLALA pETR1393 2 (TCB clásica con 16D5 2+1: pETR1393 2 + pCON983 + pETR1319 7)</p>	<p>GAGGTECAGCTGCTGGAATCTGCGGGGCGEATGTTGTCAGCCCTGGCG GATCTCTGAGACTGAGCTGTGGGGCCAGCGGCTTCACTTCAGCCAC CTACGCCATGAACTGGGTGGGGCAGGCCCTGGCCAAAGCCCTGGAA TGGGTGTCCCGGATCAGAAAGCCAGTACAAACAACCTACGCCACCTACT ACGCCGACAGCGTGAAGGGCCCGTTCACCAACAGCCGGGACGACAG CAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCCTGCCGGCCGAGGAC ACCGCCGCTGTACTATTGTGTGGGGCACCGCCAACTTCGGCAGACCT ATGTGTCTTGGTTTGGCTACTTGGGC CAGGGCACCCCTCTGACCGT GTCTCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCTCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACAAAGCCGGCCGAACAGCCGCCCTGGGCTGCTCG TGAAGGACTACTTCCCGGAGCCCGTGGACAGTGTCTTGGAAAGCGGG AGCCCTGACAAAGCCCGCTGCACACTTTCCTTCCCGTCTCTCAGAGC AGCGGCTCTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCAACCTGCTTAGCAGCA GCCCTGGGCACCCAGADCTACATCTGCAAGCTGAACTACAAAGCCCA CAACACCAAAGTGGADAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGC GGAGGAGGCTCCGGAGCCCGAGGATTCGAGGTGCAATTCGTTGAAT CTGGTGGTCTGGTAAACCCGGGGGGTTCCTGCTGCTGAGCTG CCCGGCTTCCGGATTCACTTCTCCAAACCCCTGCAATGAGCTGGGTT CGCCAGGCCCCCGCCAAAGGCTTCCAGTGGGTTGGTCTGATCAAGT CTAAACTGACGGTGGCACTAAGATTAAGGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTTACCATTTCGGGAGCAGATAGCMAAAACACTCTGATCTG CAGTGAACCTCTCTGAAACTGAAGACACCCGAGTCTACTACTGTA CTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAATGGGGCCAGGGCCAC GCTGGTTACGGTGTCTATGCTTAGTAACAAAGGGCCCAAGCTGTTC CCCTTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGGGAAACAGCCGCTC TGGGCTGTCTGGTGAAGACTACTTCCCGGAGCCCTGACCGTGTCT TTGGAACTCTGGCCGCTCTGAGGCGGCTGCAACCTTTCCAGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACTTCCCTGGCTCCCTGGTCCAGCG TGGCCCTCTAGCTCCCTGGGAAACACAGACATATATCTGTAAATGTCAA TCACAAAGCCTTCCAAACACCAAAGTCCATAAAGATGAGCCCAAG AGCTGGACAAACTDACAATGCCCCAGCGTGGCCAGCACCTGAAG CTGCAGGGGGACCCCTCAGTGTCTCTTCCCGCCAAACCCCAAGGA CACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACTGGCTGGTGGTGG GACCTGAGCCACGAGACCCCTGAGGTCAAGTTCACCTGGTACCTGG ACGGCGTGGAGGTGCATATGTCAGACAAAGCCCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACCTACCTGTTGTTGTCAGCGTCTCTCACCCCTCTGCAU CAGGACTGCGTGAATGGCAAGGASTACAAAGTGCAGAGTCTCCAAAC AAGCCCTTGGGGCCCCCATGAGAAAACCACTCTCTCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCAAGTGTACACCCCTGCCCCCTGCGGGGAT GAGCTGAOCAAAGAACCAAGTGTAGCTGTGGGTGGCTGGTCAAGGCT TCTATCCAGGCAACATCCCGCTGGAGTGGAGAGCAATGGCCAGCC GGAGAACAACTACAGAGCCACCCCTGGGTGCTGACTCCCGACGGC TCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCTGGACAAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTTCTCTCATGCTCCGTGATGCAATGAGCTCTGCA CAACCACTACACGAGAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG</p>	<p>192</p>

<p>VHCH1[C D3]_Fc(bot ón)_PGLA LA pETR1371 9 (16D5 formato IgG, 1+1: pETR1371 9 + pCON983 + pETR1319 7)</p>	<p>GAGGTGCAGCTCTGGAATCTGGCCGGCGEACTGGTGCAGCCTGGGG CATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAC CTAGCCCATGAACFSGGTGCCCCAGGCCCTGCCAAAGGCCCTGGAA TGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACT ACGCCSACAGCGTGAAGGGCCCGGTTCAACCATCAGCCGGGACGACAG CAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGGCGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTATTGTGTGCCGGCACGGCAACCTTCGGCCACAGCT ATGTGTCTTGGTTTGGCCTACTCGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGT GTCATCTGTAGCACCAAGGGCCCATGGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGCCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTEG TCAAGSACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACTCAGG CCCCCTGACCCAGCGGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCC TCAGSACTTACTCCCTCAGCAGCCTGGTGCACCTGGCCCTCCAGCA GCTTGGGACCCAGACTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCGAG CAACACCAAGGTGGACAAGAACTGAGGCCAATCTTETGACAAA ACTCACACATGCCACCCGTGCCACAGCCTGAACTTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG GAAGACCTTGAGGTCAAAGTTCAACTGGTACCTGGAGGCGTGGAGG TECATAATECCAAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCTGTGTGGTGCAGCGTCTCAGCCCTCTGCACAGGACTGGCTG AATGGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGGG CCCGCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCGGAGA ACCACAGGTGTACACCCCTGCCCGCATGCCCGGATGAGCTGACCAAG AACCCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCG ACATGCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGACACTA CAAGGCCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAAG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACCAACCACTACAC GCAGAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA</p>	<p>193</p>
<p>Fc_ojal_P GLALA_H VRF pETR1075 5 (16D5 cabeza a cola, 1+1: pCON999 + pETR1075 5 + pETR1319 7)</p>	<p>GACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCACCAGCACCTGAACCTCTGG GGGACCCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCGCCAAAACCCAAAGGACACCCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCCGTGTGGTCAAGCTTCCCTCAGCCCTCTGCACCCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTTCCAACAAAGCC TCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGGCGAGCC CCGAGAACCCACAGGTGTGCACCCCTGCCCGCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCCAGGTGAGCCTCTCGTGGCCAGTCAAAGGCTTCTATE CCAGCGACATCCCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCCGGAGAA CAACTACAAGACCAAGGCTTCCCTGTCTGGACTCCGACGCTCTCTC TTCCTCGTGAGCAAGCTCACCCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAGGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCC CTTCACGCAGAAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA</p>	<p>194</p>
<p>VHCH1[9D 11]_VHCL[CD3]_Fc(b otón)_PGL ALA pCON1057 (9D11 formato invertido, 2+1: pCON1057 +)</p>	<p>CAGGTGCAATTCGTTCAATCTGGTCTGAAAGTAAAAAAACCCGGGG CTTCCGTTAAAGTGAAGCTCCAAAGCATCCCGATACACCTTCACTTC CTATTACATGCAGTGGGTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGCTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAACCCAAAGCGGTGGCCCTACCTCCTACGGCC AGAAATTCAGGGTGGCGTACGATGACCCGTGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCCCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGGGTGACTTCCGTGGCTGGACTATTGGG</p>	<p>195</p>

<p>pCON1051 + pCON1063 + pETR1294 0)</p>	<p>GTCAAGGGCACCCCTCGTAAAGGGTTFCTTCTGCTAGCACAAGGGGCC CAGCCTGTTCCTCTGEGCCCTAGCAGCAAGAGGCACATCTGGCGGA ACAGCCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCTG TGACDSTGTCTGGAACTCTGGCGCCCTGACAAGCCGGCGTGCACAC CTFTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCCTGTACTCTGTGAGCAGC GTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCCACAAGCCCAACACACCAAAGTGGACAAGAAAGGT GGAGCCCAAGAGCTGTGTATGGCCGAGGAGGGTCCGGAGCCGGAGGA TCCGAGGTGCAGCTGCTEGRATCTGGCGCCGACTGGTCCAGCCCTG GCCGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCCGCTTCACCTTCAG CACCTACGCCATGAACTEGGTTGCGCCAGGCCCTTGGCAAAGGCCCTG GAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCT ACTACGCCGACAGCTGGAAGGCCCGSTTCAACATCAGCCGGGAGCA CAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCCTGCGGGCCGAG GACADCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCCACGGCAACTTCGGCAACA GCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGC CGTGTCAAGCCGTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCC CCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCCGGCACCGCCCTCCGTCTGTGT TGCTGAACRATTTTACCTAGGGAAAGCTAAAGTCCAGTGGAAAGT GGATAACGCACCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGGAATCTGTGACAGAA CAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACAC TGTCYAAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTYABSCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCTGTAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG GGAGAGTGTGACAAAGACCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCCCCCTG AAGCTGTCTGGCCGCTCTTCTGTGTCTCTETTCGCCCAAGGCCAA GGACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCGGAAGTGGCCCTGCCTGGTG GTGGATGTCTCCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCCCTGGAGTGCACAAAGCCAAAGACAAGCCGGCGGGAGGA GCAGTACAAACAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCTCACCCGTCTG CACCCAGACTGGCTGATGGCAAGGATACAAGTGCAAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCGGCCGCCCATCGAGAAAACCAATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCGGAGAACCAAGCTGTACACCCTGCCCCCATGCCCCG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCCAGCCTGTGGTGGCTGGTCAAAG GCTTCTATCCAGGGACATCGCCCTTSSAATGGGAGAGCAATGGCCA GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCBAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCCTTCTCAFGCTCCGTFGATGCATGAGGCTCT GCACAACCCTACACGCGAGAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA</p>	
<p>9D11_Fc(o jal)_PGLA LA_HVRF pCON1051</p>	<p>CAGGTGCAATTTGGTTCATCTGGTCTGAAGTAAAAAACCAGGCG CTTCCCTTAAAGTGAAGCTGCAAGCATCCGATACACCTTCACTTC CTATFACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCCGGGCCAGGCTCTGGAA TGGATGGGCATCAFTAACCCAAAGCGGTGGCCCTAACCTCCTACGCC AGAAATTCAGGGTCCGGTCAAGATGACCCCTGACACTAGCACCTC TACCGTTTATATGAGCTGTCCAGCCTGCCTTCTGAAGATACTGCA GTGTACTACTGTGCACGCGTGACTTCCCTTGGCTGAGACTATISSG GTCAAGGCACCCCTCGTAAAGCTTCTTCTGCTAGCACCRAAGGGCC CTCCGGTTCGCCCTGGCCCGCCAGCAGCAAGAGCACCCAGCGGGCC ACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAGCCCG TGACCTGTCTCTGGAAACAGCCGAGCCCTGACCTCCCGCGTGCACAC CTTCCCGCCCGTCTGCAAGCTTCTGGCCCTGTATAECCTGAGCAGC GTGGTACCCGTGCCTTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAAGGTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACRAGAAAGGT GGAGCCCAAGAGCTGGCAAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCA</p>	<p>196</p>

	<p>AACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGFSTEGTEGACGFTGAGGACACGAAEACCCCTGAGGTCAGGTTCAAC TGGTAEAGTGGACGCGCSTEGAGGTTGCATAATGCCAAGACAAAAGCGE GGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTTACCGTGTGGTTCAGCGTCCCTCAC CGTCCCTGCAACCAGGACTGGCTGGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAG GTCTCCAACAAGCCCTCGCGCGCCCCCATOGAGAAAACCACTCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACACAGGTTGTGCACCCCTGCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGGCTCTCGTCCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACACTACAGACCCAGCCCTCCCGTGGTGG CTCCGAGGGCTCCTTCTTCTCGTGGCAGGCTCAGCCGTGGACAAG ACCAGGTTGGCAGGAGGGAAAGCTTCTCATGCTCCGTGATGCAATG AGGCTCTGCACAAACCACTACAGCCAGAAAGGCTCTCCCTGTCTCC GGCTAAA</p>	
<p>9D11_LC pCON1063</p>	<p>GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCOGTTGACTCCAG GGGAACCGGCGAGGATTTCTTGGCGTTCACAGCCAGTCTCTGCTGCA CTCCAACCGCTACAACCTATCTGGATTTGGTACCTGGCAAAAACCCGGT CAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCGG GTGTACCGGACCGTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCCAGCGATTTGAC GTTGAAAATCAGCCGTTGTTGAAGCAGAAAGAGCGTGGGCGTTTATFAC TGTATGCAAGCAAGCAATTATGAACCGGACTTTTGGTCAAGGCACCA AGGTCGAAATTAAGGTTACGGTGGCTGACCCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTGTG TGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAGTACAGTGG AGGTGGATAACGCCCTCCAACTCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTGAC AGAGCAGGACACCAAGGACAGCACTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACCGTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCG AAGTCACCCATCAGGCGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGT</p>	<p>197</p>
<p>VLCH1[CD 3] pETR1294 0</p>	<p>CAGGCTCGTGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTCTGCGG GCACCGTGACCCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGGCGCGCTGACCAC CAGCAACTACGCCAAGTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCTTC AGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCTGGCCACCCCTG CCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAGGCCCGCCCTGACACT GTCTGGCGCCAGCCAGACATGAGGCGGACTACTACTGCGCCCTG TGGTACAGCAACCTGFGGTTGTTGGGCGGAGGCAACCAAGCTGACAG TGCTGAGCAGCGCTTCCACCAAGGCGCTTCCGTTGTTTCTCTGCG TCCCTAGCTCCAGTCCACTCTGGAGGCACCCCTGCTCTGCGGATGC CTCGTGAAGGATTAFTTCTCTGAGCCTGTGACAGTCTCTTGAATA GGGGAGCACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCGCTGTGTGCTGCA GTCTCTGACTGTACAGCCTGAGCAGCCTGCTGACAGTGGCCAGC AGCAGCCTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAACAAGC CCAGCAACACCAAGGTTGGACAAGAGGTTGAAACCCAAAGTETTTGT</p>	<p>198</p>
<p>VHCL[CD3 _Fc(botón)_PGLALA pETR1337 8 (9D11 formato CrossMab, 1+1: pETR1337 8 + pCON1051 + pCON1063 +</p>	<p>GAGGTECAGCTGCTGCAATCTGGGCGCGGACTGFTGACAGCCTGGCG GATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCCGCCAGCGGCTTCACTTCAGCAC CTACGCCATGAACTGGGTGCCCGCAGGCCCCCTGGCAAAAGGCTGGAA TGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACT ACGCGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGGCGGGACGACAG CAAGAACACCCCTGTACTCTCAGATGAACAGCCCTGCGGGCCGAGGAC ACCGGCGTGTACTAFTTGTGTGGCGCACGGCAACTTGGGCAACAGCT ATGTTGTCTTGGTTTGGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGAACCT GTCACTGTCTAGCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCA TCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCCTCGTCTGTGTCTG TGAACAATTTTTACCCCTAGGCAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGG</p>	<p>199</p>

<p>pETR1294 0)</p>	<p>YAAAGCAGCTECAGTCCCGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAG GACTTCAAGGACAGGCACCTFACTCCCTGTCTCCACCCCTGACACTGT CTAAGSCTEATTATGAGAAACACAAAGTCTACCCCTGCGAAGTCAC CCATCAGSSSECTEAGCTCCECCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GATGTGACACAAGACCCACACCTTCTCCCTTGTCTTGCCTCTGAAG CTGCTGSGGGGCTTCTGTGTCTGTCTGTTCCCCCAAAAGCCCAAGGA CACCTTGATGATCAGCCGAGCCCGAAGTGACTTGGCTGTGTGTG GATGTGTCCACAGGACCTTGAAGTGAAGTTCATTTGGTACCTGG ACGSCGTGGAAGTGCACAACGGCAAGACAAAGCCGEGGAGGAGCA GTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTCTGCAC CAGGACTGGCTGAANTGGCAAGGAGTACAAGTCCAAGTCTCCAACA AAGCCTCAGCCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG CCAGCCCGGAGAACCAAGGTGTACACCTTCCCCCTATCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAAGCTGTGGTGCCTGCTCAAAGCT TCTATCCAGCGACATCGCCCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCAAGCTTCCCTGCTGGACTCCGACGGC TCCCTCTCTCTCTACAGCAAGCTEACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAAGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAATGAGGCTCTGCA CAAGCACTACACGCAAGAGAGCTCTCCCTGTCTGGGATAA</p>	
<p>16D5 invertida 2+1 con N100A en CDR H3 pETR1409 6 (pETR140 96 + pCON983 + pETR1319 7)</p>	<p>GAGGTGCAANTGGTTGAACTCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCC GTTCCTTGGCTCTGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG CCCGTGGATGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG TGGGTTGGTCTGATCAAGTCTAAAACCTGACGGTGGCACCCAGGATY ACGGGGCTCCAGTTAAAGTCTTTTTACCAATTTCCCGGACGATAG CAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAAGTCTGTAAAACCTGAAGAC ACCGCACTCTACTACTGTACTACTCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACG ATTATTTGGGGCCAGGGCACCTGGTTACGGTGTCTTCCCTTACGAC AAAGGGCCCTAGCTGTCTCCCTTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG AGGGGGGGAAACAGCCGGCTCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG CCGAGGGGGCTGACAGTGTCTTGGAAACAGGGGAGGCTTGGCAAGGG CGTGCACAATTTCCCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGG CTGAGCAGCGTGGTCAAGCTGGCTTGGCAGGAGGCTGGGCAAGGAG CCTTACATCTGGCAAGCTGAAACCAAGCCCAAGCAACACCAAAAGTGG CAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCCGGAGGAGGGTCCGG GGCCGGAGATCCGAGGTGACAGCTGCTGGAACTGTGGCCGGGAGTGG TGCAGGCTGGGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGGCAGCGGCTT CACCTTACGACCTACGGCATGAAGTGGGTGGGCAAGGCCCCCTGGC AAAGGCTTGGATGGGCTGTCCGGATCAGAAGCAAGTACAAACAAT ACGGCACCTACTAGCCGACAGGCTGAAAGGGGGCTTCCACCTCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGACAGGCTG CGGGCCGAGGACACCCGCTGTACTATTGTGTGGGGCACGGCAACT TCCCGGGCAGCTATGTGTCTTGGTTTGGCTACTGGGGCCAGGGCAC CCTCGTGAAGGCTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGGGTGTTC CCCCTGGCACCCAGGCAAGAGCACATCTGGGGAAACAGCCGCTC TGGGCTGTCTGGTGAAGACTACTTCCCCGAGCCGCTGACCGTGTCT TTGGAACTCTGGGGCCCTGACCAAGGGGCTGCACACCTTTCCAGCC GTGCTGCAGAGCAGGGGCTGTACTTCCCTGTCTCCGTGGTCAAGG TGCCCTCTAGCTCCCTGGGAAACACAGACATATATCTGTANTGTCAA TCAAAAGCTTCCAAACACCAAGTOSATAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGGGCAAAAACCTACACATGCCCCAGGTECCAGTACCTGAAG CTGGAGGGGGACCTCAGTCTTCTCTTCCCTCCAAAAACCCAAAGG CACCTTCATGATCTCCGGGACTCCCTEAGGTCAATGGTGGTGGTGG GACGTGAGCCACGAAGACCTTGAAGTCAAGTTCAACTGGTACCTGG ACGGGCTGGAGGTGCAATTAATGCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCA</p>	<p>200</p>

	<p>GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCCTCCTCACCCCTCCTSCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTSCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTEGGGCCGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGAT GAGCTEACCAAGAACCAGGTCAGCCCTGTGGTGGCTTGGTCAAAGGCT TCTATCCCCAGCSACATCGCCCTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCC GGAGAACAACACTACAAGACCACCGCTCCCCCTGGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCCTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGCTCTCTCATGCTCCGCTGATGCTATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	
<p>16D5 invertida 2+1 con S100aA en CDR H3 pETR1409 7 (pETR140 97 + pCON983 + pETR1319 7)</p>	<p>GAGGTGCAATTGGTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCG GTTCCCTGGCTCTGAGCTGGCCGGCTTCGGGATTCACTTCTCCAA CGGCTGGATGAGCTGGGTTEGCCAGCCGCCGGSCAAAGGGCTCGAG TGGGTTGGTCTGTATCAAGTCTAAAACATGACGGTGGCACCAEGGATT ACCGSSCTCCAGTFAAAGGTCTTTTIAUCAFTTCCCGGACGATAG CAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACCTCTTSAAAAACATGAAGAC ACOCBAETCTACTACTGTACTACCCCTTGGGAATGGTCTTGGTAGE ATYATTTGGGGCCAGSSCAEFCCTGGTFAEGGGTGTUTTCCGCTAGCAC AAAGGGCCCTAGCGTGTTCCTCTGGCCGCCAGCAGCAAGAGCACA AGCGSSGGAACAGCCGCCCTGGGCTGGCTCCCTGAAGGAOYACTTCC CCGASCCTCGTACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGG CGTGCACACTTTCCCTGSCCTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACTCC CTGAGCAGCGTGGTCACCGTGGCTTAGCAGLAGCCTGGGCACCCAGA CCFACATCTGCAACCTGAACCCACAAGCCCAECAACACCCAAATGGA CAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGA GCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAACTCTGGCCGGGACTGG TGCAGCCTGGCCGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCCGCCAGCCGCTT CACTTTCAGCACTACCGCATGAACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGC AAAGGCTTGAATGGGTGTCCCGGATCGAAGCAAGTACACAACT ACECCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGAGGACAGCAAGAACACCCCTGTACTTGCAGATGAACAGCCTE CGGGCCGAGGACACCGCCCTGTACTATTGTGTGCCGCACCGCAACT TCGSCAACCCCTATGTGTCTTGGTTTCCCTACTGGGGCCAGGGCAC CUTCGTGACCGTGTGABGCGTAGTADCAAGGGCCUCCAGCETGTTC CCCCCTGGCACCCAGSCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCTGCTC TGGGCTGTCTGGTGAAGACTACTTCCCGAGCCCGTGAACCTGTCT TTGGAACTCTGGCCCTTGACCAGCGCGTGCACACCTTTCCAGCC GTGCTSCAGAGCAGCGCCCTGTACTCCCTGTCTCCCTCCGTGGTACCG TGCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAAATGTCAA TCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCAATAAGAAAGTCCAGCCCAAG AGCTGGGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAAG CTGGAGGGGGACCGTCAETCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGA CACCTCATGATCTCCCGCACCCCTGAGGTACATGCCSTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG AUGGGGTGGAGGTGCATATATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCA GTACAACAGCACCGTACCCTGTGGTCAAGCTCCTCACCCCTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCGGGCCGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCGAGAAACACAGGTGTACACCTTSCCCCATGCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGGCTTGGTCAAAGGCT TCTATCCCCAGCAATCTCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACACTACAAGACCACCGCTCCGCTECTEGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCCAGGTGGC AGCAGGGGAACGCTCTCTCATGCTCCGCTGATGCTATGAGCCCTTSCA CAACCACTACACCCAGAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	<p>201</p>

<p>cadena ligera fusionada a CH1 para CD3; Fc_PGLAL A; pETR1386 2</p> <p>(anticuerpo kappa-lambda con cadena ligera común para CD3 fusionada a CH1 + Fc_PGLAL A. VH fusionados a cadena constante kappa o lambda pETR1385 9 + pETR1386 0 + pETR1386 2)</p>	<p>CAGGCGTTCGTYGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCG GCACOSTGACCCCTEACATETGGCAGTTECTACAGGCGCCCTGACCAC CAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTC AGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCTTGGCACCCCTG CCAGATTTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAAGCCCGCCCTGACACT GTCTGGCGCCAGCCAGAAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTG TGGTACAGCAACCTGTGTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAG TGCTGAGCAGCCCTAGCAACCAAGGGCCCATCGGTCCTTCCCCCTGCC ACCCCTCCTCCRAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACCGGTGACCGTGTGCTGGAACT CAGGCGCCCTGACCRGCGCCCTGCRACACTTCCCGGCTGTCTCTACA GTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGETGACCGTGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTEAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGSTGGACAAGAASTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAACTCACACATGCCCCACCGTGGCCAGCACCTPGAAGCTGCAGGG GGACOSTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGSACRCCCTCA TGTCTCCCCGACCCCTGAGCTCACATGCGTGGTGGTGGACCTGAG CCACGAAGACCCCTSAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTTGGACGGCGTG GAGGTSCATAATGCGCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGCTCTCAAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAGCCAAAGSSGCAGCCCC GASAAOCA CAGSTGTACACCCCTGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGSTCAGCCTGACCTGCGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACAT CGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCCGAGAAACAACCTACAAG ACCACGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTTACA GCCAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTT CTGATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAACACCACTACACCCAG AAGAGCCTCTCCCTGCTCTCCGGTAAA</p>	<p>202</p>
<p>VH de 16D5 fusionada a cadena kappa constante; pETR1385 9</p>	<p>GAGGTGCAATTTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGCTAAAACCGGGCG GTTCCTTGGCTCTGAGCTGGCGGGCTTCCGGATTCACTTCTCCAA CGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCOCCGGCAAAGSCCTCGAG TGGGTGGTTCGTATCAAGTCTAAAACCTGACGGTGGCACCAGGATT ACGGCGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGGAGCAGATAG CAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACCTGAAGAC ACCGCAFTCTACTACTGTALTACCCCTGEGGAATGGTGTGGTACG ATTATTTGGGGCCAGGGCCACGCTGGTTFACSGTGTCTTCCGCTAGCGT GGCCGCTCCCTCCGTGTTCACTCTTCCCACTTTCCGAGGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGTCTGTGCTGCTGCTGAACAACCTTCTACC CCCCCGRGGCCRAGGTGCAGTGGAAAGSTGGACAACCGCCCTGCAGTC CGCCAACAGCCAGGAATCCGTGACCGASCAGGACTCCAAAGCACAGC ACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCTGTCCAAAGGCCGACTACG AGRAGCACAAAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGAOCCACCAGGGCCTGTC TAGCCCTCGTGACCAAGTCTTTCAAACCGGGGCGAGTGC</p>	<p>203</p>
<p>VH fusionada a cadena lambda constante para CD3; pETR1386 0</p>	<p>GAGTSCAGCTGCTGGAATCCGSCCGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAC CTAGCCCATGAACGCGGTGCCACAGGCTCCTGCCAAGSSGCTCGAA TGGSTGTCCCGGATCAGATCCAAGTACAACAACCTAGGCCACCTACT ACGCCGACTCCGTGAAGSSCCGCTTCAACCATCTCTCCSSGACGACTC CAAGAACACCCCTGTACTCTCAGATGAACTCCCTGCGGGCCCGAGGAC ACCGCCCTGTACTATTGTGTGCGGCCACGCAACTTCCGGCAACTCCT</p>	<p>204</p>

	<p>ATGTGTCTTGGTTFGGCTACTGSSSSCCAGGCCACCCCTCGTGACCST GTCATCTGTAGGCCCAAGGCTGCCCCCAGCSTGACCCTGTFTTCCC CCCAGCAGCCGAGGAACCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCCTGGTCTGCC TGATCAGCGACTTCTTACCCAGGCGCCCTGACDSTGGCCCTGGAAAGGC CGACAGSCAGCCCCCTGGAAGGCCCGGCTGAGAGACCACCACCCCCACAC AAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGA CCCCCGAGCAGTGGAGAGGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTTGAC CCACGAGGGCAGCACCT GTGGAGAAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC</p>	
<p>VHCH1[36 F2]_VHCL[CD3]_Fc(b otón)_PGL ALA pCON1056</p>	<p>CAGGTSCAAATGGTTCAAATCTGGTTCCTGAAGTAAAAAAACCGGGGCGCTTCC GTTAAAGTSGAGCTGCAAAGCAATCCGGATACACCTTCACTTTCCTATTACATG CACTGGGTTCTGTCAAGTCCCGGGCCAGGGTCTGGAAATGGATGGGCATTCATT AAOCOAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCCGAGAAATTCAGGGGTCCGGTC ACSATGACCTCAGACACTAGCACCTCTACDGTTTATATGGAGCTGTCCAGC CTGGGTTCTGAAAGATACAGCAGTGTACTACTGTGCACGCTCTTTCCTTCACT GGTFTCCATCTGGACTATTGGGGTCAAGGCCACCCCTCGTAAAGGTTTCTTCT GCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTAGCAGCAAGAGC ACATCTGGCGGAAACAGCCGCCCTGGGCTGCCCTCGTEAAGGACTACTTTTCC GAGCCTGTGACCGTGTCTCTGGACTCTGGGCGCCCTGACAAAGCGCGGTGCAC AACTTTCAGCCCGTGTCTGCAGAGCAGCGGCCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTG GTCACCGTTCCTAGCAGCAGCCTGGGCGCCCGAGACCTACATCTGCAACGTTG AACCAAGAGCCCGAGCAACACCCAAAGTGGCACAAAGAGGTGGAGGCCCAAG AGCTGTATATGGCCGAGGAGGTTCCGGAGGCCGAGGATCCGAGGTCAGGCTG CTGGAATCTGGCGCGGACTGGTTCAGCCCTGGCCGATCTCTGAGACTGAGC TGTGCCCGCCAGCGGCTTCACTTCAAGCACCTACGCCATGACTGGGTGGCG CAGGCCCTTGGCAAGGCCCTGGAAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTAC AACAACTAGCCCACTTACTAGGCCAGCAGCGTGAAGGGGCCGTTTCACTATC AGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCCTGTACTCTGCMATGAACAGCCCTGCG GCGGAGTACCCCGCGGTGTACTATTGTGTGCGCGCACGGCAACTTCGGCAAC AGCTATGTGTCTTGGTFTTGGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTG TCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCCTTCCGTGTTATCTTTCCCGCATCCGAT GACAGCTGAAAGCGCGCACCGCCCTCCGTGTGTCTGCTGAAACRATTTT TAOCCTAGGGAAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGGCACTGCAGTCC GGCACCTTCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAAGGACAGCACCTAC TCCCTGTCTTCCACCGCTGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACAC AAAGTCTACCCCTGGGAAGTCAACCATCAGGGCCCTGAGCTGCGCCCGTCA AAGAGCTTTCRACGGGGAGAGTGTGACAAAGACCCACACCTGTCTCCCTTGT CCTGCCCCGTGAAGCTGCTGGCGGCCCCCTTCTGTGTTCCTGTTCGCCCCAAAG CCCAAGSACACCCCTGATGATPAGCCGGACCCCGAAGTGAACCTGGGTGTTG GFGATGTGTCCACAGAGGACCTTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTTGGAC GCGGTGGAAATGACAAACCCAAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACTGACCGTGTGGTCAAGGCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCRAAGGTACAAAGTGCAGGCTCTCCAAACAAAGCCCTCCGGCGCCCC ATGAGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCTCGAGAACCACAGGTTG TACACCCCTGCCCCCATGCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG TGGTGCCTGATCAAGGCTTCTATGCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAAGCCGGAGAACAACTACAAAGACCAAGCCCTCCCGTCTGGAC TCCGAGCGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAAGCTTCTCATGCTCCGTEATGCATGAGGCTCTG CACRACCTACTACGGCAGAGAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	<p>246</p>
<p>36F2- Fc(ojal) PGLALA pCON1050</p>	<p>CAGGTSCAAATGGTTCAAATCTGGTTCCTGAAGTAAAAAAACCGGGGCGCTTCC GTTAAAGTSGAGCTGCAAAGCAATCCGGATACACCTTCACTTTCCTATTACATG CACTGGGTTCTGTCAAGTCCCGGGCCAGGGTCTGGAAATGGATGGGCATTCATT AAOCOAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCCGAGAAATTCAGGGGTCCGGTC ACSATGACCTCAGACACTAGCACCTCTACDGTTTATATGGAGCTGTCCAGC CTGGGTTCTGAAAGATACAGCAGTGTACTACTGTGCACGCTCTTTCCTTCACT GGTFTCCATCTGGACTATTGGGGTCAAGGCCACCCCTCGTAAAGGTTTCTTCT GCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTAGCAGCAAGAGC ACATCTGGCGGAAACAGCCGCCCTGGGCTGCCCTCGTEAAGGACTACTTTTCC GAGCCTGTGACCGTGTCTCTGGACTCTGGGCGCCCTGACAAAGCGCGGTGCAC AACTTTCAGCCCGTGTCTGCAGAGCAGCGGCCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTG GTCACCGTTCCTAGCAGCAGCCTGGGCGCCCGAGACCTACATCTGCAACGTTG AACCAAGAGCCCGAGCAACACCCAAAGTGGCACAAAGAGGTGGAGGCCCAAG AGCTGTATATGGCCGAGGAGGTTCCGGAGGCCGAGGATCCGAGGTCAGGCTG CTGGAATCTGGCGCGGACTGGTTCAGCCCTGGCCGATCTCTGAGACTGAGC TGTGCCCGCCAGCGGCTTCACTTCAAGCACCTACGCCATGACTGGGTGGCG CAGGCCCTTGGCAAGGCCCTGGAAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTAC AACAACTAGCCCACTTACTAGGCCAGCAGCGTGAAGGGGCCGTTTCACTATC AGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCCTGTACTCTGCMATGAACAGCCCTGCG GCGGAGTACCCCGCGGTGTACTATTGTGTGCGCGCACGGCAACTTCGGCAAC AGCTATGTGTCTTGGTFTTGGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTG TCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCCTTCCGTGTTATCTTTCCCGCATCCGAT GACAGCTGAAAGCGCGCACCGCCCTCCGTGTGTCTGCTGAAACRATTTT TAOCCTAGGGAAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGGCACTGCAGTCC GGCACCTTCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAAGGACAGCACCTAC TCCCTGTCTTCCACCGCTGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACAC AAAGTCTACCCCTGGGAAGTCAACCATCAGGGCCCTGAGCTGCGCCCGTCA AAGAGCTTTCRACGGGGAGAGTGTGACAAAGACCCACACCTGTCTCCCTTGT CCTGCCCCGTGAAGCTGCTGGCGGCCCCCTTCTGTGTTCCTGTTCGCCCCAAAG CCCAAGSACACCCCTGATGATPAGCCGGACCCCGAAGTGAACCTGGGTGTTG GFGATGTGTCCACAGAGGACCTTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTTGGAC GCGGTGGAAATGACAAACCCAAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACTGACCGTGTGGTCAAGGCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCRAAGGTACAAAGTGCAGGCTCTCCAAACAAAGCCCTCCGGCGCCCC ATGAGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCTCGAGAACCACAGGTTG TACACCCCTGCCCCCATGCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG TGGTGCCTGATCAAGGCTTCTATGCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAAGCCGGAGAACAACTACAAAGACCAAGCCCTCCCGTCTGGAC TCCGAGCGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAAGCTTCTCATGCTCCGTEATGCATGAGGCTCTG CACRACCTACTACGGCAGAGAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	<p>247</p>

	<p>ACCAGGGGCGGACACAGCCCTCTGGGGCTGCCTGGTCAAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGCACCGTGTCTCTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC ACTTTCXXXCGCCGTGTCTGCAGAGTTCCTGGCCCTGTATAGCCTGAGCAGGTG GTACACCGTGCCTCTTAGCAGCCCTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCCAAGGTG AACACAAAGCCAGCAACACCAAGCTGCACAAGAAGGTGGGCCCCAAG AGCTGGGACAAAACCTCACACCTTGCOCACCCSTGCCCCAGCAGCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTTCAGTCTTCCCTCTTCCCGCCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATG ATCTCCCCGGACCCCTGAGGGTCCACATCCGCTGGTGGTGGACCGTGAGCCACGGAA GACCCCTGAGGTCAAAGTTCACACTGGTACGTTGGACCGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCACAGCAAAAGCTCCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCTACCTACCCCTGTGGTTC AGCGTCCCTACCCCTCTCTGCACCCAGGACTGCTGATGGCAAGGAGTACAG TGCAGGTTCTCCAAACAAGGCTCTGGGCGCCGCCATCGAGAAAACCTCTCTCC AAGCCCAAAGGCGAGCCCGGAGAACCCACAGGTTGTGCACCCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCTAGGTCAGCTCTCTCGTCCGCTAGTCAAAGCC TTCTATCCCCAGCCAGCATCGCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACAGCCGGAG AACACTACAAAGACTACGCCCTCCCTGTGCTGGACTCCGACCGCTCCCTTCTTC CTCTGAGGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAAGTGGCAGCAGGGGAAAGCTC TTCTCATECTCCCTGATGCATGAGCCCTCTGCAACACCACTACAGCCAG AAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	
LC de 36F2 pCON1062	<p>GAAA TCCGTGTAACGCACSTCTCCAGCCACCCCTGCTTCTGCTCCAGCCGAA AGACCCACCCCTCTCTTCCAGCCGCGAGTCCAGAGTCTTACCAACAGCTACTTA GCCTGGTACAGGCAAAACCTGGCCONGGCTCCDAGGCCTCCATCCTATGGA GCATCCAGCAGGGCCACTGSCATCCACAGCAGGTTCASTGGCAGTGGATCC GGGACAGACTTCACTCTCCATCCATCAGCAGACTGGAGCCCTGAAGA FTTTCGA GTGTTTACTGTCCAGCAGTATACCAACGAAACATATTATAGCTTGGCCAG GGGCCCAAAGTGGAAATCAAACCTACGGTGGTTCGACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCTACTGTGAGGAGTGGAAATCTGGAACCTCCCTCTGTTGTGTC CTGCTGAATTACTTCTATCCCGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAT AAAGCCCTCCAAATCGGGTAC TCCAGGAGAGTGTCCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCCTACAGCCCTCAGCCGCAACCCTGACCCCTGACCAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGGGAATTCACCCATCCAGGCCCTGAGC TCCGCCCTCACAAAGAGCTTCACAGCGGAGAGTGT</p>	97
VLCH1 para CD3 pETR1294 0	<p>CAGGCCCTCTGTGACCCAGGAAACCCAGCCCTGACAGTGTCTCTCTCCGCGCACCC GTGACCCCTGACATGTGGCAGTTCCTACAGGCGCCGTCGACCCACCAGCAACTAC GCCCACTGGGTGCAGCAAAAGCCCGGCCAGCCCTTCAGAGGACTGATGCGC GGCACCAACAAAGAGAGCCCTCCGCAACCCCTGCCAGATTCAGCCGATCTCTG CTGGCAGGAAAGGCCCGCCCTGACACTGTCTGGGGCCAGCCAGAAATGAG GCCGAGTACTACTGCCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTCTCCGGGGA GGCACCAAGCTGACAGTGTCTGAGCAGCCCTTCCACCAAAAGCCCTTCCGCTG TTTCTCTGACCTCTTAGCTCCAAAGTTCACCTCTGGAGGACCCCTCTCTCTC GACTGCTCTGTGAGGATTAATTTCTGACCCCTGTGACAGTGTCTCTGAAE AGCGGAGCACTGACTCTCTGGAGTGCATACTTCTCCCGCTGTCTCTGAGGCT TCTGACTCTTACAGCCCTGACCAAGCCCTGCTGACACTTCTCCAGCAGCAGCTG GGCACCCAGACTTCACTCTGCAACCTGAAACCAAGCCCAAGCCCAACCAAG CTGGACAGGAGGTGGAAACCAAGTCTTGT</p>	198

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
K53A nt	<p>CAGACCCCTCTGTGACCCAGGAAACCCAGCCCTGACAGTGTCTCTCTCCGCGCACCC GTGACCCCTGACATGTGGCAGTTCCTACAGGCGCCGTCGACCCACCAGCAACTAC GCCCACTGGGTGCAGCAAAAGCCCGGCCAGCCCTTCAGAGGACTGATGCGC GGCACCAACAAAGAGAGCCCTCCGCAACCCCTGCCAGATTCAGCCGATCTCTG CTGGGAGCAAAAGGCCCGCCCTGACACTGTCTGGGCTGACAGCTGTGAAATGAG GCCGAGTACTACTGCCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTCTCCGGGGA GGCACCAAGCTGACAGTCTTA</p>	205
S93A nt	<p>CAGACCCCTCTGTGACCCAGGAAACCCAGCCCTGACAGTGTCTCTCTCCGCGCACCC GTGACCCCTGACATGTGGCAGTTCCTACAGGCGCCGTCGACCCACCAGCAACTAC GCCCACTGGGTGCAGCAAAAGCCCGGCCAGCCCTCCAGAGGACTGATGCGC GGCACCAACAAAGAGAGCCCGCCCTGACACTGTCTGGGCTGACAGCTGTGAAATGAG CTGGGAGCAAAAGGCCCGCCCTGACACTGTCTGGGCTGACAGCTGTGAAATGAG GCCGAGTACTACTGCCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTCTCCGGGGA GGCACCAAGCTGACAGTCTTA</p>	206

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
S35H nt	GAGGTGCCAATYTGTFGGAAAGCCSFAAGCCGGCCCTOYTGAAAGCCTGGCCSAYCY CTGAGACTGSRGCTSTGCOGACCAGGGGCTTCACCTTCAGCRAAGGCTGGATG CACTEGGCTGCCGCCAGSCTCTTGGBAABAGATTCGAGTGGSTGGSAAGGAATC AASAGCAAGACCGATGSGTGGUACCAACCSACTATGCOGCGCCOCTCTGAAAGGGC CGSTTCACCATCAGCAGGGACAGACAGCAAGCAACAACCTTSTACCTGACAGATG AACAGCCTGAAAAACCGAGGACACCGCTGCTACTACTGACACACCCOCTG GAGTGGCTCTGGTAUGACTATTGSAKCCAGGGACACCTCTGTPGACCCGTGTCC TCTDCTAGC	207
G49S nt	GAGGTGCCAATYTGTFGGAAAGCCSFAAGCCGGCCCTOYTGAAAGCCTGGCCSAYCY CTGAGACTGSRGCTSTGCOGACCAGGGGCTTCACCTTCAGCRAAGGCTGGATG AGCTGGGCTGCGCCAGGCCCCGSAAGAGGACTCGASTGGGTGTCCCGATC AAGAGCAAGACCGATGSGTGGUACCAACCSACTATGCOGCGCCOCTCTGAAAGGGC CGSTTCACCATCAGCAGGGACAGACAGCAAGCAACAACCTTSTACCTGACAGATG AACAGCCTGAAAAACCGAGGACACCGCTGCTACTACTGACACACCCOCTG GAGTGGCTCTGGTAUGACTATTGSAKCCAGGGACACCTCTGTPGACCCGTGTCC TCTDCTAGC	208
R50S nt	GAGGTGCCAATYTGTFGGAAAGCCSFAAGCCGGCCCTOYTGAAAGCCTGGCCSAYCY CTGAGACTGSRGCTSTGCOGACCAGGGGCTTCACCTTCAGCRAAGGCTGGATG AGCTGGGCTGCGCCAGGCCCCGSAAGAGGACTCGASTGGGTGTCCCGATC AAGAGCAAGACCGATGSGTGGUACCAACCSACTATGCOGCGCCOCTCTGAAAGGGC CGSTTCACCATCAGCAGGGACAGACAGCAAGCAACAACCTTSTACCTGACAGATG AACAGCCTGAAAAACCGAGGACACCGCTGCTACTACTGACACACCCOCTG GAGTGGCTCTGGTAUGACTATTGSAKCCAGGGACACCTCTGTPGACCCGTGTCC TCTDCTAGC	209
W96Y nt	GAGGTGCCAATYTGTFGGAAAGCCSFAAGCCGGCCCTOYTGAAAGCCTGGCCSAYCY CTGAGACTGSRGCTSTGCOGACCAGGGGCTTCACCTTCAGCRAAGGCTGGATG AGCTGGGCTGCGCCAGGCCCCGSAAGAGGACTCGASTGGGTGTCCCGATC AAGAGCAAGACCGATGSGTGGUACCAACCSACTATGCOGCGCCOCTCTGAAAGGGC CGSTTCACCATCAGCAGGGACAGACAGCAAGCAACAACCTTSTACCTGACAGATG AACAGCCTGAAAAACCGAGGACACCGCTGCTACTACTGACACACCCOCTG GAGTGGCTCTGGTAUGACTATTGSAKCCAGGGACACCTCTGTPGACCCGTGTCC TCTDCTAGC	210
W98Y nt	GAGGTGCCAATYTGTFGGAAAGCCSFAAGCCGGCCCTOYTGAAAGCCTGGCCSAYCY CTGAGACTGSRGCTSTGCOGACCAGGGGCTTCACCTTCAGCRAAGGCTGGATG AGCTGGGCTGCGCCAGGCCCCGSAAGAGGACTCGASTGGGTGTCCCGATC AAGAGCAAGACCGATGSGTGGUACCAACCSACTATGCOGCGCCOCTCTGAAAGGGC CGSTTCACCATCAGCAGGGACAGACAGCAAGCAACAACCTTSTACCTGACAGATG AACAGCCTGAAAAACCGAGGACACCGCTGCTACTACTGACACACCCOCTG GAGTGGCTCTGGTAUGACTATTGSAKCCAGGGACACCTCTGTPGACCCGTGTCC TCTDCTAGC	211
Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
90D7 nt	CAGGTGCCAATYTGTFGGAAAGCCSFAAGCCGGCCCTOYTGAAAGCCTGGCCSAYCY GTTAAAGTGGAGCTGCAAGGATCCGGATACACCTTCACCTTCCTATTACATG CACTGGCTTGGTCAAGCCOCCGGCCAGGCTCTGGAAATGGATGGGCATCATI AACCCAAAGGCTGCTACTACCTGCTACCGGCGGAAATGCCAGGGTGGGCTC ACGATGAGCCCTGACACTAGCCTCTCTACCGGCTTAATAAGGAGCTGTCTCAGC CTGGCTTCTGAAAGTACTGCACTGCTACTACTGCTGCAAGGCACTACACTATC GTTGTTTCTCCGCTGACTATGTTGGGTCAGGGCACCTCTGTAACGGTTCTC TCTDCTAGC	212

ES 2 984 937 T3

90C1 nt	CAGGTGCAATFGSTFCAATCTGGTCTGAAATAAAAAAACCAGGGCGCTTCC GTTAAAGTGAAGCTGCAAAAGCAATCCGATACACCTTCACTTCCATATTACATG CACTGGGFTTCTGCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGGATGGATGGGCATCATTT AACCCAAAGGGSTGGCTTACCTTCCACCGCAGAAATTCAGGGTCCGGTTC ACGATGACCCCTGACACTAGCCACCTCTACCCCTTATATAGCACTGTCCAGC CTGGCTTCTGAAGATACTGCACTGTACTACTGTGACAGCCAACTACTTCCATC GGTTCTGTGCTATGGACTATTTGGGCTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCT TCTGCTAGC	213
5E8 VH nt	CAGSTGCAATFGSTFCAATCTGGTCTGAAATAAAAAAACCAGGGCGCTTCC GTTAAAGTGAAGCTGCAAAAGCAATCCGATACACCTTCACTTCCATATTACATG CACTGGGFTTCTGCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGGATGGATGGGCATCATTT AACCCAAAGGGSTGGCTTACCTTCCACCGCAGAAATTCAGGGTCCGGTTC ACGATGACCCCTGACACTAGCCACCTCTACCCCTTATATAGCACTGTCCAGC CTGGCTTCTGAAGATACTGCACTGTACTACTGTGACAGCCAACTACTTCCATC GGTTCTGTGCTATGGACTATTTGGGCTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCT TCTGCTAGC	214
5E8 VL nt	GATATTGTTATGCAATCTGCACTGCTGAAATAAAAAAACCAGGGCGCTTCC GTTAAAGTGAAGCTGCAAAAGCAATCCGATACACCTTCACTTCCATATTACATG CACTGGGFTTCTGCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGGATGGATGGGCATCATTT AACCCAAAGGGSTGGCTTACCTTCCACCGCAGAAATTCAGGGTCCGGTTC ACGATGACCCCTGACACTAGCCACCTCTACCCCTTATATAGCACTGTCCAGC CTGGCTTCTGAAGATACTGCACTGTACTACTGTGACAGCCAACTACTTCCATC GGTTCTGTGCTATGGACTATTTGGGCTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCT TCTGCTAGC	215
12A4 VH nt	GAGSTGCAATFGSTFCAATCTGGTCTGAAATAAAAAAACCAGGGCGCTTCC GTTAAAGTGAAGCTGCAAAAGCAATCCGATACACCTTCACTTCCATATTACATG CACTGGGFTTCTGCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGGATGGATGGGCATCATTT AACCCAAAGGGSTGGCTTACCTTCCACCGCAGAAATTCAGGGTCCGGTTC ACGATGACCCCTGACACTAGCCACCTCTACCCCTTATATAGCACTGTCCAGC CTGGCTTCTGAAGATACTGCACTGTACTACTGTGACAGCCAACTACTTCCATC GGTTCTGTGCTATGGACTATTTGGGCTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCT TCTGCTAGC	216
12A4 VL nt	GAAATGCTGTTAAGCCAGCTCTCCAGGCAAGCCCTGCTTCTGCTCCAGGGAR AGACCCACCTCTCTTTCAGGGCCAGCTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTA GCTCTGCTACCCAGCAAAACCTGGCCAGGCTTCCAGGCTCCTCATCTATGGA GCATCCAGCAGGCTCCTGCTATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCC GGACAGACTTACCTCTCCATCAGCAGACTGGAGCCCTGAAGATTTTCCA GTGATTTACTGTCAGCAGCAATGGCAGCAGCAGCAGCTTCCGGCCAGGGGACC AAATTTGAAATCAAAAGCTAGC	217
7A3 VH nt	CAGSTGCAATFGSTFCAATCTGGTCTGAAATAAAAAAACCAGGGCGCTTCC GTTAAAGTGAAGCTGCAAAAGCAATCCGATACACCTTCACTTCCATATTACATG CACTGGGFTTCTGCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGGATGGATGGGCATCATTT AACCCAAAGGGSTGGCTTACCTTCCACCGCAGAAATTCAGGGTCCGGTTC ACGATGACCCCTGACACTAGCCACCTCTACCCCTTATATAGCACTGTCCAGC CTGGCTTCTGAAGATACTGCACTGTACTACTGTGACAGCCAACTACTTCCATC GGTTCTGTGCTATGGACTATTTGGGCTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCT TCTGCTAGC	218
7A3 VL nt	GATATTGTTATGCAATCTGCACTGCTGAAATAAAAAAACCAGGGCGCTTCC GTTAAAGTGAAGCTGCAAAAGCAATCCGATACACCTTCACTTCCATATTACATG CACTGGGFTTCTGCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGGATGGATGGGCATCATTT AACCCAAAGGGSTGGCTTACCTTCCACCGCAGAAATTCAGGGTCCGGTTC ACGATGACCCCTGACACTAGCCACCTCTACCCCTTATATAGCACTGTCCAGC CTGGCTTCTGAAGATACTGCACTGTACTACTGTGACAGCCAACTACTTCCATC GGTTCTGTGCTATGGACTATTTGGGCTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCT TCTGCTAGC	219
6E10 VH nt	CAGSTGCAATFGSTFCAATCTGGTCTGAAATAAAAAAACCAGGGCGCTTCC GTTAAAGTGAAGCTGCAAAAGCAATCCGATACACCTTCACTTCCATATTACATG CACTGGGFTTCTGCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGGATGGATGGGCATCATTT AACCCAAAGGGSTGGCTTACCTTCCACCGCAGAAATTCAGGGTCCGGTTC ACGATGACCCCTGACACTAGCCACCTCTACCCCTTATATAGCACTGTCCAGC CTGGCTTCTGAAGATACTGCACTGTACTACTGTGACAGCCAACTACTTCCATC GGTTCTGTGCTATGGACTATTTGGGCTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTTTCT TCTGCTAGC	220

6E10 VL nt	<p>GATATTGATATGACTCAGTCTCCACTGTCTCTGCCCCGACTCCAGGGCGAA CCGGGCAGCAFFFTCTGGCGGTTCAGCCAGTCTCTCTGCTGGACTCCAAACCGC TACAACATACTCGATTGGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTG CTGATCTACCTGGGCTCTAAACCCGCTTCCGGGTGTACCGGACCGTTTCAGC GGGTCTGGATTCGGCACCGGATTTCACTTTGAAATTCAGCCGCTGTTGAAGCA GAAGACSTGGGCGTTTATTACTGTATSCAGGCATGGCATAGCCCAACTTTT GGTCAAGGCACCAAGGTGGAATTAACCGTAG</p>	221
12F9 VH nt	<p>CAGSTECALATGGTFCALATCTGGTCTGAAATAAAAAACCGGGGCGCTTC GTTAAAGTGAAGCTGCABAAGCATCCGGATACACCTTCACCTTCCTATTACATG CACTGGGTCTGCTCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGAAATGGATGGGCATCAT AACCCAAAGCGGTGGCTCTACCTCTACGGCCAGAAATTCACAGGCTGGGCTC ACGATGACDDDEBACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCTCAGC CCGGCTTCTGAAGAFACTGCAGTGTACTACTGTGCACCGGCTGCTACTTAC ACTATGGACTATTGGGGTCAAGGCACCCCTGTAAACGGTTTCTTCTCTAGC</p>	222
12F9 VL nt	<p>GATSTIGTBTGACTCLATCTCCACTGTCTCTGCCCCGACTCCAGGGCGAA CCGGGCAGCAFFFTCTGGCGGTTCAGCCAGTCTCTCTGCTGGACTCCAAACCGC TACAACATACTCGATTGGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTG CTGATCTACCTGGGCTCTAAACCCGCTTCCGGGTGTACCGGACCGTTTCAGC GGGTCTGGATTCGGCACCGGATTTCACTTTGAAATTCAGCCGCTGTTGAAGCA GAAGACSTGGGCGTTTATTACTGTATSCAGGCATGGCATAGCCCAACTTTT TTTGGTCAAGGCACCAAGGTGGAATTAACCGTAG</p>	223

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
<p>pETR11646 VH- CH1-Fc(ojal) PG/LALA de Mov19</p>	<p>CAGGTGCAGCTSCAGCAGTCTGGGCGCCGAGCTCTGAAACCTGGGCGCTTC GTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGGCTTACAGCTTCACCGGCTACTTTCATG AACTGGGTCAAGCAGAGCCACGGCAGAGCCTGGAAATGGATCGGCAGATC CACCCCTACGADGGTGCACCTTCTACAACTGAACTTCAAGGACAAAGCC ACCCTGACCGTGGACAGAGCAGCAACACCGCCACATGGAACTGCTGAGC CTGACDAGCGAGGACTTCGGCTGTACTACTGCACCCAGATAGGAGGCGAGC CGGGCTCATGGATTAATGGGGCCAGGGCTACACCGTGCACAGTGTCCAGCGCT AGCACCAAGGGCCCTTGGGCTGTCCCTGGGCCCCAGCAGCAAGAGCCGC AGCGGGCCACAGCCGCTTGGGCTGGCTGGCTGGCTGAGGACTACTTCCCGGAG CCGSTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGGCTGCACACC TTCCCTGCGCTGCTGCAGAGTCTTGGCTGTAATAGCCTGAGCAGCGTGGT ACCCTGCTTCTAGCAGCCGGGGCAGCCAGAGCTTACATCTGCAAGCTGAA CACGAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAGCTGGAGCCCAAGAGCTGG GACAAAACCTCACACATGCCCAAGGTGAGCCAGCCTGAAAGCTGCAAGGGG CCGTCAAGCTTCTCTTCCCGCCAAAACCCAGGACACCCCTCATATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGGCTGGTGGTGGACCTGAGGCCACGAGGCCCC GAGGTCAAGTTCACCTGCTACTGCTGGACCGGCTGGAGGTTGCATAATGCCAAG ACRAAGCGGGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACCTACCGCTGTGGTCAAGGTC CTCACCTTCCCTGACCCAGGACTGGCTGAAATGCCAAGGACTACAAGTGCAG GTCTCCAAACAAAGCCCTCGGGGCCCCCATCGAGAAACCCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCGGAGAAACACAGCTGTGTCACCCCTGGCCCCATCCCGGGAT GAGGTGACCAAGAACAGGTCAGCCTCTCTGTGAGCAGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACNTGSCCTGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAC TACAGACCCACGCTCCCGCTGCTGGACTTCCGACCGGCTCTCTCTCTCTCA AGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACTCTCTCTCA TACTCCGCTGATGAGGCTCTGCAACAACCCCTACAGCCAGAAAGAGCCCTC TCCCTGTCTCCGGSTAAA</p>	224
<p>pETR11647 VH- CH1-CD3 VH- CL-Fc(botón) PG/LALA de Mov19</p>	<p>CAGGTGCAGCTSCAGCAGTCTGGGCGCCGAGCTCTGAAACCTGGGCGCTTC GTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGGCTTACAGCTTCACCGGCTACTTTCATG AACTGGGTCAAGCAGAGCCACGGCAGAGCCTGGAAATGGATCGGCAGATC CACCCCTACGADGGTGCACCTTCTACAACTGAACTTCAAGGACAAAGCC ACCCTGACCGTGGACAGAGCAGCAACACCGCCACATGGAACTGCTGAGC CTGACDAGCGAGGACTTCGGCTGTACTACTGCACCCAGATAGGAGGCGAGC CGGGCTCATGGATTAATGGGGCCAGGGCTACACCGTGCACAGTGTCCAGCGCT AGCACCAAGGGCCCTTGGGCTGTCCCTGGGCCCCAGCAGCAAGAGCCGC AGCGGGCCACAGCCGCTTGGGCTGGCTGGCTGGCTGAGGACTACTTCCCGGAG CCGSTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGGCTGCACACC TTCCCTGCGCTGCTGCAGAGTCTTGGCTGTAATAGCCTGAGCAGCGTGGT ACCCTGCTTCTAGCAGCCGGGGCAGCCAGAGCTTACATCTGCAAGCTGAA CACGAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAGCTGGAGCCCAAGAGCTGG GACAAAACCTCACACATGCCCAAGGTGAGCCAGCCTGAAAGCTGCAAGGGG CCGTCAAGCTTCTCTTCCCGCCAAAACCCAGGACACCCCTCATATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGGCTGGTGGTGGACCTGAGGCCACGAGGCCCC GAGGTCAAGTTCACCTGCTACTGCTGGACCGGCTGGAGGTTGCATAATGCCAAG ACRAAGCGGGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACCTACCGCTGTGGTCAAGGTC CTCACCTTCCCTGACCCAGGACTGGCTGAAATGCCAAGGACTACAAGTGCAG GTCTCCAAACAAAGCCCTCGGGGCCCCCATCGAGAAACCCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCGGAGAAACACAGCTGTGTCACCCCTGGCCCCATCCCGGGAT GAGGTGACCAAGAACAGGTCAGCCTCTCTGTGAGCAGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACNTGSCCTGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAC TACAGACCCACGCTCCCGCTGCTGGACTTCCGACCGGCTCTCTCTCTCTCA AGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACTCTCTCTCA TACTCCGCTGATGAGGCTCTGCAACAACCCCTACAGCCAGAAAGAGCCCTC TCCCTGTCTCCGGSTAAA</p>	225

	<p>CGGGCCATGGATTATTSSGGCCAGGGCACACCCGTGACAGTGTCCAGGCGT AGGACAAAGGGGDDCCAGGCTGTTCCTCTGGGUCCTAGCAGCAGAGGCACA TCTSSCGGAACAGGCGCCCTGGGCTGCTGTAAGGACTACTTTTDDCGAG COTGTGAOCGTGTCTCTGGAAGCTGTGGCGCCCTGADLAGCGGCTGTGRCRCC TTTCCAGGOCSTGCTGACAGGCGAGGGGCOCTGTACTCTCTGAGCAGGCTGCTC ACCSTGCTTAGCAGGAGGCTTGGGACCCDAGACTTACATCTECAAAGCTGAAAC CACAAAGCCAGGCAACACDCAAAGTGGACDAAAGAGGTGGAGGCCAAGAGCTGT GATSSCGGAGGAGGCTTCCGAGGCGGAGGATCCDAAAGTGCAGCTGGTGGAA AGGSSCGGAGGCTTGGTGCAGCCTAAGGGCTCTCTEAAAGCTGAGCTTGTCC GDCAGCGGCTTEACCTTCAACACCTACGGCATGAACTGGGCTGGGDCAGGCC CTTGGCRAAGGCTTGGAAATGGGCTGCCCGGGATCCAGAGCAGTACACAAAT TACGCCACCTACTACGGDDEACAGCCTGAAGATCCCGCTTACCACTCAGCGG GACGACAGCCAGAGGACTCTGTACCTGACATGAAACAACTTGAAGACCGGAG GACACCGGCTGTACTACTGTGGTGGGGCAAGGCAACTTGGGCAACAGCTAT GTGTCTTGGTTTGGCTACTGGGCGCAGGGCACCCCTGGTGCAGCTGTCTGCT GCTAGGCTGGGCTGCTCCCTCCGCTTATCTTTTDDKCCATCCSATERACAG CTGAAAAGCGGCACTGGCTCCGCTGTGTCTGCTGAAACAATTTTACCCCT AGGSAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAAC TCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTDCAAGGACAGDACCCTACTCCCTG TCCTCCACCCCTGACACTGTCTAAGGCTGATTAAGAGAACACAAAGTCTAC GCGTGGCAAGTCAACCCATCAGGGCTGAGCTGGCCCGTCCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGCTGTGACAAGAACCCACACCTTDDKCCCTGTCTCTGGCCCT GAAGCTGCTGGGCGCCCTCTCTGTGTTCTGTGTTCCUUUCAAAGGCCAAGGAC ACCTTGATGATCAGCGGGACCCCTCGAAGTGAAGCTGGCTGGTGGTGGATGTG TCCCAGGAGGACCCCTGAACTGAACTTCAATYGGTACCTGAAAGCGGCTGGAA GTGCACAAAGCCAAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAAACAGCACTGAC CGTGTGGTCCAGGCTGCTCAGCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAAATGGGAAAG GAGTACAAGTGCAGGCTCTCCAAACAAAGCCCTGGGCGCCCGCCATGGGAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGAGCTCCGAGAACACAGGCTGTACACCTG CCCCCATGCCGAGTGAAGCTGADCAAGAACAGGCTGAGCCTGTGGTGGCTG GTCAAAGGCTCTATACCCAGGCACTGGCCGTGSAAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCDBEAGACAACTACAAAGACCCAGGCTCCCTGCTGAACTCCGAGGCT TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCGTGACAGAGAGGCTGGGAGGCAAG GGGAAAGCTCTCTCATGCTCCGCTGATGCAATGAGGCTCTGRCARAGCCACTAC ACCCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGSGTAAA</p>	
<p>pETR11644 LC de Mov19</p>	<p>GACATCCAGGCTGAGCCAGAGGCCCCCTCTCTGCCCCGTCTCTCTGGGACAG AGAGGCCATCATCAGCTGCAAGGCCCCAGCCAGAGCGTGTCTCTTTGGCGGCACC TCTCTGAGGCTACTGCTTACTACAGAGCCCCGGCCAGCAGGCCAAGCTGCTG ATCTACAGAGCCAGCAACTTCCAAAGCCCCGCTGCCCCAAGATTTTCCBEC AGGGGACAGCAGAGGCTTCCACCCCTGAACCTCCACCCCGCTGGAAGAAGAG GAAGGCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAGAGAGTACCCCTACACCTTCC GGGGAGGCAACCAAGCTGGAAATCAAGGCTACCGTGGCTGCACCATCTGTCT TTCACTCTTCCGCTATGTAAGAGCAGTTGAATCTGGAAGCTGCTCTGTCT GTGTGCTTCTGAGTAACTTCTATGCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG GTGGATAACGCCCCCTCAAATCCGCTTACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACTACAGCCTCAGCAGCAACCTGACCTGAGGCAAA GCRGACTACGAGAAACAGAAAGTCTACGCTTCCGAAAGTCACTCATCAGGGC CTGAGCTGCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGCCGAGAGTGT</p>	<p>226</p>

Variante	Secuencia	SEQ ID NO
<p>16D5 VH_D52dE</p>	<p>GAGGTGCAAATGGTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCC TGGGCTGAGCTGGGCGGCTTCCGAAATTCACCTTCTCCAACGGCTGGATGAG CTGGGTTGGCCAGGCCCCCGGCAAGGCTGCAAGTGGGTTGGTGGTATCAAG TCTAAAAGTGGGGTGGCACCACGGAATACGGGCTCCAGTTAAAGGTGGT TTACCATTTCCCGGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAAGTCT TCTGAAAAGTCAAGGACACCGGAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTAATGGGGCCAGGGCAGCTGGTTACGGTGTCTTCC</p>	<p>261</p>
<p>16D5 VH_D52dQ</p>	<p>GAGGTCGAAATGGTGAATCTGGTGGTGGTGTGGTAAAACC GGGCGGTTCC TGGGCTGAGCTGGGCGGCTTCCGAAATTCACCTTCTCCAACGGCTGGATGAG</p>	<p>262</p>

	<p>CTGGGFTTGCACGGCCCCCGCCAAAGGGCTCSAGTGGGTTGGTCGTATCAAG TCTAAAACCTCAGGCTTGGCCACACGGATTAACGCGGCTCCAGTTAAAGETCEYT TTACCAATTTCCCGGACGATAGCAAAAACACTCTCTATCTCCAGATGAACCTC TCTBAAAACCTGAAGACACCGGAGTCTACTACTGFIACFACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATPATTTGGGGCCAGGGCCACGGCTGGTFAACGGTGTCTTCC</p>	
<p>CD3_VH N100A</p>	<p>GGGTTGCAGCTTCTGGAATCTGCGCGGGGACTGGTGCAGCCTGGCCGGATCTC TGAGACTGAGCTGTGCGCGCCAGGGGCTTCACTTTCAGCACCTACGCCATGAA CTGGGTTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGGGCTGGAAFGGGTGTCCCGGATCAGA AGCRAAGTACACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCAITCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCTCTGACCTTCAGATGAACAG CTTCCCGCCCGGAGCACCGCCGTTGTAATATTTGTGTCCGGCACGGCAACTTC GGCCCCACCTATGTGTCTTGGTTTGGCTACTGGGGCCAGGGCCACCCCTCGTGA CGTGTCAAGC</p>	<p>263</p>
<p>CD3_VH S100aA</p>	<p>GAGTTCGAGCTTCTGGAATCTGGGCGGGGACTGGTGCAGCCTGGCCGGATCTC TGAGACTGAGCTGTGCGCGCCAGGGGCTTCACTTTCAGCACCTACGCCATGAA CTGGGTTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGGGCTGGAAFGGGTGTCCCGGATCAGA AGCRAAGTACACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGT TCACCAITCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCTCTGACCTTCAGATGAACAG CTTCCCGCCCGGAGCACCGCCGTTGTAATATTTGTGTCCGGCACGGCAACTTC GGCCCCACCTATGTGTCTTGGTTTGGCTACTGGGGCCAGGGCCACCCCTCGTGA CGTGTCAAGC</p>	<p>264</p>
<p>16D5 [VHCH1]- CD3[VHCH1- N100A]- Fc(botón)_PGL ALA</p>	<p>GAGTTCGAAATTTGGTTGAAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCGGTTCCX FGCGTCTGAGCTTCCCGGCTTCCGGATTCACCTTCTCAACGGCTGGATGAG CTGGGTTGCCAGGCCCCCGGCCAAAGGGCTCGAGTGGGTTGGTCTGATCAAG TCTAAAACCTGACGGTGGCAACACGGATTAACGGGCTCCAGTTAAAGGTCGTY TTACCAATTTCCCGGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTCCAGATGAACCTC TCTGAAAACCTGAAGACACCGGAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCCACCGTGGTTACGGTGTCTTCCGGTA GCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCTCTCGGCCCCAGCAGCAAGGACACAGAG CGSCGGAAACAGCCGCGCTGGGGCTGGCTGTGAAGGACTACTTCCCGAGGDC GTGACAGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGACAAAGCGGCGTGCACACTTTC CTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCAAGCT GCTTAGCAGCAGCCCTGGGCACCCAGACCTACATCTCCAAAGCTGAACACAAAG CCAGCAACACCAAAGTGGACAAAGAGTGGAGGCCAAAGAGCTGTGATGGCG GAGGAGGCTCCGGAGGCGGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGCTGGAAATCTGGCG CGGACTGGTGCAGGCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCGCCAGCGGC TTCACCTTCAGCACCTACGGCATGAACCTGGGTCGGCCAGGCCCTGGCAAAG GGCTGGAAATGGTGTCTCCGGATCAGAAGCAAGTACAAACAACCTACGGCACCTA CTACCCGACAGCTGTAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAG AAGACTCTCTACTCCAGATGAACAGGCTTCCGGCCGAGGACACTCCGCTGT ACTATTGTGTGCGGCCACGGCAACTTCCGGCCAGCTATGTGTCTTGGTFTGC CTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGAAGCTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGC CCAGCGTGTTCGCCCTGGGCACTCAGCAGCAGAGGACATCTGGCCGAACAG CGGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGACTACTTCCCGGAGCCCGTGAAGGTTGT TTCGAACCTTCGGCCGCTGACCAGCGGCTGCACACCTTTCAGCGGCTGCTG CAGAGCCAGGGCCCTGTACTGCCCTGTCTCCGCTGGTCAAGCGTGCAGGCTCTAGET CCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAAATGTCAATCACAAGCCCTTCCAAAC CAAAGTGCATAGAAAAGTGAAGCCCAAGAGCTCCGACAAAACCTCACCATTC CCACCGTGCCTCAGCAGCTGAAGCTGCAGGGGACCCGTCACTCTTCTCTTTC CCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCACACTGGTAC CTGGACGGGCTGGAGGTGCATAAATGCTCAGCAAGCCCGCCGGAGGACAGT ACAAAGCACCTACCGGTGGTGTAGGCTCTTCACTCTCTCTGCAACAGGACTG GCTGAAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGCTCTCCAAACAAGCCCTGGGGCC CCCATGCAAAAACCATCTCCAAAAGCCAAAGCCAGCCCGGAGAAACACAGG TGTACACCCCTGCCCCCATGCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAAGCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCCACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAAATGGGCAGGCTGAGAACAACTACAAGACCCAGCTCCCGTGTCTGGACT CCGACGGCTCTCTTCTTCTTACTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGGTCAGGTG</p>	<p>265</p>

	<p>GCACGAGGSSPACGTCCTCTCATGCTCCGGTGAATGCAATGAGGCTCTGCAACAC CACATACCGCAGAGAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	
<p>16D5-Fc(ojal)- PGLALA</p>	<p>GAGGTGCATTTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCGGTTCCG TCCCTCTGAGCTGGCGGGCTTCCGGAATTCACCTTCTCCAAACCGCTCGATGAG CTGGGTTCCGCAAGGCCCCGGCCAAAGGCTCTGAGTGGGTTGGTCTGTATCAAG TCTAAAACATGACGGTGGCACACCAGGATTAACCGGCTCCAGTTAAAGGTCGT TTACCAATTTCCCGGGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAAGTC TCTGAAAACATGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTAATTTGGGGCCAGGGCACGGCTGGTTACGGTGTCTTCCGGTA GCACCAAGGGKCCCTTCCGTGTTTDDCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAG CGGCGCACAGCCGCTCTGGGCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GTGACCTGTCTCTGGAAACAGCGGAGGCTTGAACCTTCCGGCTGACACCTTCC CCGCTCTCTCCAGATTTCTGGCTGTATAGCCCTCAGCAGCGCTGGTCCACCT GCCTTTTAGCAGCCTGGGCAACCGAGCTTACTTCTGCAACGTTGAACACACAG CCAGCAACACCAAGGTTGGCAAGGAGGTTGGAGCCCAAGAGCTCCGACACAAA CTGACACAATGGCCAGCTGCCAGGACCTTGAAGCTTGCAGGGGAGCGCTCAGT CTTCCCTTCCGCCCCAAAACCCAGGACACCTTCATGATCTCCCGGAGCCCT GAGGTCAACATGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TCAACTGGTACGTTGGACGGCTGASGCTCCALAAATGCCAAGCAAAAGCCGG GGAGGAGCAGTGAACAGGACGTAACCTGTGGTTCAGGCTTCCCTCAGCGTCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGCTTCCAACAAAG CCCTCGGGCTCCCAATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCTTGG AGAATCACAGGTTGTCACCTTCCGCCCCNTCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCTTCTGTTGGCAGTCAAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCTG TGGAGTGGGAGAGCAATCGGCAGGCGGAGAGCAACTACAGAGCCAGGCTTCC CGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGCTGAGCAAGCTCACCCTGGAC AAGAGCAGGTTGGCAGCGGGGAACTGCTTCTCATGCTCCGCTGATGCAATGAGG CTCTGCACAACCTCTCACGCAGAGAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	<p>266</p>
<p>CD3-CLC</p>	<p>CAGGCGGTCCTGACCCAGGAACCCAGGCTGACAGTGTCTCCCTGGCGGGCACGG TGACCCCTGACATOTGCCAGTTCATACAGGGCCGCTGACCCACCAACCACTACCC CAACTGGGTGCAGGAAAAGCCCCGGCCAGGCTTCCAGAGGACTGATCGGGCGC ADCAACAAAGAGAGCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGG GAGGAAAAGCCGCTGACACTGTCTGGCGCCAGCCAGAGATGAGGGCCGA GTACTACTGGCCCTGTGGTACAGGCAACTGTGGGTGTTCGGCCGAGGCCACC AAGCTGACAGTCTAGGTCAAACCCAGGCTGCCCCCAGGGTGAACCTGTCTCC CCGCGAGGAGGAGGAACTGCAGGCCAACAAAGGCCACCTGGTGTGCTGTGAT CAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGCTGACCTGTGCTTGGAGCCCGACAGCCAGC CCGCTGAGGCTGGCGCTGGAGACCACTGCTGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG AGTACGGCGGCGAGGACTACCTGAGGCTTACCCCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG CAGGCTTACAGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG GTGGGCTCCACCGAGTCCAGC</p>	<p>267</p>
<p>16D5 [VHCH1]- CD3[VHCH1- S100aA]- Fc(botón)_PGL ALA</p>	<p>GAGGTGCATTTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCGGTTCCG TCCCTCTGAGCTGGCGGGCTTCCGGAATTCACCTTCTCCAAACCGCTCGATGAG CTGGGTTCCGCAAGGCCCCGGCCAAAGGCTCTGAGTGGGTTGGTCTGTATCAAG TCTAAAACATGACGGTGGCACACCAGGATTAACCGGCTCCAGTTAAAGGTCGT TTACCAATTTCCCGGGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAAGTC TCTGAAAACATGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTAATTTGGGGCCAGGGCACGGCTGGTTACGGTGTCTTCCGGTA GCACAAAGGGKCCCTAGCGTGTTCCTCTGSGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAG CGGCGCACAGCCGCTCTGGGCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GTGACCTGTCTCTGGAAACAGCGGAGGCTTGAACCTTCCGGCTGACACCTTCC CTGCGTGTCTGACAGGCAAGCCCTTGTACTTCCCTGAGCCAGGCTGGTCCAGCT GCCTAGCAGCAGCTGGGCAACCCAGACCTTACTTCTGCAACGTTGAACACACAG CCAGCAACACCAAGGTTGGCAAGGAGGTTGGAGCCCAAGAGCTCCGACACAAA GAGGAGGCTCCGAGGGCGGAGGATCCGAGGTCAGCTTCTGCAATCTGGGG CGGACTGGTGCAGGCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTTGTGCGGCCAGCGGC TTCACCTTACAGCCTACGCTTGAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT GCCTGGAAAGGGTGTCCCGGTTGAGAGGCAAGTACAAACACTACGGCACCTTA CTAGCCGAGAGGCTGAGAGGCCCCGTTTCACTCAAGCCCCGGGAGCAGCAGCAG</p>	<p>268</p>

	<p>AACACCCCTGTACCTGCAGATGAAACAGCCCTGCGGGCCGAGGACACCCGCGTBT ACYATYTGSTGCCGCCACGGCAACTTGGSCAACCCCTATGTGTCTTGGTTFYGC CTACTTBBBECCLGGGCRCCCTGCTGACCGTGTCAASCGCTAGTACCCRAGGGC CCCAGCSTSTTCCCCCTGGGACCCAGCCAGONAGAGCACATCTGGCCGGAACAG CCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGACCTACTTCCCCGAGCCCGGTGACCGTGTG TTGGAACTCTGGGGCCCTGAACCAGTGGGCTGACACCCCTTTCAGCCCTGTGCTG CAGAGCAGCGCCCTGTACTCCCTGTCTCTCCCTGCTCACCCTGCCCCCTCTAGCT CCGTGGGAACACAGACATATATCTGTAAATGTCAATPCACAAGCCCTTCCAACAC CAAAGTCCGATAAAGAAAGTCCAGGCCCAAGAGCTCCGACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGGCCAGCACCTGAAGCTGACAGGGGGACCCGTCACTCTTCCCTCTTCC CCCCAAAACCTCAGGACACCCCTCATGATCTTCCCGGACCCCTGAGSTCACATG CGTGGTGGTGGGCGTGGAGCCACGSAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGATAC GTGGACCGCCGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAAAGCCCTCCGGAGGACAGT ACAACAGCACGTFACCGTGTGTGTCAGCGTCTCACCGTCTTGCACCCAGGACTG GCTGATGGCAAGGAGTACAAAGTGCAGGCTCCAAAGGCTCCAAACAAAAGCCCTCCGGCC CCGATCGAGAAAACCATCTCCAAAAGCCAAAGGGCAGCCCTCCGAGAACCCACAG TGTACACCCCTGCCCCCATGCCCCGGAAGAGCTGACCAAGAACCCAGGTCAGGCT GTGGTGGCTGTCAAAAGGCTTCTATGCCAGCACATGGCCCGTGGAGTGGGGAG AGCAATGGGCGCCGGAGAACAACTCAAGACCCACGCTCCCGCTGGCTGGACT CCGAGGCTCTCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGCTG GCAAGAGGGAAGCTCTTCTCATGCTTCCGTCATGTCATGAGGCTCTGACACAC CACTACACCCAGAACAGCCCTCTCTCTGCTCCCGSTAAA</p>	
<p>9D11 [VHCH1]- CD3[VHCL- N100A]- Fc(botón)_PGL ALA</p>	<p>CASGTGCAATGGGTTCAATCTGGTGTGAAGTAAAAAAAACCGGGGCTTCCG TTAANGTGAAGCTGCAAAAGCTTCCGATACACCTTCACCTTCCATTTACATGCA CTGGGTTCGTCAAAGCCCGGGGCCAGGCTCTGGAAATGGATGGGCTCATTAAC CCAGCGGTGGCCCTACCTCCCTACCGCCAGAAATTCAGGGTTCGGCTCACGA TGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTCATATGGAGCTGTCCAGCCCTGG TTCTGAAGA TACTGACAGTGTACTACTGTGACCCCGGTGACTTCCGCTGGGCTG GACTATTGGGTCAGAGCCACCCCTGTAACGCTTCTTCTGCTAGCACAAAGG GCCCAGGGTGTTCCTCTGGCCCTTACAGCAAGAGCCACATCTGGCCGAAAC AGCCGCTCTGGGCTGCTCTGTGAAGGACTACTTTCGCGAGCCTGTGACCGTGC TCTGGAACTCTGGCCGCCCTGACAAAGCGGCTGCACACCTTTCAGCCGCTGC TGCAGAGCAGCGCCCTGTACTCTGTGAGCAGCGTGGTCAACCGTGCCTAGCAG CAGCCGCGGACCCAGAGCTTACATCTGCAAGCTGAACCCAGCCAGCCAGC ACCAAAGTGGACAAAGAGGTTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCCGAGGAGGCT CCGGAGGCTGGAGTCCGAGGTCAGCTGTGGAATCTGGCCGGGACTGGT GCAGCTTGGCCGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCCCAGCCGCTTCACTTIC AGCACTTACCCATGAAGTGGGTCGTCAGGCCCCGCAAAAGGCTTGGAAAT GGTGTCCCGGATCAGAAAGCAAGTACAAACACTTACGCCACCTACTACGCCGA CAGCGTGAAGGGCGGCTTCCCATCAGCCCGGAGGACAGCCAAAGACCCCTG TACCGCTGATGAAAGAGCTGCGGGCCGAGCACCCGCTGTACTATTGTG TGGGCAAGCCAACTTGGGCGCCAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGG CCAGGCLACCTCGTGACCGTGTGTCAGGDETLAGTGTGGCCGCTTCCCTCCGTS TTTACTTTCCTCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGACCCGCTCCGCTG TGTGCTGTGTCGAACAATTTTACCCCTAGGGAAGCTAAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGAC TCCAGGACAGCACTTCCCTGTCTCCACCCCTGACACTGTCTAAGGCTG ATTATGAGAAACACAAAAGTCTAGCTTGGCAAGTCAACCATCAGGCTGTAG CTGGCCCTGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAAGACCCACCC TGTCCGCTTGTCTTCCCTGAAAGCTGCTGGCCGCTTCTGTGTCTCTGT TCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGC CTGGCTGTGTGGATGTGTCCACAGGAGCCCTGAAAGTGAAGTTCAATTCG TADGTGAGCCGCTGGAGTGCACAGGCTCAAGACAAAAGCCGCGGAGGAC AGTACAAAGACAGCTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGCTCTGCACCCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGCTTCCAAACAAAAGCCCTCCGGC GCGCCATCTGAGAAAACCATCTCCAAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCAC AGSTGTACACCCCTGCCCCCATGCGGAGTGTAGCTGACCAAGAACAGGCTGAG CCTGTGGTGGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCCGACATCGCCGCTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAAGCCGGAGAACAACTACAAAGACCCAGCCCTCCCGTGTGG</p>	<p>269</p>

	<p>ACTCCGAGCGCTCCCTTCCTTCTCTACACCAAGCTCCACCGTGGACAAAGAGCAG GTGCCAGCAGGGGAACGTCTTCTCTATGCTCCGTTGATGCCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGGCAGAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG</p>	
9D11-Fc(ojal)	<p>CAGCTGCATTTGGTTCAATCTGGTCTCAAACTAAAAAACCCCGGCTTCCG TTAAGTGAAGCTGCAAAAGCATCCGGATACACCTTCACCTTCTATTACATGCA CTGGGTTCTGTCAGCCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAAC CCAAGCGGTTGGCCCTACCTCCTACGGCCAGAAATTCACAGGGTCCGGTCAAGA TGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTCTTATATGGAGCTGTCCAGGCTGCG TTCTGAAGATACCTGCAGTGTACTACTGTGCACGGCGTACTTCGGCTTGGCTG GACTATTGGGGTCAAGGCACCCCTCGTAACGGTTFCTTCTGCTAGCACCAAGG GCGCTTCCGTGTTCCCGCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCTACTAGCGGGGGCAC AGCCTCTCTGGGCTGCGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAGCCCGTCTCCGTG TCTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCTTCCGGCTTGCACACTTTCCTCTCTGTG TGCAGAGTTCTGGGCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCAAGCTGCTTCTAG CAGCTTGGGCAAGAGAGCTTACATCTGCAAGCTGAACTCAAGAGCCAGCAAC ACCAAGTGGACAAAGAGGTTGAGGCCCCAAGAGCTGGACAAAATCAGCAT GCGCAGCGTGGCCAGCAGCTGAAAGCTGCAAGGGGAGGAGGCTGCTTCTCTT CCCCCCAAAACCCAGGAGCAGCTCATGATCTTCCCGGAGCCCTGAGGTCACA TGGCTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAAGCTCTGAGGTCAGTTCAACTGGT AGCTGGAGCGCTGGAGGTTGCATATGCEAAGACAAAGCCCGGGAGGGAGCA GTACAACAGTACTTACTCTGTGCTCAAGCTTCTCACCGTCTTGCACCCAGGAC TGGTGTAAATGGCAAGGACTACAACTGCAAGGCTTCCAAACAAAGCCCTCGGG CCCCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAAGGCCAAGGGCAGCCCCGAGAAACACA GGTGTGCACCCCTGCCCCCATCCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAGC CTCCTGTGGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACTGCGCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGCCAGCCCCGAGAACTACAAGACCCAGCCCTCCCGTCTGGA CTCAGAGGGCTCTCTCTCTCTCTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAGCTCTTCTCATGCTCCGTTGATGCAATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACCCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG</p>	270
9D11_LC [N95Q]	<p>GATATTTGTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCGGGTGACTCCAGCCGAAC CBBGAGCATTTTCTTCCCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAGCGGCTA CAACTATCTCGATTGGTACTTCCAAAAACCGGGTCAAGGCTCTCAGCTGCTG ATCTACCTGGGCTCTAACCGGCTTCCGGTGTACCGGACGCTTTCAGCGGCT CTGGATCCCGCCACCGATTTCACTGTGAAAATCAGCCGCTGTGAAAGCAGAGC CBTGGGGCTTTATTAAGTGTATGCAAGGCAAGCATTAATGCAAGCGGACTTTTGT CAAGGCACCAAGGTCGAAATTAAGCTTACCGTGGCTGCACCACTCTGTCTCA TCTTCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCCCTCTGTGTGTG CTGGCTGAAATRACTTCTATCCCGAGAGGECNAAGTACAGTGGAGGCTGGAT AACCTCCCTCCAACTGGGTAAGTCTCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AAGGACAGCAGCTACAGGCTCAGGACACCTTGAAGGCTGAGCAAAAGCAGACTA CEAGAAAACAAAGTCTAGGCTTCCGAAGTCAAGCATCAGGCTTGAAGCTGCG CCGCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGACTGT</p>	271
CD3_VLCH1	<p>CAGCCCTTCTCAGCCAGAAACCCAGCTCAGAGTGTCTCCTGGGCGCACCG TGACCTGTACATGTGCGCAGTTCTACAGGGCCCGTGAACCCAGCAACTAGCC CACTTGGGTGCAAGGAAAAGCCCGGDCAGGCTTTCAGAGGACTGATCCGCGCC ACCAAGAGAGAGCCCCCTGGCACCCCTGGCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGG GAGGAAAGGCGCCCTGACACTGTCTGGGCGCCAGCCAGAAAGATGAGGCGGA GTACTACTGCGCCCTGTGTGACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACC AAGCTGACAGTGTGTGAGCAGCGCTTCCACCAAAAGGCGCTTCCGCTGTTCTCT TGGCTCTCAGCTCCAGTCCAGCTCTTGGAGCCACCGCTGCTCTGGATGCTCT CBTGAAGGATTAATTTTCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGAAATAGCGGAGCA CTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCGGCTGTGCTGCAAGTCTCTGGACTGT ACAGCTTGAAGCAGCGTGGTGAAGTGGCCAGCAGCGCTTGGGCAAGCAGAC CTACATCTGCAGCTGAAACCAAGGCGCAGCAACACCCAGGTTGGCAAGCAAG GTGAAACCCAGCTCTGT</p>	272
9D11 [VHCH1]- CD3[VHCH1- S100aA]- Fc(botón)_PGL ALA	<p>CAGGTGCATTTGGTTCAATCTGGTGTGAAAGTAAAAAACCCGGCGCTTCCG TTAAGTGAAGCTGCAAAAGCATCCGGATACACCTTCACCTTCTATTACATGCA CTGGGTTCTGTCAGCCCCCGGGCCAGGGTCTGGAA TGGATGGGCATCATTAAAC CCAAGCGGTTGGCCCTACCTCCTACGGCCAGAAATTCACAGGGTCCGGTCAAG</p>	273

	<p> TGACCCCGTGCACACTAGCACCTCTACCGTFFATATATGGAGCTGTCCAGCCCTGGG TTCTGAAGATACCTGCAGTGTACTACTGTFGCACCCGGTGAAGTTCGCTTGGGTTG GACTATTGSSSTCAAGGCACCCCTGTAACGTTTCTTCTGCTAGCACAAAAT GCCCCAGGTTGTTCCCTCTGGCCCTTAGCAGCAGAGGACATCTGGGGGAAAC AGCCGCCCTGGGCTGCTCTGTAAGGACTACTTTCCTCCAGCCTGTGACCGTG TCCCTGGAACTCTGGGGCCCTGACAAAGCGGGGTGCACACCTTTCAGCGCGTGC TGCAGAGCAGCGCCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTCACCCGTGCTTAGCAG CAGCCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAGDGTGAACCACAAAGCCCGAGCAAC ACCAAAGTGGACAAAGAAAGGTGGAGGCCAAGACCTGTGATGGCCGGAGGAGGAT CCGGAGGGBGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCCGGCGGACTGAT GCAGCTTGGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGTCGCCAGCGGCTTCACTTTC AGCACTTACGCCATGAAGTGGGTGCTCCAGGCCCCCTGGCAAAGGCTTGGAAAT GGGTGTCCCGGATCAGAAAGCAAGTACACAACTACGCCACCTACTACGCTGA CAGCTGTAAGGGCCGCTTCACCATCAGCTGCGGACAGCAGCAGCAGAACCTTTC TACCTGCAGATGAACAGCCCTGGCGCCGAGGACACCGCGCTGTACTATTGTG TGCCGACCGGCAACTTCGGCAAGCGCTATGTGTCTGGCTTTCCTACTCTGCTG CCAGGGCACCCCTGCTGACCGCTGTCAAGCGCTAGCTGGGGCCCTCCCTCCGCTG TTTATCTTTCCCCATCCGATGAAACAGCTGAAAGCGGACCCGCTCCGCTGG TGGTCTGCTGACCAATTTTTACCTTAGGGAAAGCTAAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAAGGCACTGCAGTCCGSCAACTCCAGGAAATCTGTGACAGAACAGGAC TCCAAAGGACAGCACCCTACTCCCTGTCTCTCAAGCTGACACTGTCTAAGGCTE ATTATGAGAAACACAAAAGTCTACGCTGCTGCAAGTCAACCATCAGGGCTTGA CTGCGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGCGGAGAGCTGTGACAAAGCCACACAC TGTCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAAGCTGCTGGCGCCCTTCTGTGTCTCTGT TCCCCCAAGCTCCAAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAAGTAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAAGGAGCCCTGAAAGTGAAGTTCAATTTGG TACGTGGAGCGGCTGCAAGTGCACAACCGCCAAAGCAAAAGCTCCCGGGAGGAGC AGTACAACAGCAGCTACCGTGTGCTCAGCGTCTCACCGTCCCTGCACCCAGSA CTGGCTGAATGCAAGGATCAAGTGCAGGCTTCCAAACAAAGCCCTCCGC GCCCCATCGAGAAACCACTCTCCAAAGCCAAAGCCAGCCCGGAGACCCAC AGGTGTACACCTGCCCCCATGCGGGATGAGCTGACCAAGAAACAGGCTGAG CCTGTGCTGCTGGTCAAAAGGCTTCTATCTCCAGGACATCGCCCTGGAGTGG GAGAGCAATGGGACCGGAGAACCACTACAGAACCAAGCCCTCCGCTGCTGG ACTCCGACCCCTCTCTTCTTCTTACAGCAAGCTCAACCTGGACAAAGCTGAG GTGGCAGCAGGGAAAGCTTCTCTATGCTCCGTGAATGCATGAGGCTCTGCTAC AACCACTACACCGAGAAAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA </p>	
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Denominación	Secuencia	SEQ ID NO
VH de variante de 16D5 W96Y/D52E	<p> TGGGTGCAATGGTGGAAAAGTGGAGGCGCCCTCTGGAAGCTTGGGAGGATCTC TGAGCTGAGCTGGGCGCCAGCGGCTTCTGCTTCAGCAACCGCTGGATGAG CTGGGTGGCCAGGCGCCCTGGAAAAGGACTGGGATGGGTGGGACGGATCAAG AGCAAGACCGAGCGCGCCACCAAGGACTATGCCGCTCTGTGAAGGCGGCT TACCCATCAGTGGGACGACAGCAAGAACACCTCTTACTTGCAGATTAACAG CTTGAAAAGCGAGGACACTGCTGCTGCTACTGCTGCTACCCCTAGGATGG TCTGGTACGACTACTGGGCTCAGGGACCTCTCTGGACCGCTGCTGCTGCT </p>	415
W96Y/D52E_C D3-VHCH1_Fc-botón_PGLALA pETR14945	<p> GAGGTGCAATGGTGGAAAAGGCGGCGCCCTCTGGAAGCTTGGGAGGATCTC TGGACTGAGCTGGTGGCGCCAGCGGCTTCTGCTTCAAGCAACCGCTGGATGAG CTGGGTGGCCAGGCGCCCTGGAAAAGGACTGGGATGGGTGGGACGGATCAAG AGCAAGACCGAGCGCGCCACCAAGGACTATGCCGCTCTGTGAAGGCGGCT TACCCATCAGTGGGACGACAGCAAGAACACCTCTTACTTGCAGATTAACAG CTTGAAAAGCGAGGACACTGCTGCTGCTACTGCTGCTACCCCTAGGATGG TCTGGTACGACTACTGGGCTCAGGGACCTCTCTGGACCGCTGCTGCTGCTGCT GCTCAAAAGGCGCCCTGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GGGGGGACTAGCGCCCTGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GGTACAGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGACAAAGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCT </p>	416

	<p>GGCTGTACTTCCCTGAGCAGCGTGGTTCACCGTSCCTACSCAGCAGCC TGGSCA CTTGAGACTTACA TCTGCAACGCTGAACCTCAAGGCCAGCCACACCCAAAGTGGK CAAGAAGGTGGAGSCCAAGAGCTGTGATGGCCGAGSAGGCTCCCGGAGGCGGA GGAATCCGAGSTGCAACTGCTGSAATCTTGGCGGSSACTGGTGCASCTGSSCG GATCTCTGACACTGAGCTGTTCGCGCCAGCCGCTTTCACCTTCAGCCACTTACCC CATGAACTGGGTTGCGCCAGGCCCCCTGGCCAAAGGCTTGGAAATGGGTGTCCCGG ATCAGAAAGCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACTAGCCCGACAGSSTGAAGG GCGGCTTTCACCA TCGCCCGGAGCCAGCAGCAAGAACACCCCTGTACTTGCAGT GAAAGGCTTGGGGGCGGAGGACAGCCCGGTGTACTATTTGTGTCCGGCAGCCG AACTTCCGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCCACCC TCGTCAACCGTGTCAACCCCT AGTACCAAGGCGCCAGGCTGTTCCTCCCTGGCACCCAGGAGCAAGAGCCAT CTGGCCGAACAGGCGCTCTGSSCCCTGTGGTGAAGACTACTTCCCGAGCCG GGTGACCCGTGTCTTGGCACTCTGGCCGCTGAC CAGCGCCCTGCACACTTTT CTAGCCGTCTGCAAGCAGCCGCTTACTTCCCTGTCTCTCCGTTGCTACCCG TGGCTCTTAGCTCCCTGGGACACAGACATATGCTGTATGTGTACATCACA GCTTTCACACCTAAGTCTGATAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGGGACAAA ACTCACACATGGCCACCCTGCCCCAGCACCTGAAGGTCGAGGSSAGCGTACG TCTTCCCTTCCGCCCCAARACCCAGGACACCCCTCPTGAATCTCCCGGACCCG TGAAGTCAATGCTGTGGTGGTGGACTTGAAGCCACGAAAGACCCCTGAGGTTCAAG TTTCAACTGTACTAGTGGACGCGCTGGAGGTTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCG GGGAGGAGCACTACAAAGC AGTACCGCTCTGGTCAGGCTCCTTACCGCTCTCCACCCAGGACTCCCTGAATG GCAAGCGTACAACTGCCAAGCTTCTCCACAAAGCCCTCCGCGCCCTCATGCA GAAAGCCATCTCCAAAGCCAAAGGCGCGCCCCGAGAACCTACAGGTTGTACCCG CTGCCCCCATGGCGGATGAGGCTGACCAAGAACAGGCTCAGCCCTGTGGTCCG TGGTCAAGSCTTCTATCCAGCGACATCGCCCTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAAGCCGAGSAAACACTACAAAGACCCCTCCCTGTCTGGACTCCGACSSC TCTTCTTCTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCCAGGTTGGCAGCCAG GGAAGCTTCTTCTCATCTCTGCTGATGACATGAGGCTCTCCACACCCACTACAC GCGAAGAGGCTTCTCCCTGTCTGGGCTAAA</p>	
<p>W96Y/D52E_Fc - ojal_PGLALA_H VRF pETR14946</p>	<p>GAGTTCAAATGGTTGGAAAGCGSAGCCGCGCTGCTGAAAGGCTGCGGGA TCTC TGAGACTGAGCTGTGCGCCGAGCCSCTTCACCTTCAGCAAGCCCTGSA PGRG CTGGCTGCCCAAGCTCCCTGGAAAGGACTCCAGTGGSTGGGACCGCATGAAAG AGCAAGACCCGAGGCGCCACCCACTGACTGNTGCCGCGCTGTGAAAGCGCCGCT TCAACCCTCAGCAGSAGGCGGACAGCAAGAACCCCTTACTCTGCAGATGAAAGS CCTGAAAAGCCAGSACACCCGCTTACTACTSCACCCACCCCTTACAGATGG TCTGGTACGACTACTGGGGCCAGGCCACCCCTGGTGAAGCTGTGCTATCTCTTA GCACCAAGGGGCCCCCTCCGTCTTCCGCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGSACCCAG CGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCTGCTGACAGGACTACTTCCCGAGCCG GTGACGCTGTCTTGGACAGCCGAGCCCTGACCTGGGGCTGGCACACCTTCC CGCCCTGCTGACAGCTTCT GGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTSTCACCGTSCCTTCTAGCAGCCCTGGGCA DCGAGCCTTACA TCTGCAACGCTGAACCTCAAGGCCAGCCACACCCAAAGTGGK CAAGAAGGTGGAGSCCAAGAGCTTCCACAAAACTCACACATGCCCCCGCTCC CCAGCACTTGAAGTTCAGSAGGAGGCTGTCASTTTCTCTTCCGCCCCAAAGC CCAGSAGACCCCTGTGTGATCTCCCGGACCCCTGAGGTFACATGCTTGGTGTGT GGAGCTGTGCGCACGAAGACCTTGAAGTTCAAATTCACCTGGTGTAGCTGGAGCCG GTGGAGTTCATAAATGCCAAGTCAAAAGCCCGGAGAGSAGTACAAAGCA DGTACCGTGTGGTTCAGGCTCTTCAAGCTTCTGCAAGSAGACTGGCTGARTGG CAAGGATGACAAAGTTCAGGCTCTTCAAGCAAAAGCCCTGAGGCTGCGGCTGAA AAAGCCATCTCCAAAGCCAAAGGCGGAGCCCGGAGAGTACADGTCTGTACCC TGGCCCATCTCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCCAGCTTGGGCTTGTGGTCCCGAGTCRAAGGCTTCTATCCCK GCBGATGCTCCGTTGGTGGAGTGGAGAGSAAATGGGCGAGCTGGAGAGCACTTCAAA BACCAAGCCCTCCGCTGCTGGACTCCGACCCCTCTTCTTCTCTCTAGCAG CTCACCTGGACAGAGCCAGCTGGCAGCCGCGGAAAGCTTCTTCTCATGCTCCG TGAATGATGAGGCTTCTCCACACCCCTTCCAGCCAGAAAGGCTCTCTCTCTC TCCGGTAAA</p>	<p>417</p>
<p>14B1 VH</p>	<p>GAGGTGCAAATTTTGGAGTCTGGGAGGCTTGGTTCAGGCTTGGGCTTCC TGAGACTCTCTTGTGACAGCCTCCCGATTCACCTTTAGCAGTTASGCCATGAG CTGGGTCGCGCTAGGCTCCAGGGAGGGGCTGAGTGGGTTCTAGCTATTTGGT GGTGTGCTGCTGGCACATACTACCCAGACTCCGTAAGGCGGCTTCCACCA TCTCCAGASACAAFTTCAAGSAAACCCCTGTATCTGCAATGAAACAGCCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTATATTTACTGTGCGGCTGGTGGACTACCGTTCAGCT TACTTCCACTACTTGGGGCCAAAGGAAAGCCCTGTCTACCTGTCTCTGAGT</p>	<p>418</p>

<p>14B1 VL</p>	<p>TUFTTDEAACTGACTCAAGATCCAGCTGTTAGCGTGGCTCTGGSTCAGACTG TACSTATCACTTGGCAAGGGGATTTCTTGGCTCCTACTAGCGAAGCTGGTA CCAGCGAAGAACCGGGTCAGGGCCCACTTCTGGTGTATTTACGGCAAAAACAC CDFCCGCTCTGGGATCCCGGACCGTTTCTCCGGCAGCTCTTCCGGTAAACACGG CGAGCCCTACCCATCACTGGCGCTCAASCAGAAAGGCGAGGGCTGACTATTACTG TAACTCTGGGAAAGCTCCACCAACCGGCTGGTTGTCTTCGGTGGCGGTACT AAGCTGACCGTCCTA</p>	<p>419</p>
<p>14B1[EE]_CD3[VLCH1]_Fc- botón_PGLALA pETR14976</p>	<p>GAGGTGCAATTTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCTTGGGGGTTCC TGGACTCTCTCTGGGAGCTTCCGGATTCACCTTTAGCACTTA TCCATGAG CTGGCTCCGCCAGGCTCCAGCGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTGACTATTAGT GGTAGTGGTGGTAGCACATACTACSCAGACTTCCGTGAAGGGCCGGTTTACCA TCTCCAGAGACAATTTCCAAAGAACAGCTGTATATCTGGCAGATGAACAGGCTGAG ASGCCGAGACAGGGCCGTATATTACTGTGTCCGCTGGTGGACTACCGTTACCGT TACTTCCAGCTACTGGGGCCAAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCCAGTGGCTAGCA CCAGGGGCCCCCTCCGCTTTCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTTCAGCTCTGG CAGAACTCCCGCTCTGGGCTGCTGGTGGAAAGATTACTTCCCGAGCCCGGTG ACGTGTCTCCGAAATCTGGGCTCTGACCTTCCGGGTCACACACTTTCAG CTGTGCTCCAGTCTCTCCGGCTGTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CTCCAGCTCTCTGGGCACTCCAGACTTACATCTCCAAAGTGAACACAAAGCC TCCACACCAAGGTTGACAGAGAGGTTGAAACCCAAAGTCTTCCAGCGGTGGCG GAGTCTCCGGAGGGGGGATCCAGGCTGTCTGTGACCCAGGAACCTCCCT GACATGTCTCTCTGGGCACTCCAGACTTACATCTCCAAAGTGAACACAAAGCC CTCTGACCCACTCCACTAGGCTCAATGGGTTSCAGGAAAAGCCCGGCCAGG CCTCCAGAGGACTGATCCGGCCCAACAACAAGAGGCTCTGGCACCCCTGC CAGATTTCTCCGGTCTCTCTCTGGGCGCAAGGCTTCCCTGACTCTGTCTGT GCTCAGGCTGAGGAGGAGGGGAGTACTACTTGGGCTCTGTGTACTCCAAAC TGGGCTGTCTGGGCGAGGCAACCAAGCTGACCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCT CAAGGACCCAGTGTCTTCCCGCTGGGCCCCAGCTCCAAAGTCTACATCCGGT GGCACAGCTTCCCTGGGATGTCTCTGTGAAGGACTACTTCTCTGAGCTGTGA CAGTGTCTTGAACAGGGGAGCCCTGACCAAGGGAGTGCACACATCCCTGC AGTGTCTCCAGAGCAGCGCTTGTATAGCTTGAACAGGCTGTCTGTCTGTCTGT TCTCTAGCTTGGGAAACACAGCA?ATATCTGTAAATGTAATCAAGCCCA GTAAATACCAAGTGGATGAAAGTGAACCTAAGAGCTGCGA TAAAGCCCA CACTGTCTCCCGCTTCCCTGTCTGTGAAGTGGCTGGTGGGCTTAAAGTGTCT CTGTTCGCCCAAGGCCAAGGACAGCTGTATGATCTCCCGGACCCCGGAAG TGACTCCGGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCTGAAAGTGAAGTTCAA TTGGTACTTGGACCGCTGGAGTGCACAAAGCCAAACCAAGCTTAGAGAG GAAAGTACAACTCCACTTCCCGCTGGTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGT AAGACTTCCCTGAAAGGCAAGGTACAAAGTCCAAAGTGTCTGTCTGTCTGTCT GGGCTCTCCCTGAAAGAGACCTTCTCCAAAGGCTAAGGGTCCAGCCCGGGAA CCCCAGGTGTACACCTTGGCCCCATGCTGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAG TCAAGCTGTGTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGT GTGGAGAGCAATGGGCAAGCGGAGAACAACTTCAAGAGCCAGGCTTCCCTGT CTGGACTCTCCAGGCTTCTTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT GCAAGTGGGAGCAGGGGAAAGCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT GCACAACTACTACAGCAGAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT</p>	<p>420</p>

	<p> AACACCCAGGTTGGGCGAGGAGGTTGGGACCCAGGTCCTGCGACGGTGGGGGAG GTTCCGGGAGGGGAGGATGCCAGGCTGTGGTGGAGCCAGGAGCCCTCCCTGAC AGTC TCTCCCTGGGGGCAAGGTTGACCTGACCTGTGGA TCTTCTACCGCCGCT GTGACCCGCTCCACACTAGCCCAAT TGGGCGCGGGAAAGSCTGGCCAGGGCT TCGAGGACTGATCGGCGGACCAACAGAGGAGGCTCC TGGACCCCTTGCAG ATTC TCCGGTTCCTGCTGGGGCGGGAAGGCTGGCCCTGACTCTGTGTGGTCT CAGCCTGAGGAGCGAGGCGGAGTACTGCGCCCTGTGGGTACTCCAAAGCTGT GGGTCTTCCGGCGAGGACACCAAGCTGACCCCTGCTGTCCAGGCTTCCACCAA CCGACCCAGTCTCTTCCGCTGCTGCCAGCTCCCAAGCTTACATCCGCTGGC ACAGCTGGCCCTGGGAAGCTTCCGTCAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACAG TGCTTTGGAGACAGCGAGCCCTGACCCAGCGAGTGCACACATTCCTGTCAGT GCTGCAGAGCAGCGGCTGTATAGCTGAGCGAGCCTCTGTGACCGTCCCTTCC TTAGCCCTGGGAADACAGACATATATCTGTAACTGTGAATCAAGAGCCAGTA ATACCAAGCTCCATAGCAAGGTCACACCTCAAGACCTCCCATAGACCCACAC CTGTCCCCCTGGCTTGGCTGCAAGCTGCTGGTGGGCTTAGCCTGTCTCTG TTCTCCCCAAGGCCAAGGACAGCTGACGATCTCTCCGGACCCCGAAGTGA CCTGCTGGTGGTGGATGTGTCTCCAGCGAGCCCTGAGCTGAGAGTTCAATTC GTACCTGGACGGGCTGGAGGTGCAAAAGCCAAAGCCAGCCATAGAGAGGAA CAGTACAACTCCAGCTACCCGCTGCTCTCCCTGCTGACACTGCTCCACCCAGC ACDGGCTGAAGCGCAAGAGTACAGATGCAAGGTTGTCAGCAAGGCGCTGGG GCTTCCCATUGAAGAGGACCATCTCCAGAGCCAAAGSCTCCAGCTCCGAGACCC CAGGTGTACACCTGGCCCTATCCCGGATGAGCTGACCAAGCAGCAGGTCG AACTGATGCTGCTTGGTCAAGAGCTTCTGACCCAGGAGTGGAGCTGAGAGT GGGAGGCAATGGGCGAGCGGGAGAACACTTCAAGAGCCAGCCTTCCGCTGG GACTCCAGCGGCTCTCTTCTTCTTACAGCAGCCTGAGCGTGGAGAGAGG GGTGGCAGCAGGGGAGCGTCTTCTCA TGTCTCCGTEAGCTGAGGCTCTGCA CAGCCACTACAGCAGAGAGGCTTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA </p>	
<p>9C7[EE]_Fc- oja_PGLALA pETR14975</p>	<p> CAGGTCGAAATTCCTTCAATCTGCTGCTGCAATGAAAAAAGCCGCGCTTGG TTAAGACTCAGCTCCAAAGCA TCCGCTATAGACCTTCACTTCTATTACTTCCA CTGGGTTCTCTCAAGCCCGGGCCAGGGTCTGGAAATGGATGGGCTATCATTAAC CCAAGCGGCTGGCTCTACTCTCTACCGCGAGAAATTCAGGGTCTGGCTCAGGA TGAACCTGTGACACTAGCAGCTCTCAAGCTTATATATGGAGCTGTCCAGGCTGG TTCTGAGGATACTGCACTGTACTACTGTGCAAGCGGTGACTGGTCTTACTAC ATGGACTATTTGGGCTCAAGGACCCCTGCTAAGGCTTCTCTCTGCTGAGCACC AGGGCTCTTGGGCTTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG CAGCGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG GTGTCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG TGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG TAGCAGCTTGGGCAAGGCTTACTCTGCAAGCTGCAAGCAGGCGGAGG AAGCCAGGCTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG CATGCTCAGGCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCT CTTCCTCCCAAAACCTAAGGAGCAGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG ACTGCTGCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG GGTACTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG GCTGACTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG GCTGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG GCTGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG GCTGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG GCTGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCTGG AGRACACTACAGCAGAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT </p>	<p>426</p>
<p>9C7 LC [RK] pETR14980</p>	<p> GATATTGTTATGACTCAATCTCCAGCTGTCTGCGCCGTGACTCCAGGGGAGC CCGCGAGCATTTCTTGGCTTCCAGGCTGCTCTCTCTGCACTCCAAAGGCTTA CACTATCTCGATGCTGACTCCAAAGGCTGCTGCTGCTGCACTCCAAAGGCTTA ATCTACTTGGCTCTTAAAGGCTTCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT CTGGATCCGGCAGCGATTTCAAGCTTGAAGAAATCAAGGCTGTGAAAGCAGAGG CTGGGCTGTTATGACTGTATGCAAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT </p>	<p>427</p>

	<p>SSCACCBEGTCSAAATTEAACTEACSTGEGTGCACCACTCNGTCTTCATCT TCCGGCCATCTGATCGGAGTTGAARCTGGACTGCTCTGTTGTGTGCCF GCTGAATAACTTETATCCAGAGAGGCCCAAGTACAGCTEGAGGCTGGATAAC GCGCTCCAAATCGSSAACTCCACAGGAGTGTFCACAGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCTTCAGCAELACCTEACGCTEAGCAAGCAGACTAGCA GAACACAAAAGTCTACGGCTGCGAAGTACCCATCCAGGCGTGGAGCTGGCC GTCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>	
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Secuencias de antagonistas anti-PD1 ejemplares

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
anticuerpo anti-PDL1	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRFLCKKASGITFFNSQMHVVRQAPGKGLE WVAVITWYDQSKRYRYSVGRFTTISRDNKNTLFLQMNLSLRAEDTA VYYCATNDYWGQGTFLVTVSSASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTY FSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKRVESKYGPPCPFCFAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISSRTPEVTCVVVDVSDGEDEPEVQFQWYVDGVE VHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP QSISERTLSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDESRWQEGN VFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	274
anticuerpo anti-PDL1	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRKASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRAFGIIPARFQCGSGSETDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQSS NWRPTFOQCTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKNVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSLSSTLTLSKA DYENKVKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	275
anticuerpo anti-PDL1	<p>QVQLVDSGVEVKKKPGASVKVSCKRASGYTFITNYMYWVRFQAPGQGLE WNGEINPQNGGTNFMNKPKNRVTLTFTDSCTTAYMELKSLQFDTA VYYCAERDYRFDMGFQDYWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVFSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKRVESKYGPPCPFCFAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISSRTPEVTCVVVDVSDGEDEPEVQFQWYVDGVE VHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP QSISERTLSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDESRWQEGN VFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	276
anticuerpo anti-PDL1	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQ APRILLIYLASYLESQVFPARFSCSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC QHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNHFYPREAKVQWKNVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSLSSTLT LSKADYENKVKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	277
pesada	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLE WVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTA VYYCARRHKPGCFDYWGQGTFLVTVSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVFSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKRVESKYGPPCPFCFAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISSRTPEVTCVVVDVSDGEDEPEVQFQWYVDGVE VHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP QSISERTLSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDESRWQEGN VFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	278

ligera	DIQMTQSPSSLEASVGERVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRPFSSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQCTKVEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLRN FYDRAKVKQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKOSTYLSLSTLTLSKA DYENHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	279
VH de anticuerpo anti-PDL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTEKNTAYLQMNISLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSS	280
VH de anticuerpo anti-PDL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTEKNTAYLQMNISLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSSASTK	281
VL de anticuerpo anti-PDL1	DIQMTQSPSSLEASVGERVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRPFSSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQCTKVEIKR	282
HVR-H1	GFTFSXISKIH	283
HVR-H2	AWIX2PYGGGXYYADSVKQ	284
HVR-H3	RHWPGGFDY	285
HVR-L1	RASQX4X5X6TX7X8A	286
HVR-L2	SASX9LX10E	287
HVR-L3	QQX11X12X13X14PX15T	288
HVR-H1	GFTFSDSWIH	289
HVR-H2	AWISPYGGSTYYADSVKQ	290
HVR-H3	RHWPGGFDY	291
HVR-L1	RASQDVCTAVA	292
HVR-L2	SASPLYE	293
HVR-L3	QQYLYNFAT	294
HC-FR1 de anticuerpo anti-PDL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	295
HC-FR2 de anticuerpo anti-PDL1	HC-FR2 es WVRQAPGKGLEWV	296
HC-FR3 de anticuerpo anti-PDL1	RFTISADTEKNTAYLQMNISLRAEDTAVYYCAR	297
HC-FR4 de anticuerpo anti-PDL1	WGQGTLLVTVSA	298
HC-FR4 de anticuerpo anti-PDL1	WGQGTLLVTVSS	299
LC-FR1	DIQMTQSPSSLEASVGERVTITC	300
LC-FR2	WYQQKPKGKAPKLLIY	301
LC-FR3	QVPERFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	302
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	303
VH de anticuerpo anti-PDL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTEKNTAYLQMNISLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSA	382
VL de anticuerpo anti-PDL1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTEKNTAYLQMNISLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSA	383

Secuencias de anticuerpos anti-TIM3 ejemplares

Las secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-TIM3 ejemplares y las secuencias de TIM3 ejemplares se exponen

ES 2 984 937 T3

en el listado de secuencias a continuación como sigue:

SEQ ID NO: 304	HVR-H1 de la cadena pesada, Tim3_0016
SEQ ID NO: 305	HVR-H2 de la cadena pesada, Tim3_0016
SEQ ID NO: 306	HVR-H3 de la cadena pesada, Tim3_0016
SEQ ID NO: 307	HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0016
SEQ ID NO: 308	HVR-L2 de la cadena ligera, Tim3_0016
SEQ ID NO: 309	HVR-L3 de la cadena ligera, Tim3_0016
SEQ ID NO: 310	dominio variable de la cadena pesada VH, Tim3_0016
SEQ ID NO: 311	dominio variable de la cadena ligera VL, Tim3_0016
SEQ ID NO: 312	dominio variable de la cadena pesada VH, variante de Tim3_0016 (0018)
SEQ ID NO: 313	dominio variable de la cadena ligera VL, variante de Tim3_0016 (0018)
SEQ ID NO: 314	HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0016_HVR-L1 variante 1_NQ (eliminación del sitio de glucosilación por mutación de N a Q)
SEQ ID NO: 315	HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0016_HVR-L1 variante 2_NS (eliminación del sitio de glucosilación por mutación de N a S)
SEQ ID NO: 316	HVR-H1 de la cadena pesada, Tim3_0021
SEQ ID NO: 317	HVR-H2 de la cadena pesada, Tim3_0021
SEQ ID NO: 318	HVR-H3 de la cadena pesada, Tim3_0021
SEQ ID NO: 319	HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0021
SEQ ID NO: 320	HVR-L2 de la cadena ligera, Tim3_0021
SEQ ID NO: 321	HVR-L3 de la cadena ligera, Tim3_0021
SEQ ID NO: 322	dominio variable de la cadena pesada VH, Tim3_0021
SEQ ID NO: 323	dominio variable de la cadena ligera VL, Tim3_0021
SEQ ID NO: 324	HVR-H1 de la cadena pesada, Tim3_0022
SEQ ID NO: 325	HVR-H2 de la cadena pesada, Tim3_0022
SEQ ID NO: 326	HVR-H3 de la cadena pesada, Tim3_0022
SEQ ID NO: 327	HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0022
SEQ ID NO: 328	HVR-L2 de la cadena ligera, Tim3_0022
SEQ ID NO: 329	HVR-L3 de la cadena ligera, Tim3_0022
SEQ ID NO: 330	dominio variable de la cadena pesada VH, Tim3_0022
SEQ ID NO: 331	dominio variable de la cadena ligera VL, Tim3_0022
SEQ ID NO: 332	HVR-H1 de la cadena pesada, Tim3_0026
SEQ ID NO: 333	HVR-H2 de la cadena pesada, Tim3_0026
SEQ ID NO: 334	HVR-H3 de la cadena pesada, Tim3_0026
SEQ ID NO: 335	HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0026
SEQ ID NO: 336	HVR-L2 de la cadena ligera, Tim3_0026
SEQ ID NO: 337	HVR-L3 de la cadena ligera, Tim3_0026
SEQ ID NO: 338	dominio variable de la cadena pesada VH, Tim3_0026
SEQ ID NO: 339	dominio variable de la cadena ligera VL, Tim3_0026
SEQ ID NO: 340	HVR-H1 de la cadena pesada, Tim3_0028
SEQ ID NO: 341	HVR-H2 de la cadena pesada, Tim3_0028
SEQ ID NO: 342	HVR-H3 de la cadena pesada, Tim3_0028
SEQ ID NO: 343	HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0028
SEQ ID NO: 344	HVR-L2 de la cadena ligera, Tim3_0028
SEQ ID NO: 345	HVR-L3 de la cadena ligera, Tim3_0028
SEQ ID NO: 346	dominio variable de la cadena pesada VH, Tim3_0028
SEQ ID NO: 347	dominio variable de la cadena ligera VL, Tim3_0028
SEQ ID NO: 348	HVR-H1 de la cadena pesada, Tim3_0030
SEQ ID NO: 349	HVR-H2 de la cadena pesada, Tim3_0030
SEQ ID NO: 350	HVR-H3 de la cadena pesada, Tim3_0030
SEQ ID NO: 351	HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0030
SEQ ID NO: 352	HVR-L2 de la cadena ligera, Tim3_0030
SEQ ID NO: 353	HVR-L3 de la cadena ligera, Tim3_0030
SEQ ID NO: 354	dominio variable de la cadena pesada VH, Tim3_0030
SEQ ID NO: 355	dominio variable de la cadena ligera VL, Tim3_0030
SEQ ID NO: 356	HVR-H1 de la cadena pesada, Tim3_0033

ES 2 984 937 T3

SEQ ID NO: 357 HVR-H2 de la cadena pesada, Tim3_0033
SEQ ID NO: 358 HVR-H3 de la cadena pesada, Tim3_0033
SEQ ID NO: 359 HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0033
SEQ ID NO: 360 HVR-L2 de la cadena ligera, Tim3_0033
SEQ ID NO: 361 HVR-L3 de la cadena ligera, Tim3_0033
SEQ ID NO: 362 dominio variable de la cadena pesada VH, Tim3_0033
SEQ ID NO: 363 dominio variable de la cadena ligera VL, Tim3_0033
SEQ ID NO: 364 HVR-H1 de la cadena pesada, Tim3_0038
SEQ ID NO: 365 HVR-H2 de la cadena pesada, Tim3_0038
SEQ ID NO: 366 HVR-H3 de la cadena pesada, Tim3_0038
SEQ ID NO: 367 HVR-L1 de la cadena ligera, Tim3_0038
SEQ ID NO: 368 HVR-L2 de la cadena ligera, Tim3_0038
SEQ ID NO: 369 HVR-L3 de la cadena ligera, Tim3_0038
SEQ ID NO: 370 dominio variable de la cadena pesada VH, Tim3_0038
SEQ ID NO: 371 dominio variable de la cadena ligera VL, Tim3_0038
SEQ ID NO: 372 una variante 1 de exotoxina A de *Pseudomonas* ejemplar (ejemplo de PE24 desinmunizada)
SEQ ID NO: 373 una variante 2 de exotoxina A de *Pseudomonas* ejemplar (ejemplo de PE24 desinmunizada)
SEQ ID NO: 374 región constante de la cadena ligera kappa humana
SEQ ID NO: 375 región constante de la cadena ligera lambda humana
SEQ ID NO: 376 región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG1
SEQ ID NO: 377 región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG1 con mutaciones L234A y L235A
SEQ ID NO: 378 región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG1 con mutaciones L234A, L235A y P329G
SEQ ID NO: 379 región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG4
SEQ ID NO: 380 secuencias de TIM3 humanas ejemplares
SEQ ID NO: 381 dominio extracelular (ECD) de TIM3 humana

<210> 304
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 304

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met
1 5

<210> 305
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 305

Leu Asn Asp
1

<210> 306
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 306

Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp
1 8

<210> 307
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 307

Ser Ser Ser Val Asn Tyr
1 5

<210> 308
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 308

Asp Ala Phe
1

<210> 309
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 309

Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 310
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 310

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Arg Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 311

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 311

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Thr
20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asn Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asn Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 312

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 312

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
 50 55 60

Leu Lys Arg Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Val Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ile Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 313

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 313

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Thr
 20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
100 105

<210> 314
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 314

Ser Ser Ser Val Gln Tyr
1 5

<210> 315
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 315

Ser Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 316
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 316

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 317
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 317

Ser Asp Ser
1

<210> 318
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 318

Gly Tyr Tyr Ala Trp Tyr Tyr Phe Asp
1 5

<210> 319
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 319

Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
1 5

<210> 320
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 320

Tyr Ala Ser
1

<210> 321
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 321

Ser Asn Ser Trp Pro Leu
1 5

<210> 322
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 322

Ser Val Gln Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Leu Leu His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Ala Trp Tyr Tyr Phe Asp Cys Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 323

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 323

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Phe Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 324
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 324

Gly Asp Ser Ile Ala
1 5

<210> 325
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 325

Tyr Ser Gly
1

<210> 326
<211> 4

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 326

Asp Tyr Phe Asp
1

<210> 327
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 327

Arg Gln Asp Val Arg Lys Asn
1 5

<210> 328
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 328

Tyr Thr Ser
1

<210> 329
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 329

Tyr Asp Asn Leu Pro Phe
1 5

<210> 330
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 330

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 35 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Ala Ser Ala
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Thr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 331

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 331

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Leu Gly
1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Arg Gln Asp Val Arg Lys Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Trp Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Asn Ile Asn Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105

<210> 332
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 332

Gly Tyr Thr Phe Thr
1 5

<210> 333
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 333

Glu Thr Tyr
1

<210> 334
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 334

Gly Tyr Pro Ala
1

<210> 335
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 335

Ser Arg Thr Ile Leu His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 336
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 336

Lys Val Ser
1

<210> 337
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 337

Asp Ser His Val Pro Phe
1 5

<210> 338
<211> 115
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 338

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Thr Phe Gly Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Phe Phe Cys
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Tyr Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Val Val Ile
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 339

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 339

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Thr Ile Leu His Ser
 20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 340
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 340

Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
1 5

<210> 341
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 341

Ala Asp Asp
1

<210> 342
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 342

Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala
1 5

<210> 343

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 343

Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
1 5

<210> 344

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 344

Tyr Ala Ser
1

<210> 345

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 345

His Tyr Ser Ser Pro Tyr
1 5

<210> 346

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 346

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Asp Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Phe Ser Ala
115

<210> 347

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 347

Asn Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 348
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 348

Gly Tyr Pro Phe Ser Glu Tyr
1 5

<210> 349
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 349

Glu Thr Gly
1

<210> 350

<211> 4
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 350

Gly Tyr Pro Ala
1

<210> 351
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 351

Ser Arg Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 352
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 352

Lys Val Ser
1

<210> 353
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 353

Asp Ser His Val Pro
1 5

<210> 354
<211> 115
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 354

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Ser Glu Tyr
20 25 30

Ser Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Val Tyr Val Asn Thr Glu Thr Gly Gln Pro Ile Val Gly Asp Asp Phe
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Val Leu Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Tyr Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 355

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 355

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 356
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 356

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
1 5

<210> 357
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 357

Ala Thr Gly
1

<210> 358
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 358

Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Met Asp

1 5

<210> 359

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 359

Ser Glu Asn Ile Phe Ser Asn

1 5

<210> 360

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 360

Ser Ala Thr

1

<210> 361

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 361

Phe Tyr Lys Ile Pro Phe

1 5

<210> 362

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 362

Gln Gly Gln Met His Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Ile Ser Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Trp Ile Tyr Ala Ala Thr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Thr Asn Lys Ala Gln Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ala Gly Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 363

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 363

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Asn Leu Gly Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Lys Ile Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 364
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 364

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
1 5

<210> 365
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 365

Glu Asp Gly
1

<210> 366
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 366

His Gly Tyr Val Gly Trp Phe Ala

1 5

<210> 367

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 367

Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr

1 5

<210> 368

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 368

Gly Ala Ser

1

<210> 369

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 369

Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp

1 5

<210> 370

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 370

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Leu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ile Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Ile Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Asp His Gly Tyr Val Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 371

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 371

Asn Val Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ile Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Phe Arg
100 105

<210> 372

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una variante 1 de exotoxina A de *Pseudomonas* ejemplar (ejemplo de PE24 desinmunizada)

<400> 372

Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser
1 5 10 15

Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His
20 25 30

Ala Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr
35 40 45

Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Ala Ala Arg
50 55 60

Ser Gln Asp Leu Ala Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp
65 70 75 80

Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala
85 90 95

Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Ala Ser
100 105 110

Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu
115 120 125

Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Ala
130 135 140

Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr
145 150 155 160

Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
165 170 175

Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser
180 185 190

Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser
195 200 205

Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
210 215

<210> 373

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> una variante 2 de exotoxina A de *Pseudomonas* ejemplar (ejemplo de PE24 desinmunizada)

<400> 373

Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser
1 5 10 15

Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His
20 25 30

Ala Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr
35 40 45

Ala Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg
50 55 60

Ser Gln Asp Leu Arg Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp
65 70 75 80

Pro Ala His Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg
85 90 95

Gly Arg Ile Ala Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Ala Ser
100 105 110

Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu
115 120 125

Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg
130 135 140

Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Gly Gly Arg Glu Glu Thr
145 150 155 160

Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
165 170 175

Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser
180 185 190

Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser
195 200 205

Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
210 215

<210> 374

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 374

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 375

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 375

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 376

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 376

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Glu Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

<210> 377

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 377

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 378

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 378

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

..... 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 379

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 379

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325
 <210> 380
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 380
 Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1 5 10 15
 Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30
 Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45
 Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60
 Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65 70 75 80
 Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Gly Leu
180 185 190

Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe Lys Trp Tyr Ser His
195 200 205

Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile Ser Leu Ala Asn Leu
210 215 220

Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu Gly Ile Arg Ser Glu
225 230 235 240

Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Gln Asn Val Tyr Glu Val Glu Glu Pro
245 250 255

Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln Gln Pro Ser Gln Pro
260 265 270

Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
275 280

<210> 381

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 381

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65 70 75 80

Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Glu Ile Pro Gly Ile
85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly
180

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se usa en combinación con un antagonista de la unión al eje de PD-1, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende al menos dos restos de unión a antígeno, de los que uno es una molécula Fab de entrecruzamiento y de los que uno es una molécula Fab convencional, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en la que la primera molécula de unión a antígeno comprende un primer resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3 que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, en la que el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, en la que el antagonista de la unión al eje de PD-1 inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión ligandos, en la que el antagonista de la unión al eje de PD-1 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-PD-L2.
2. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera molécula de unión a antígeno comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.
3. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal.
4. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂.
5. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
6. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO: 289, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO: 290 y la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO: 291; y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO: 292, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO: 293 y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO: 294.
7. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 280 o SEQ ID NO: 281 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 383.
8. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además administrar al individuo un antagonista de la molécula 3 que contiene el dominio de mucina e inmunoglobulina de linfocitos T (TIM3), en la que el antagonista de TIM3 es un anticuerpo anti-TIM3.
9. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el anticuerpo anti-TIM3 es un anticuerpo monoclonal.
10. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en la que el anticuerpo anti-TIM3 es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
11. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 8-10, en la que el anticuerpo anti-TIM3 es un fragmento de anticuerpo que se une a TIM3.
12. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 8-11, en la que el anticuerpo anti-TIM3 es un fragmento Fab.
13. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con una

cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio.

- 5 14. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que al menos uno de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y el antagonista de la unión al eje de PD-1 se administra por vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía tópica, vía oral, vía transdérmica, vía intraperitoneal, vía intraorbitaria, por implantación, por inhalación, vía intratecal, vía intraventricular o vía intranasal.
- 10 15. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que los linfocitos T en el individuo tienen una activación, proliferación y/o función efectora potenciadas con respecto a antes de la administración de la combinación.

Fig. 1A

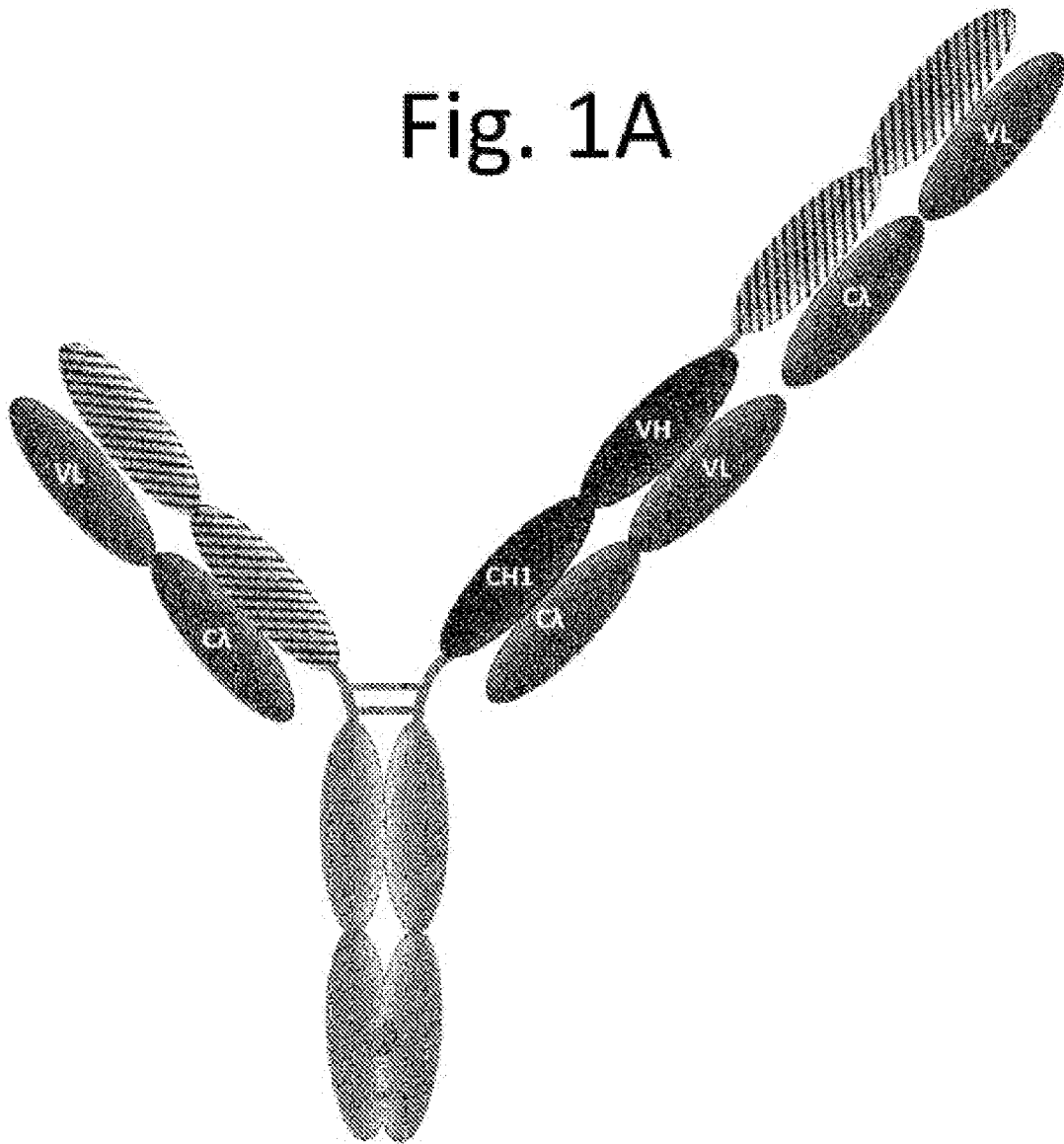


Fig. 1B

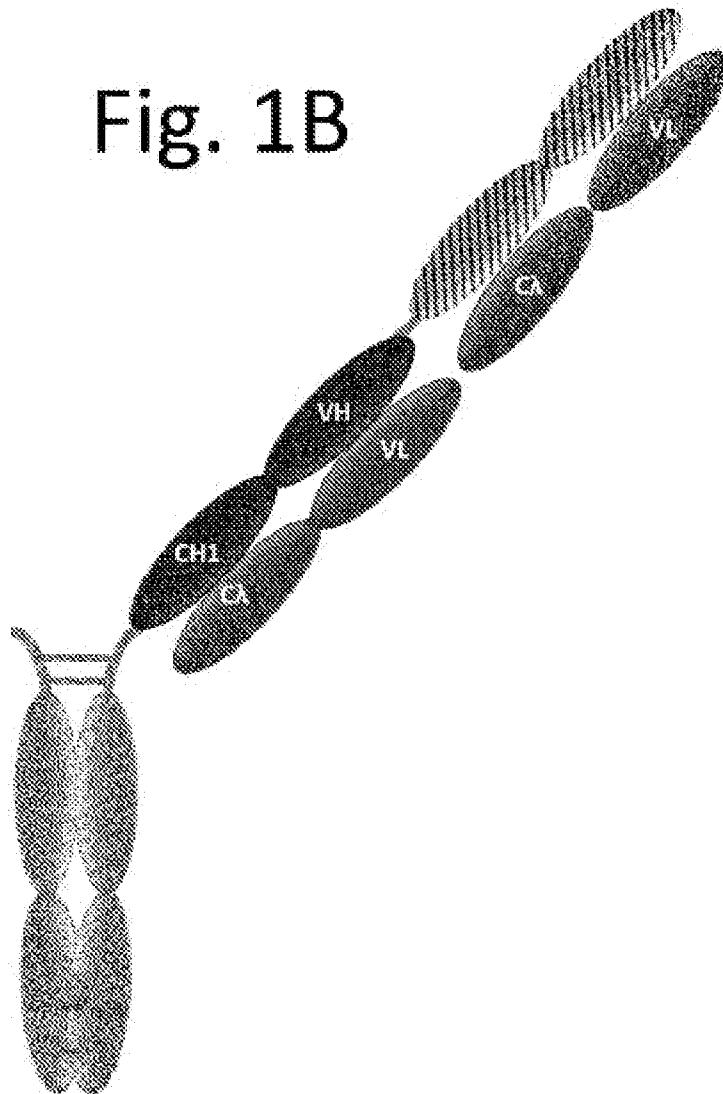


Fig. 1C

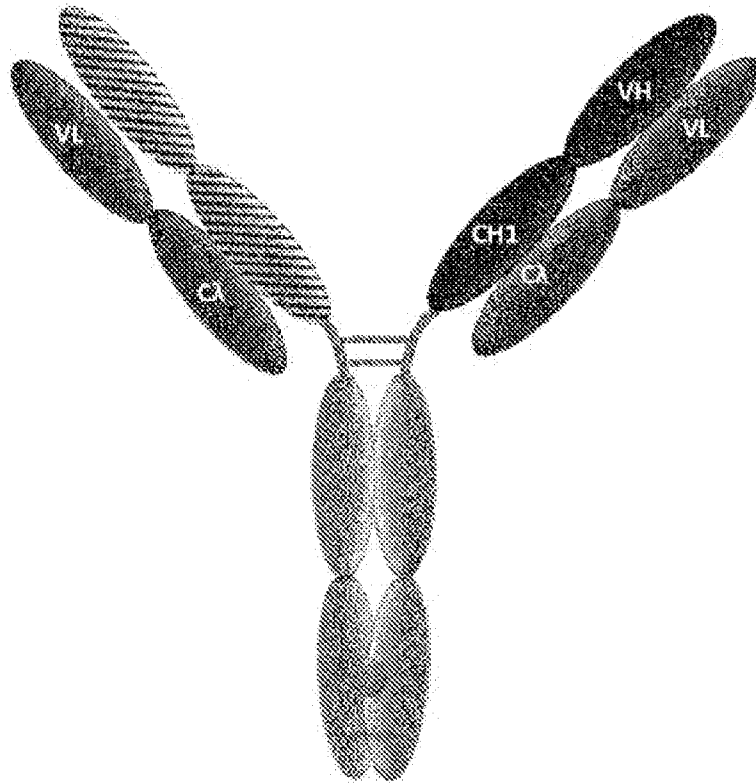


Fig. 1D

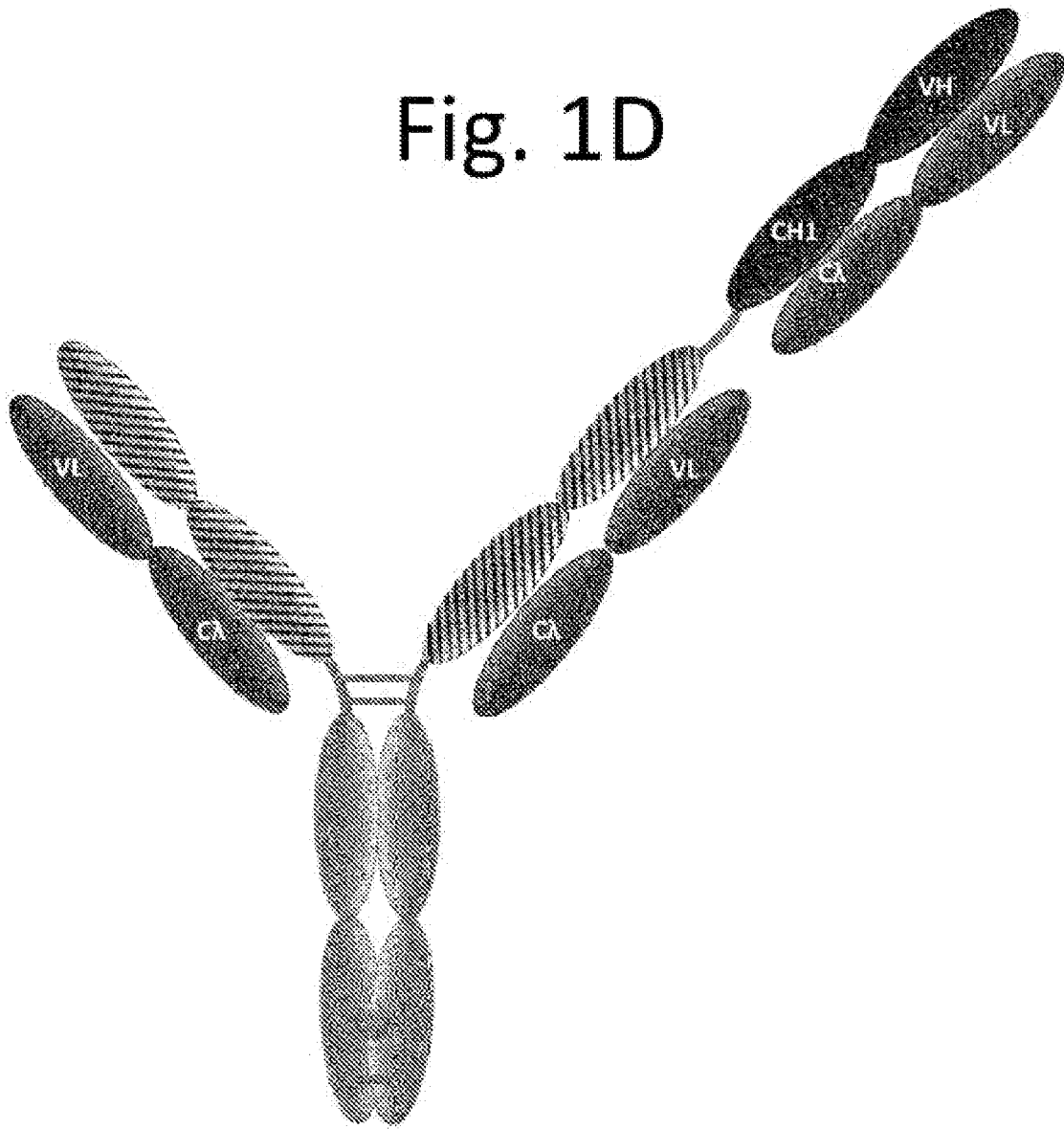


Fig. 1E

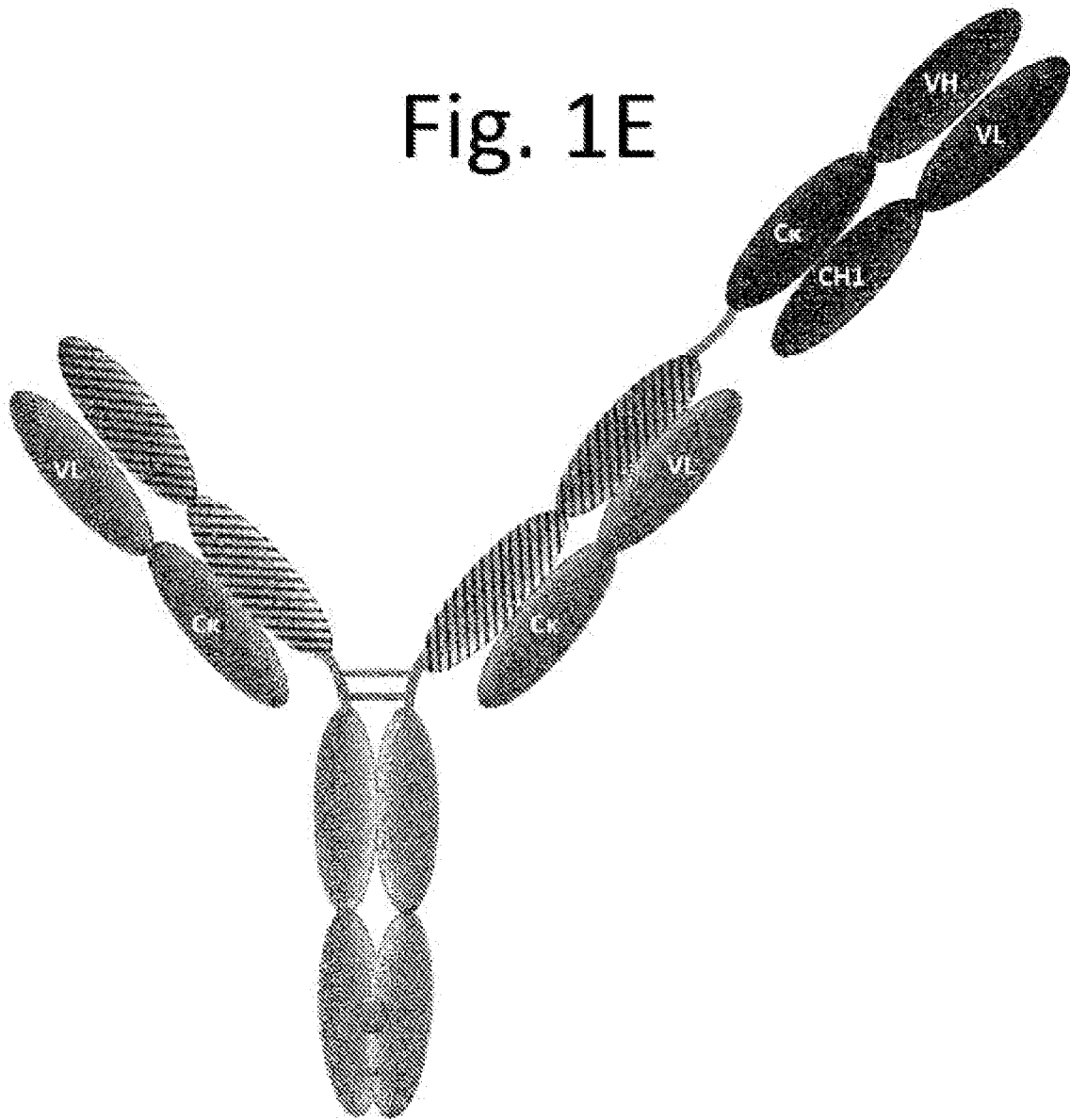


Fig. 1F

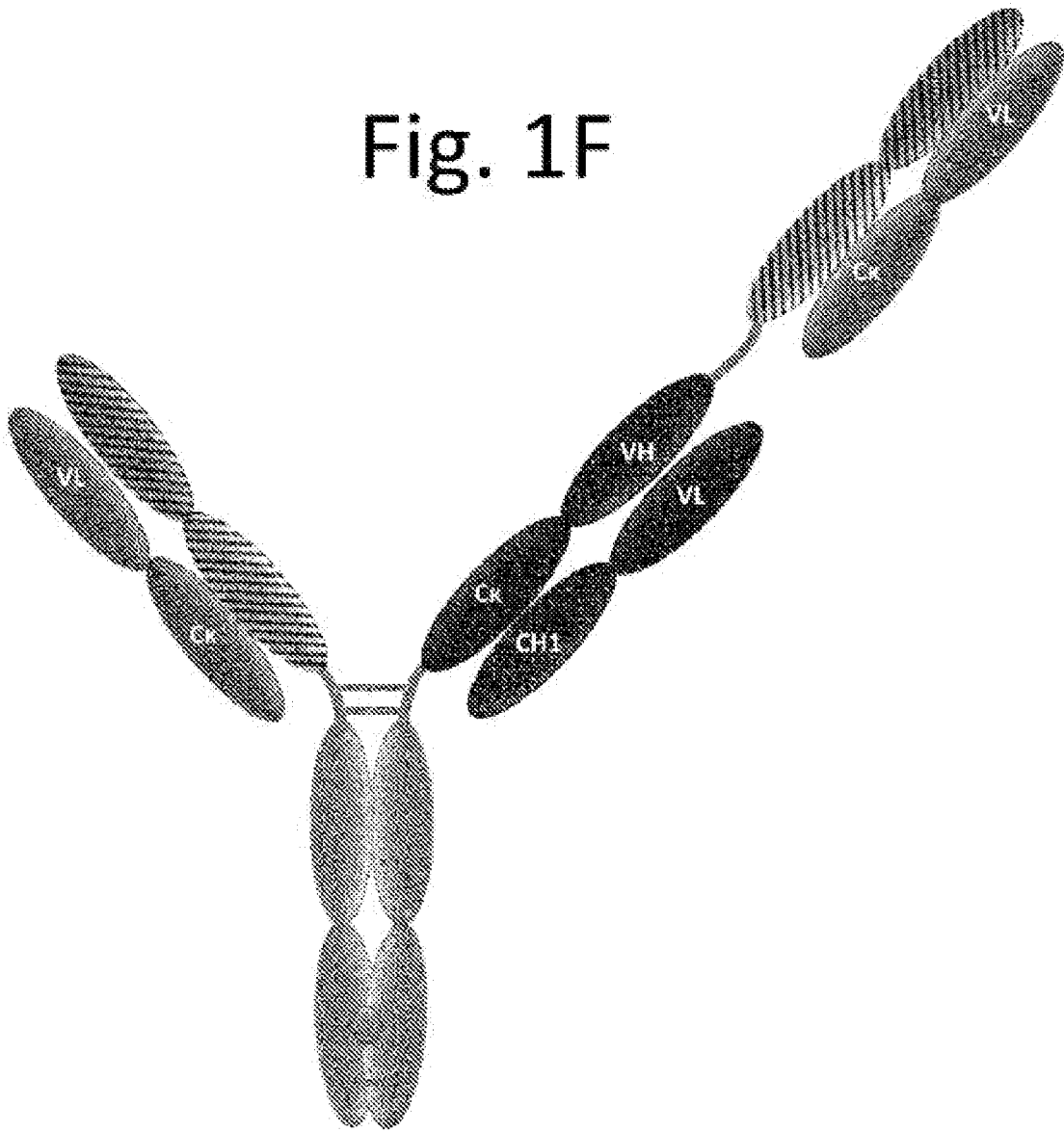


Fig. 1G

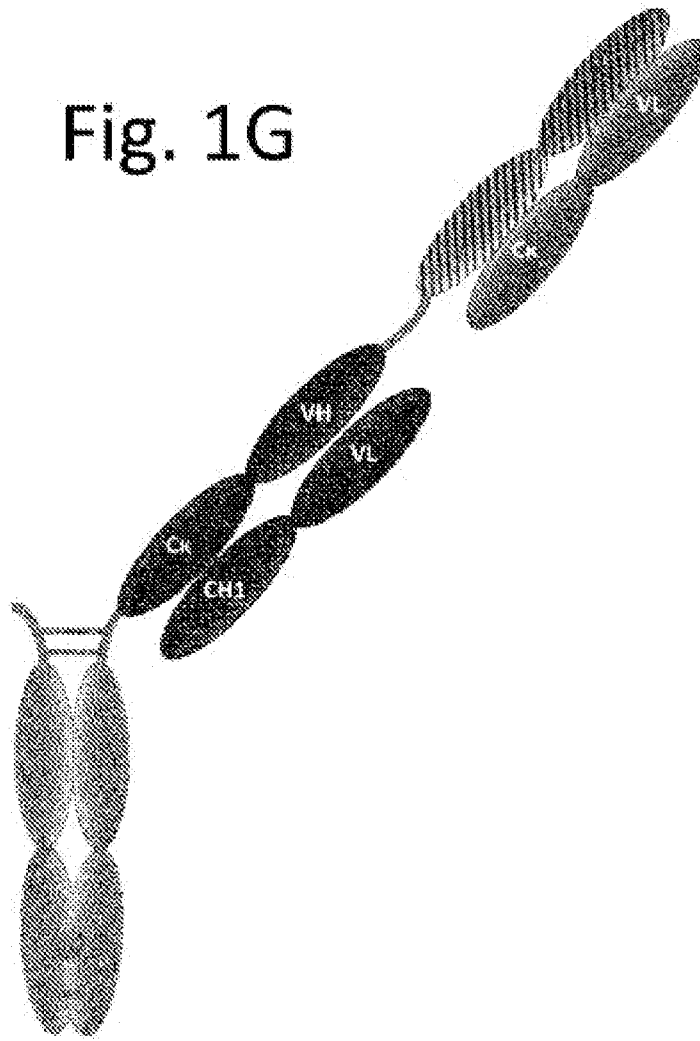


Fig. 1H

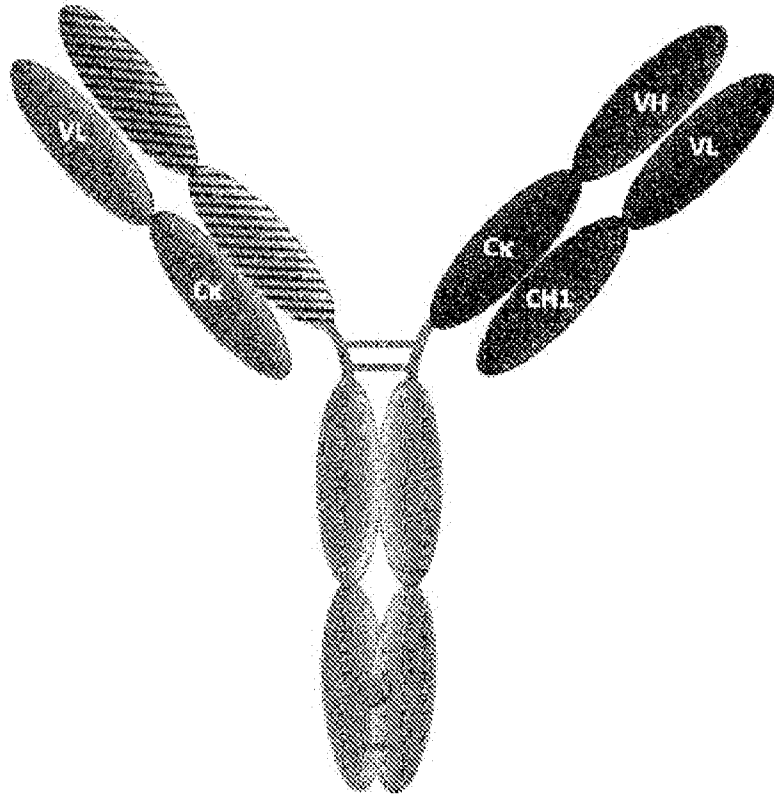


Fig. 1I

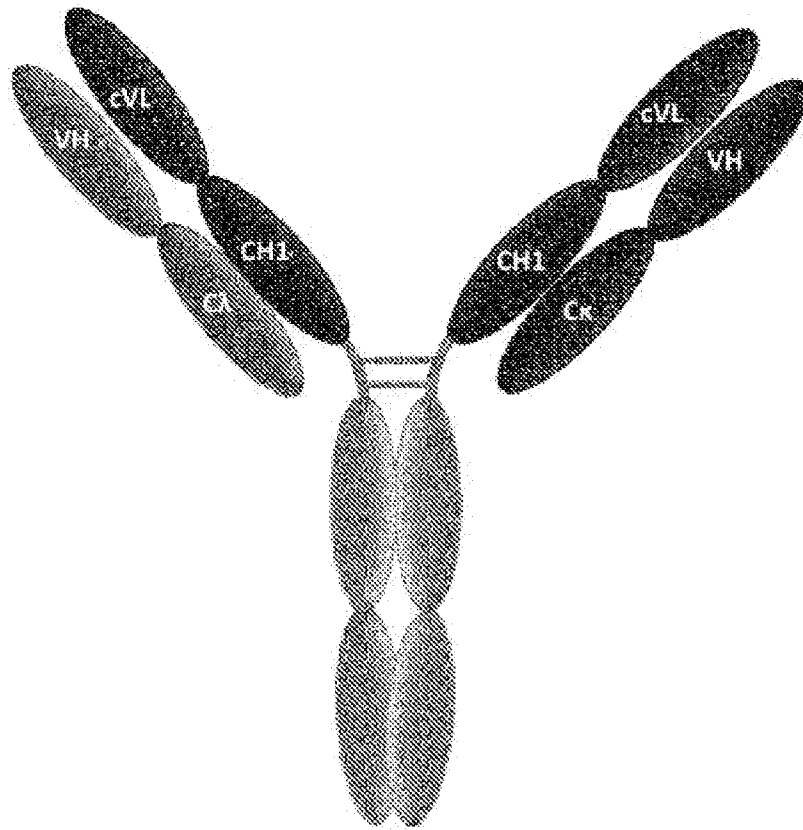


Fig. 2A moléculas CLCL de unión a FolR1

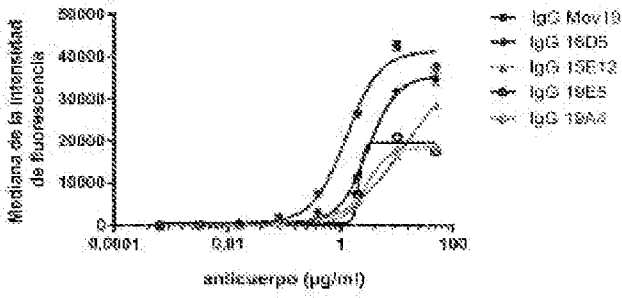


Fig. 2B moléculas CLCL de unión a FolR1

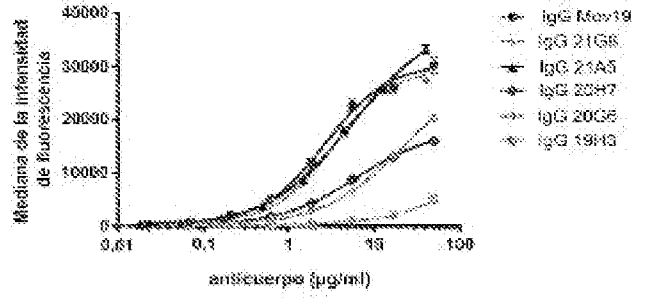


Fig. 2C moléculas Fab de unión a FolR1

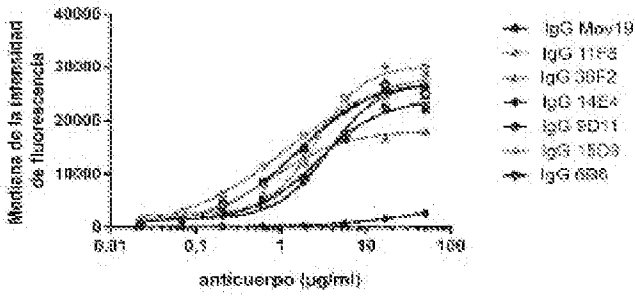


Fig. 3A

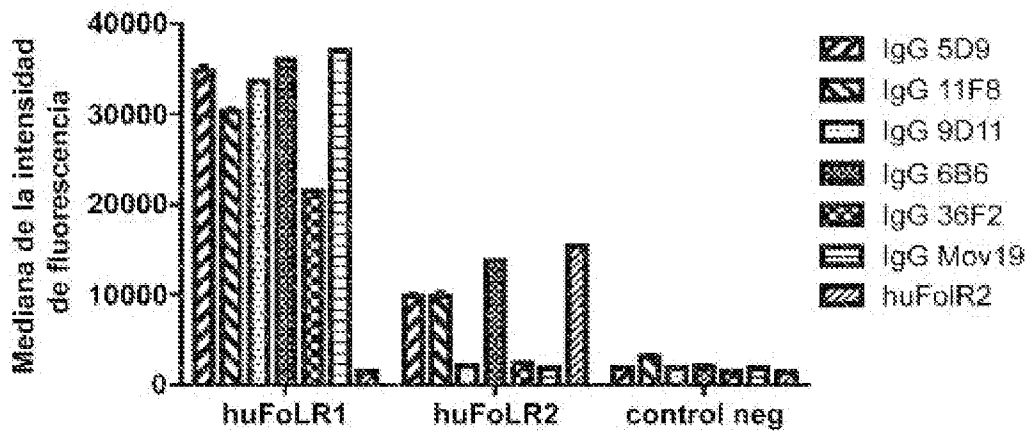


Fig. 3B

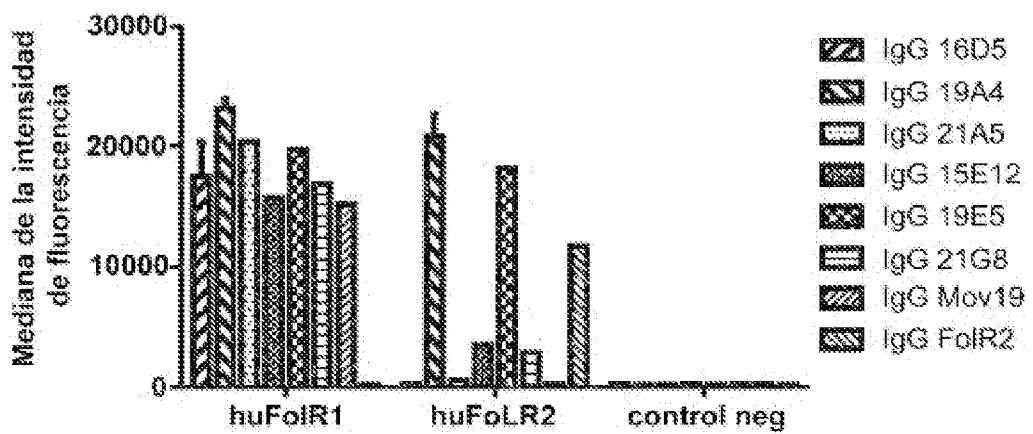


Fig. 4A

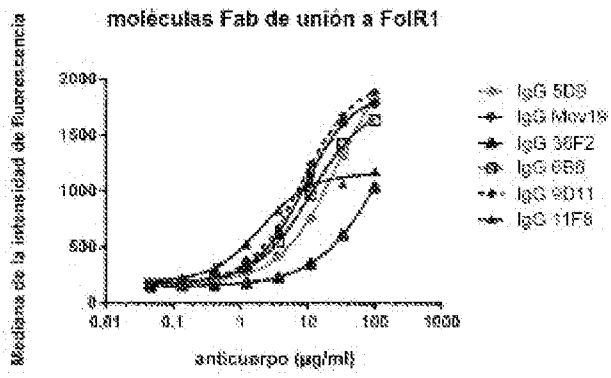


Fig. 4B

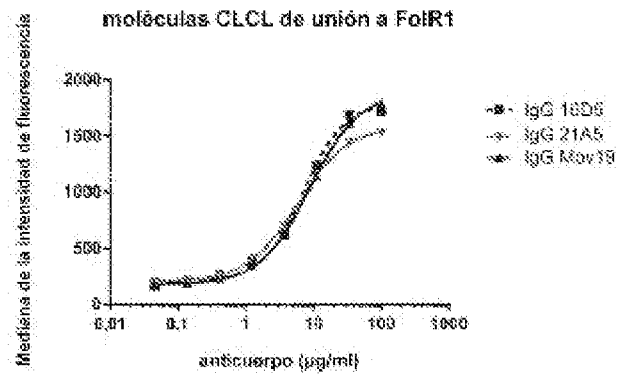


Fig. 5

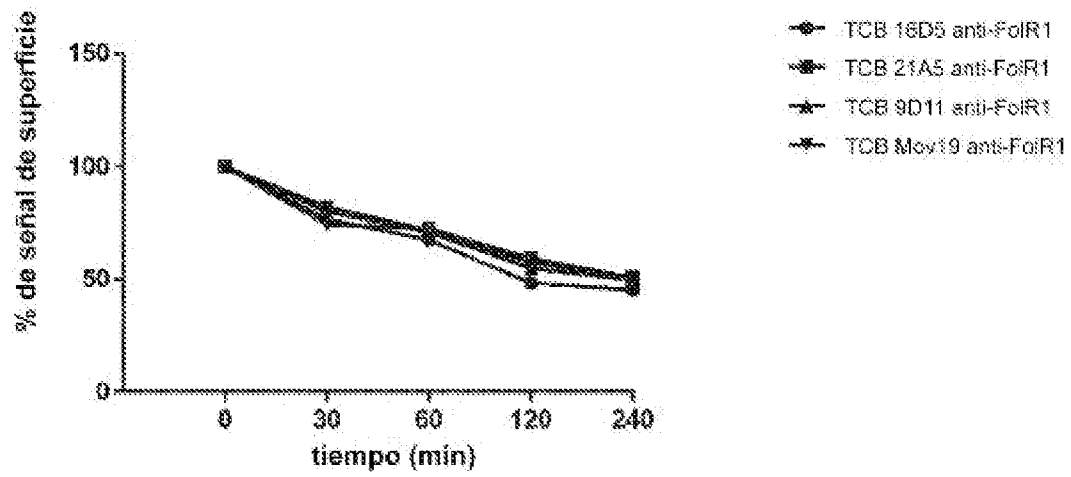


Fig. 6A

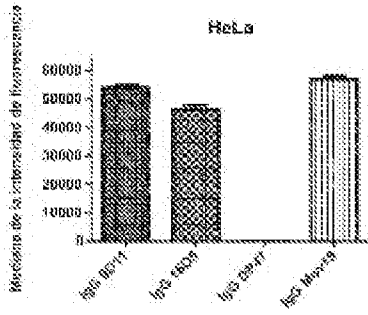


Fig. 6B

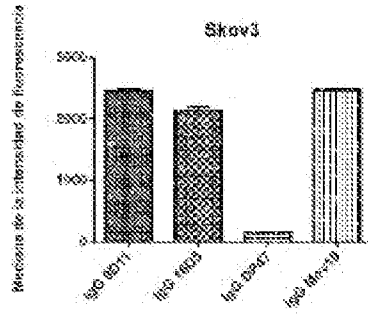


Fig. 6C

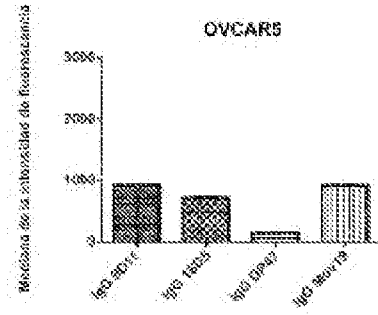


Fig. 6D

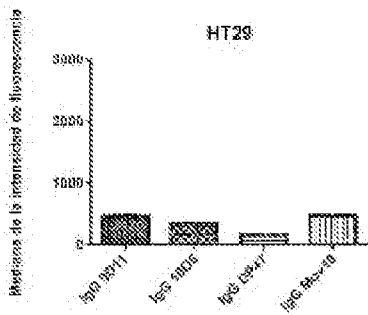
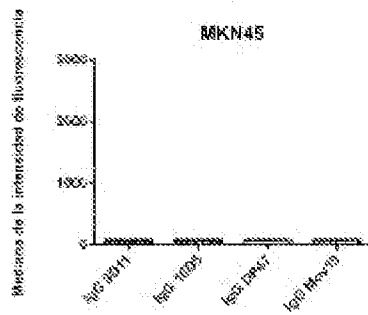


Fig. 6E



HT29

Fig. 7A

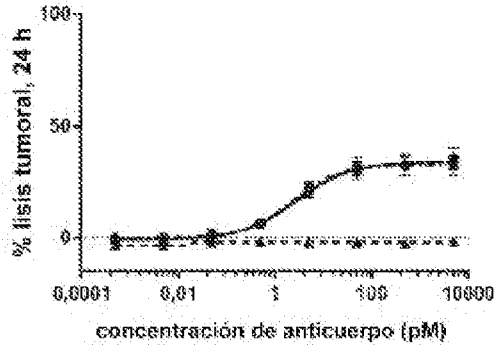
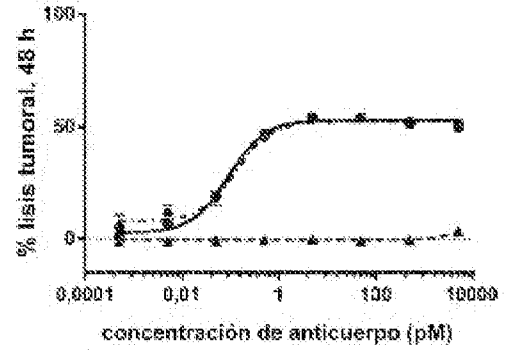


Fig. 7B



SKOV3

Fig. 7C

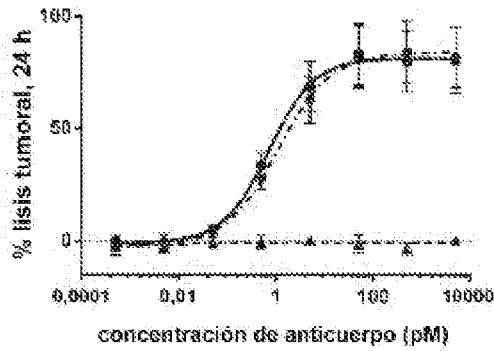
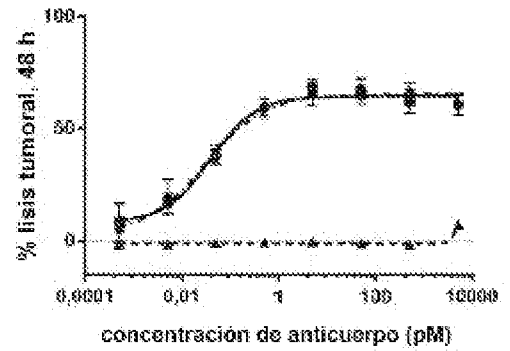


Fig. 7D



●-TCB 16D5 anti-FolR1 -■-TCB 9D11 anti-FolR1 -▲- TCB DP47

Fig. 7E

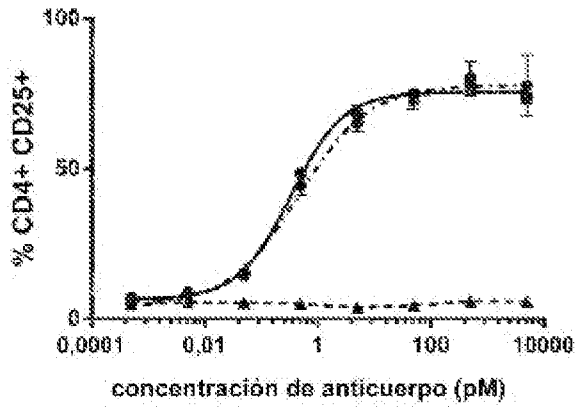


Fig. 7F

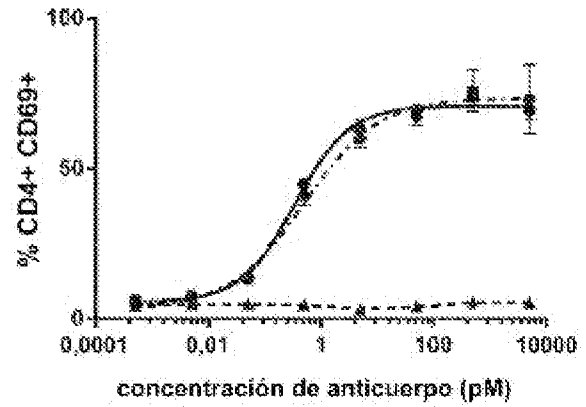


Fig. 7G

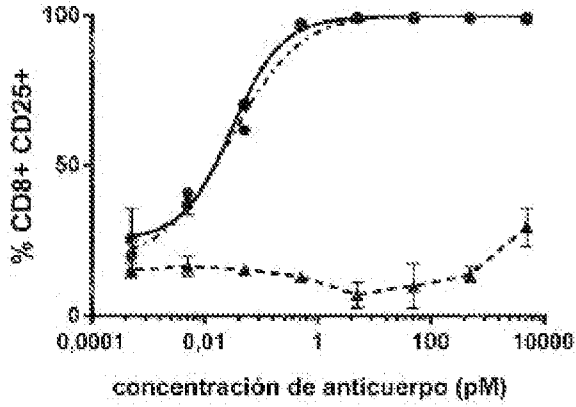
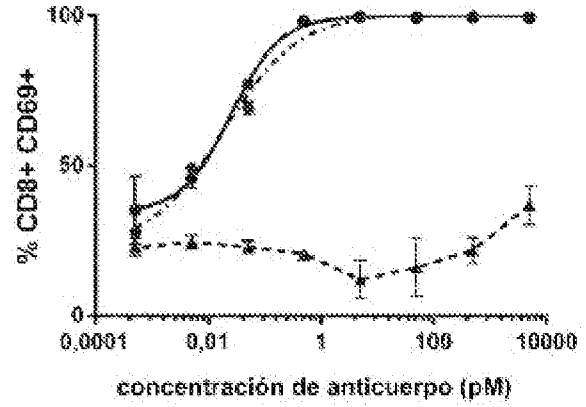


Fig. 7H



● TCB 16D5 anti-FcγR1 ● TCB 9D11 anti-FcγR1 ▲ TCB DP47

Fig. 7I

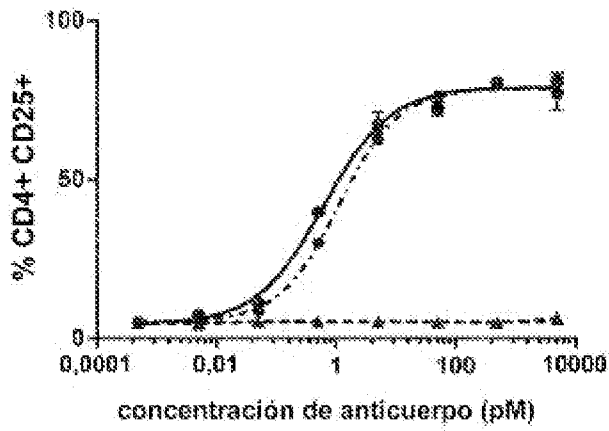


Fig. 7J

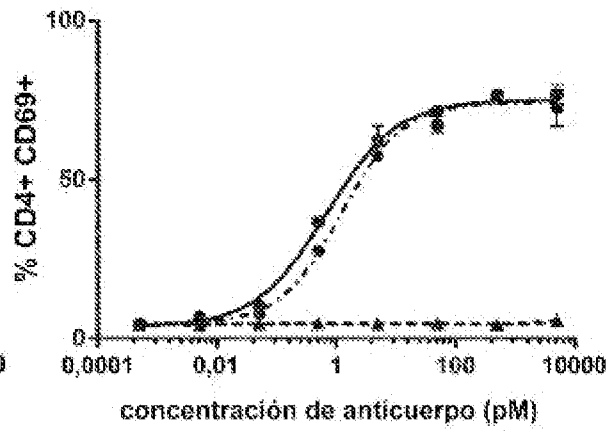


Fig. 7K

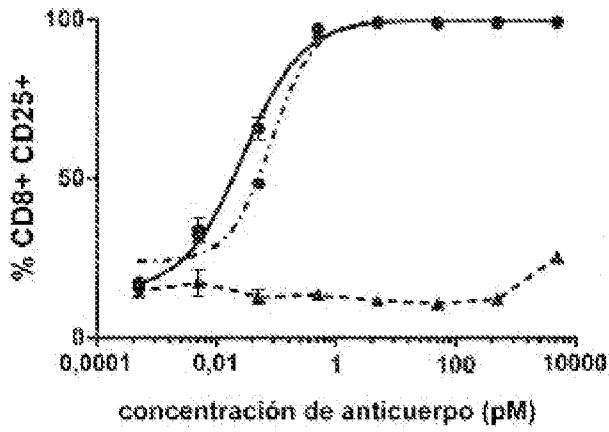
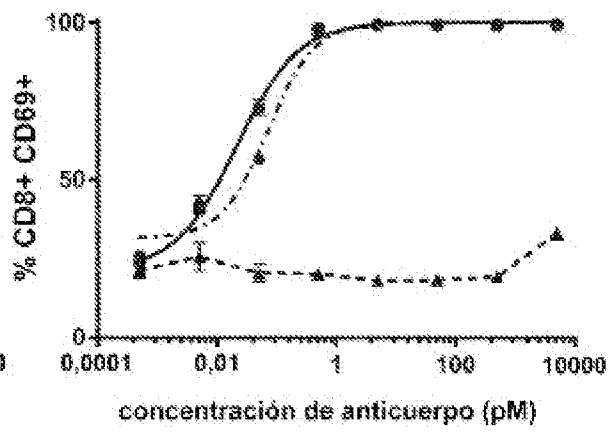


Fig. 7L



—●— TCB 16D5 anti-FoIR1 —■— TCB 9D11 anti-FoIR1 —▲— TCB DP47

Fig. 8

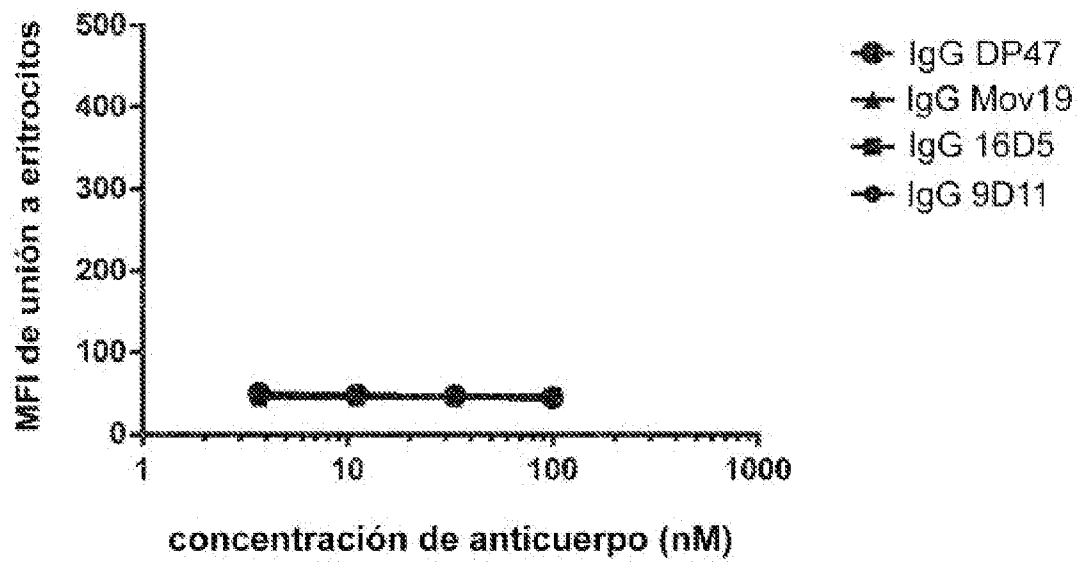


Fig. 9A

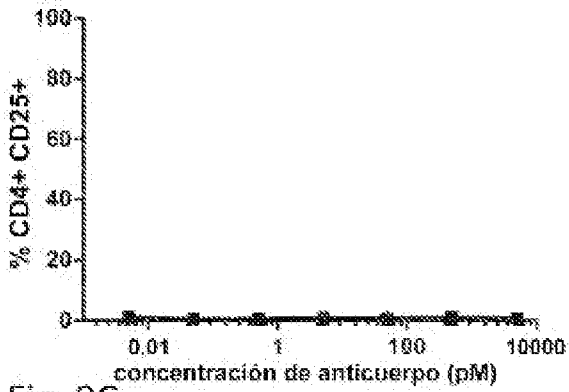


Fig. 9B

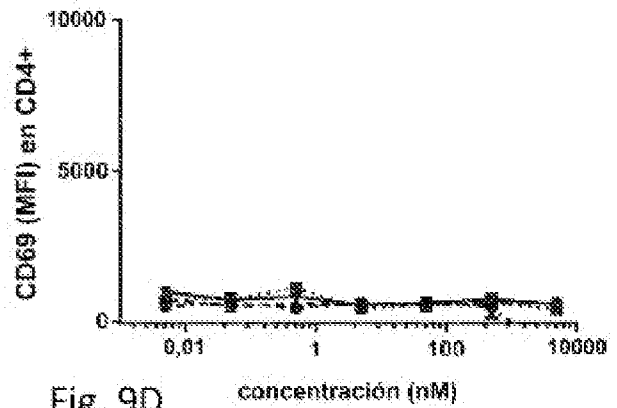


Fig. 9C

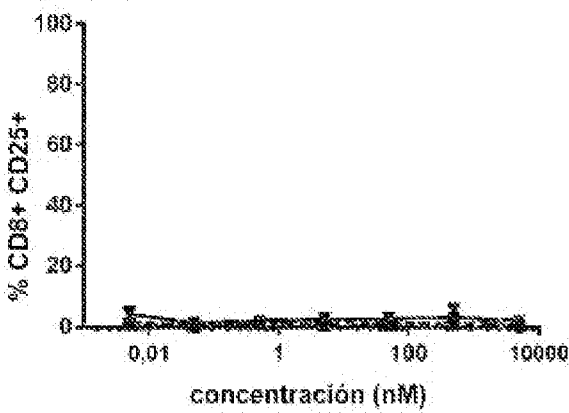
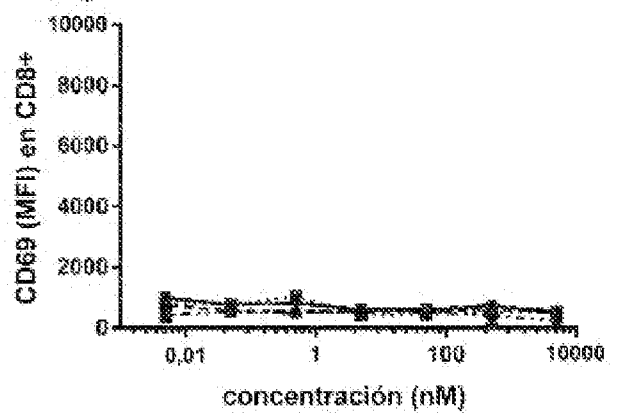


Fig. 9D



TCB Mov19
 TCB 9D11
 TCB 16D5
 TCB DP47

Fig. 10A

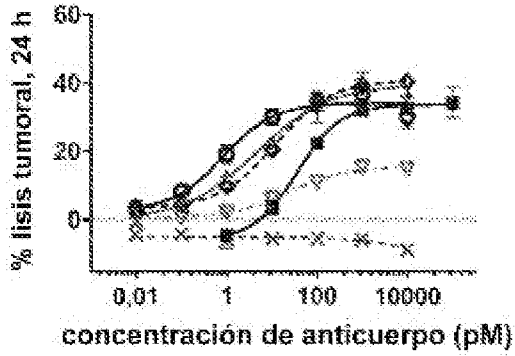


Fig. 10B

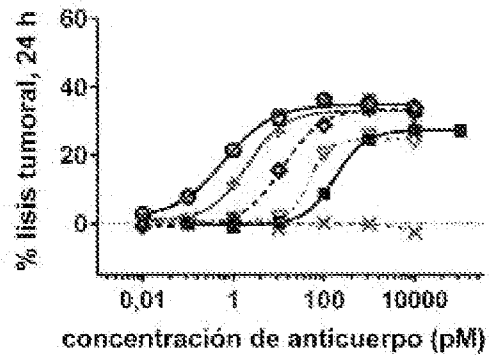
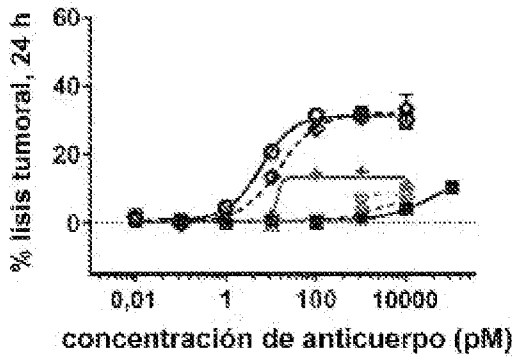


Fig. 10C



- TCB 36F2
- TCB 16D5
- + TCB 16D5 clásica
- ◆ 16D5 HT
- ▨ 16D5 1+1
- × TCB DP47

Fig. 11A

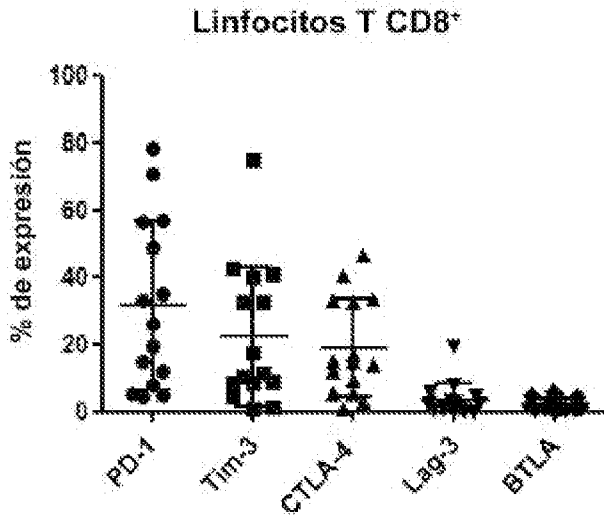


Fig. 11B

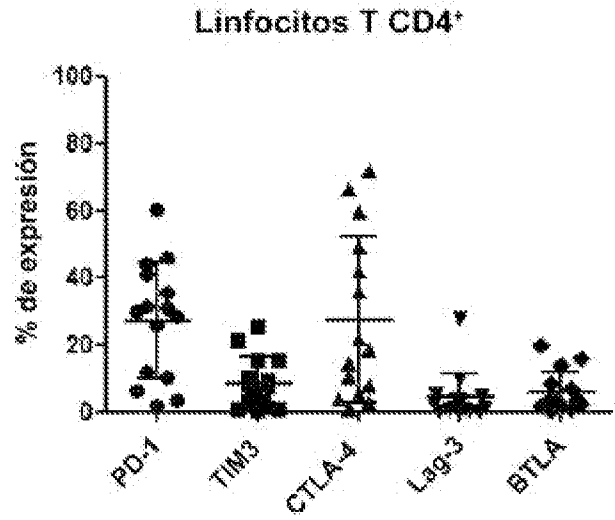


Fig. 12A

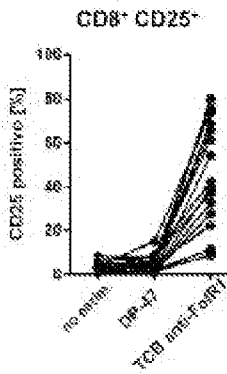


Fig. 12B

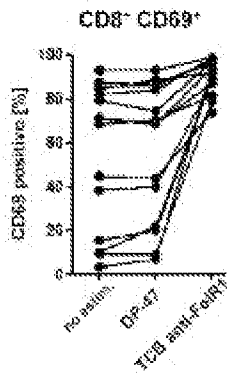


Fig. 12C

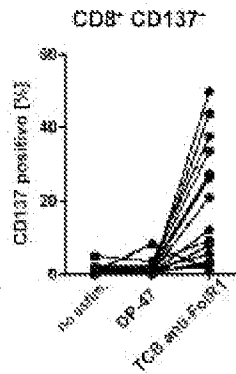


Fig. 12D

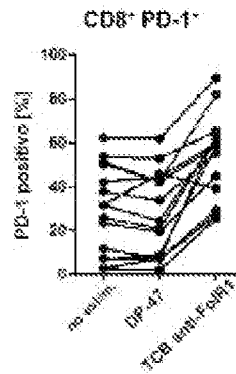


Fig. 12E

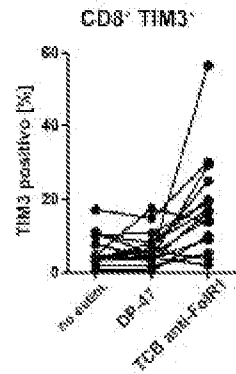


Fig. 12F

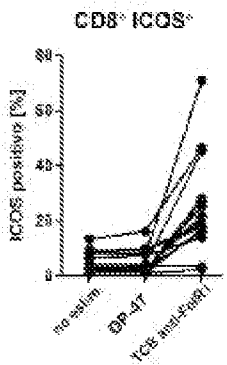


Fig. 12G

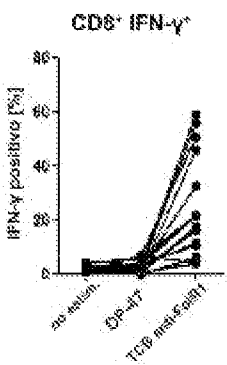


Fig. 12H

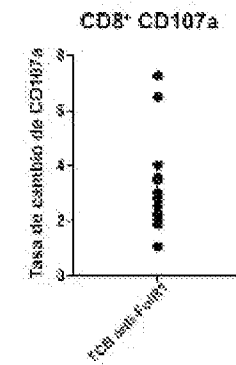


Fig. 12I

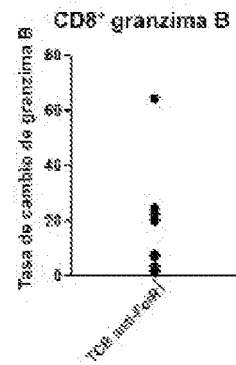


Fig. 12J

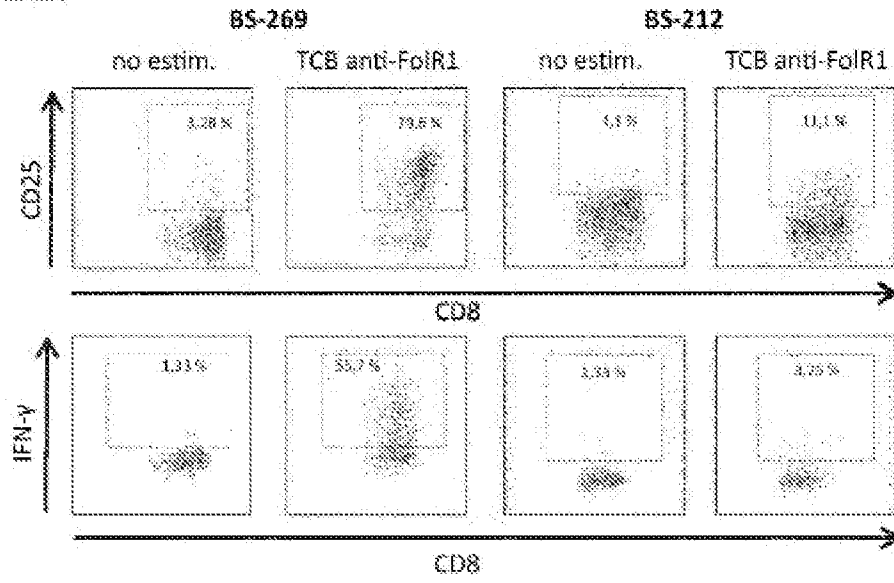


Fig. 12K

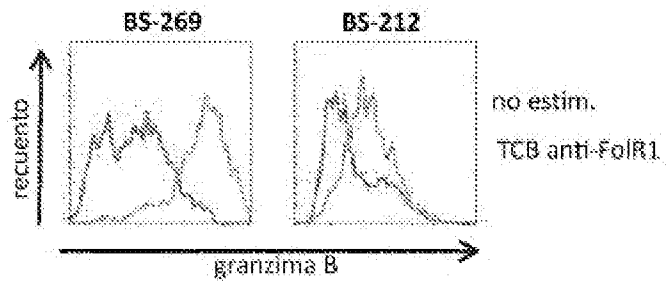


Fig. 12L

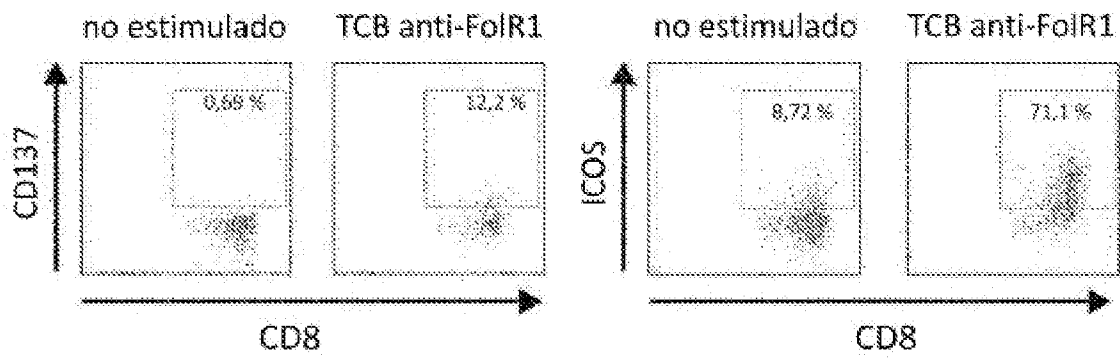


Fig. 12M

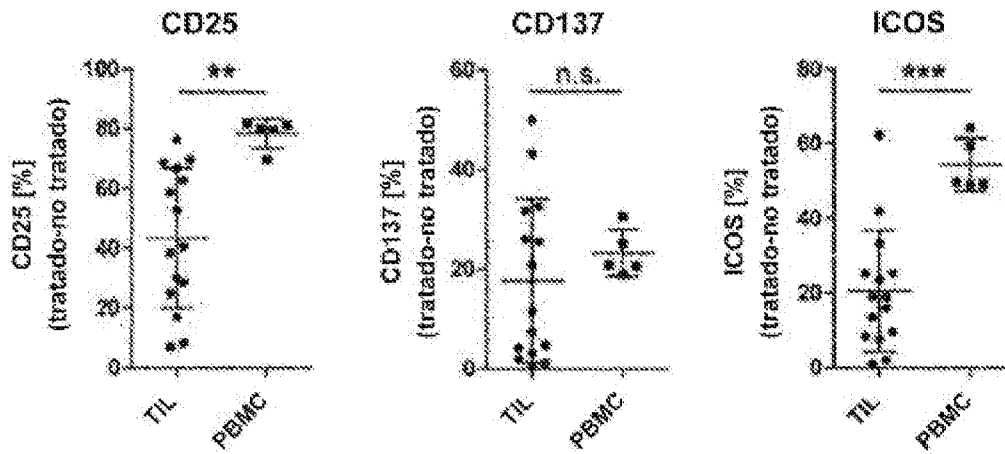


Fig. 12N

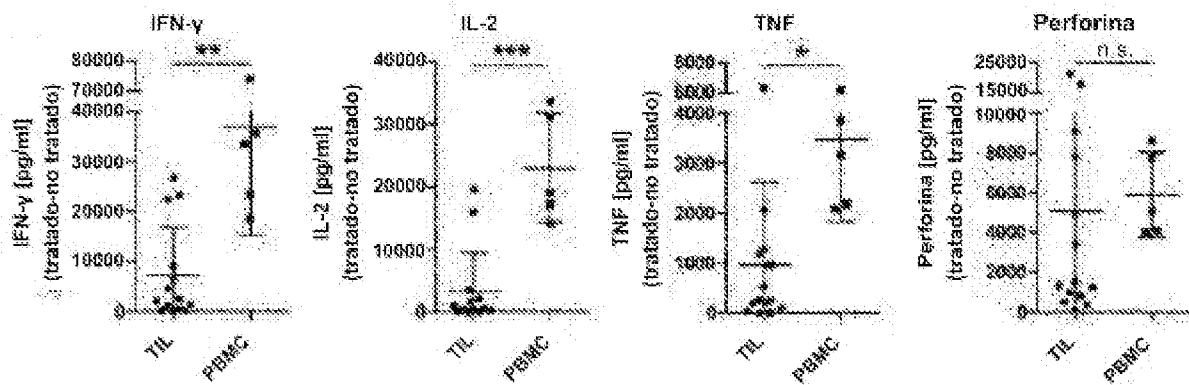


Fig. 120

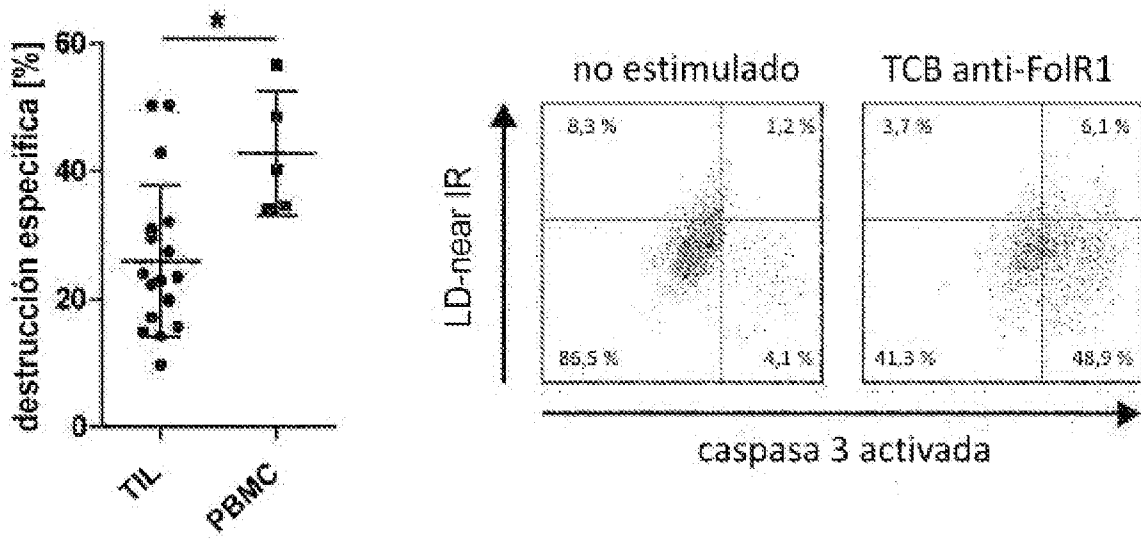


Fig. 13A

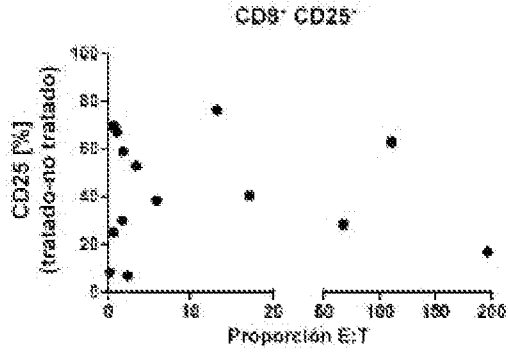


Fig. 13B

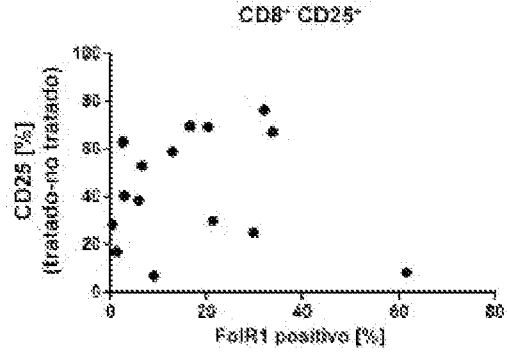


Fig. 13C

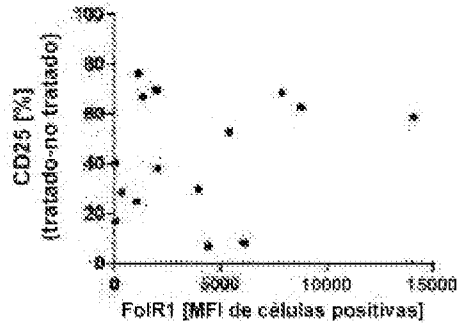


Fig. 14A

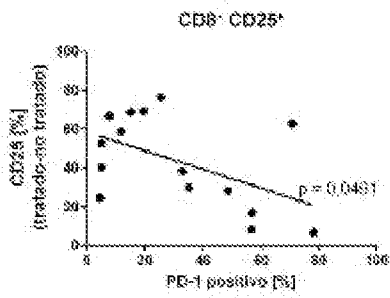


Fig. 14B

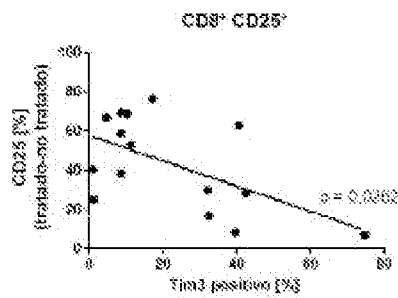


Fig. 14C

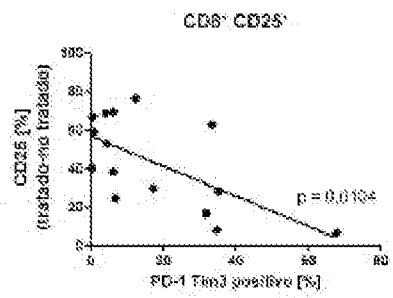


Fig. 14D

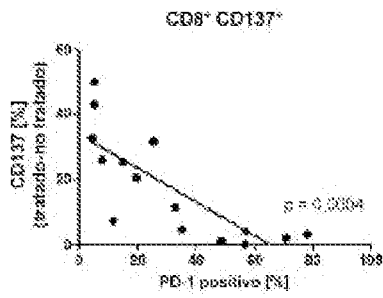


Fig. 14E

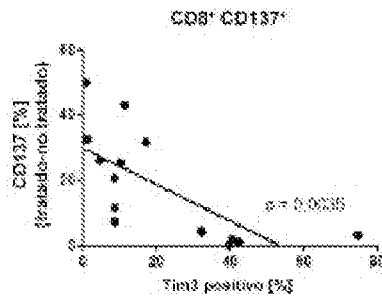


Fig. 14F

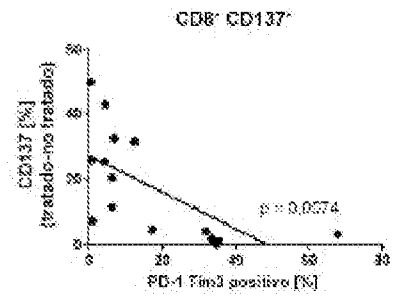


Fig. 14G

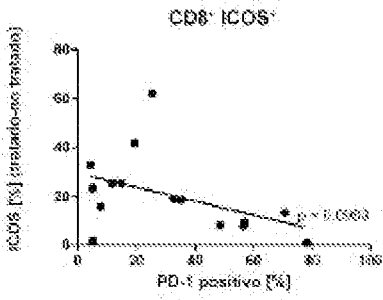


Fig. 14H

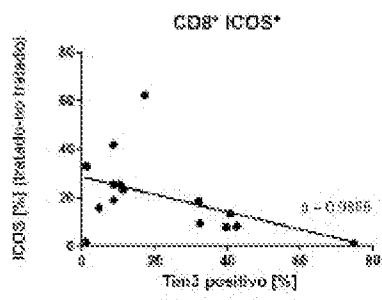


Fig. 14I

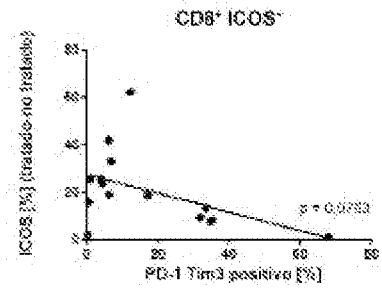


Fig. 14J

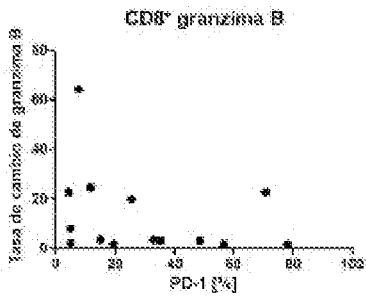


Fig. 14K

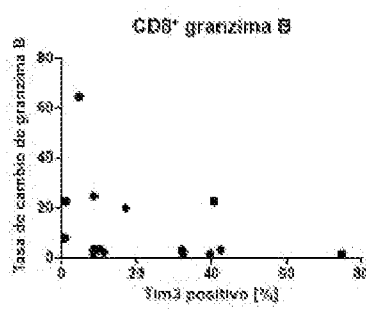


Fig. 14L

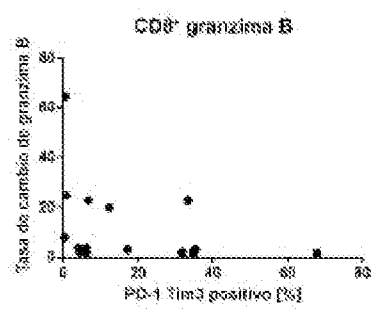


Fig. 15A

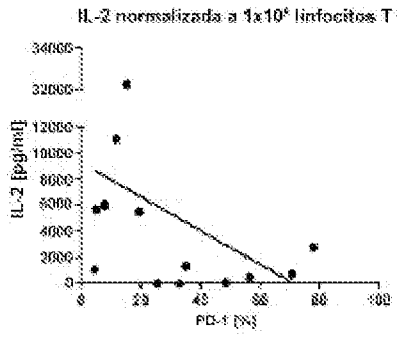


Fig. 15B

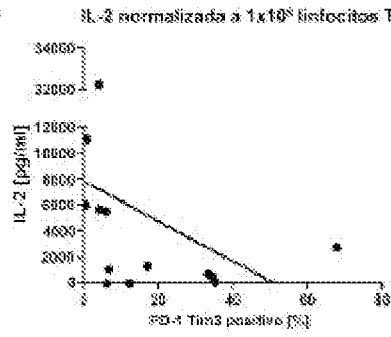


Fig. 15C

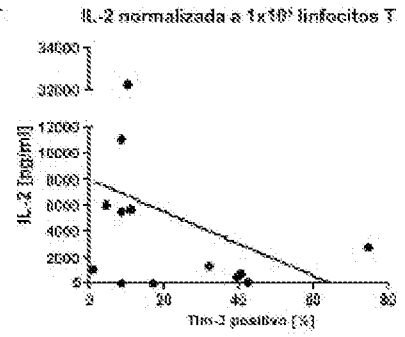


Fig. 16A

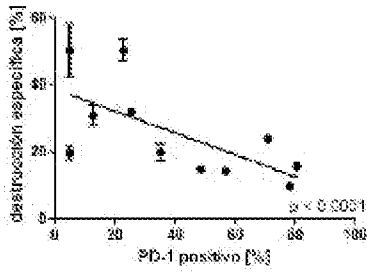


Fig. 16B

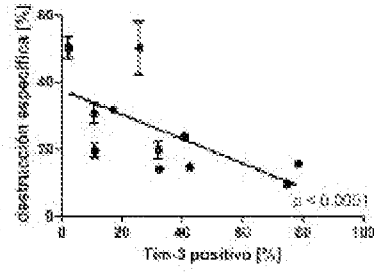


Fig. 16C

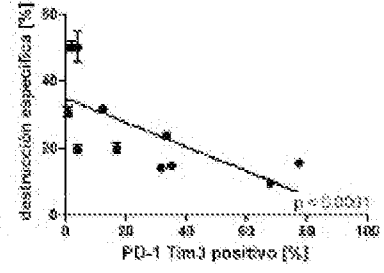


Fig. 16D

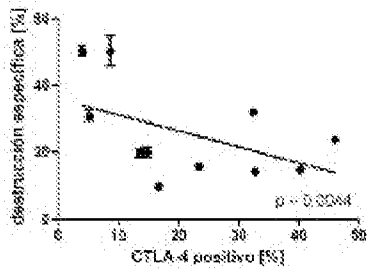


Fig. 16E

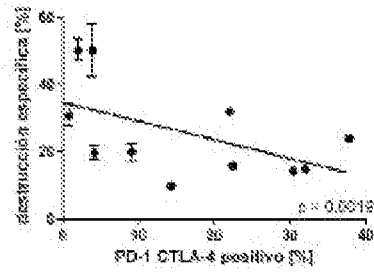


Fig. 16F

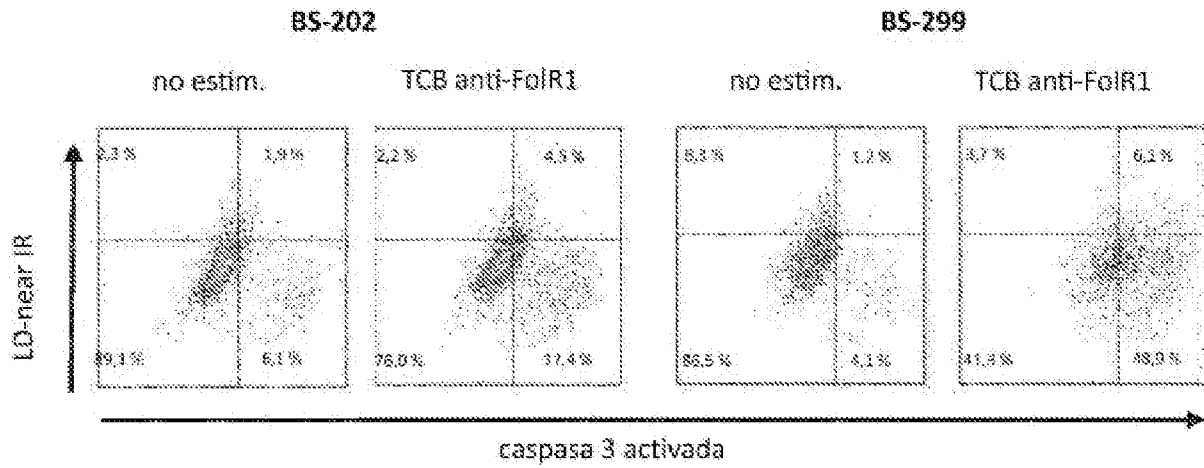


Fig. 17A

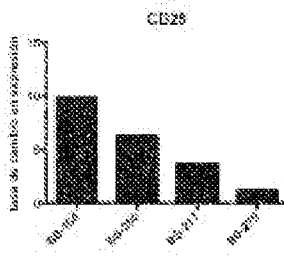


Fig. 17B

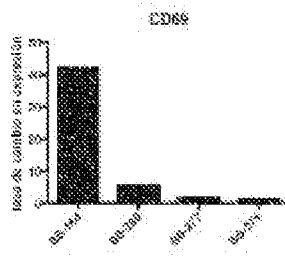


Fig. 17C

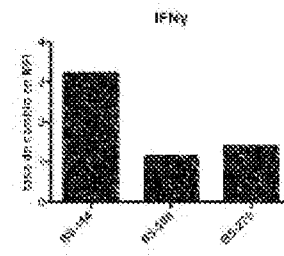


Fig. 17D

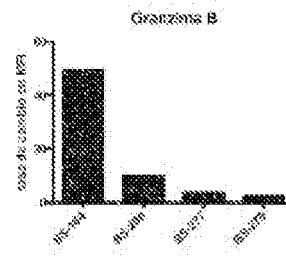


Fig. 17E

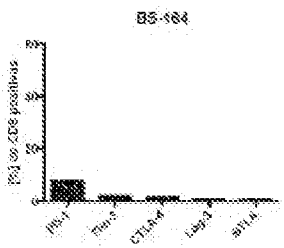


Fig. 17F

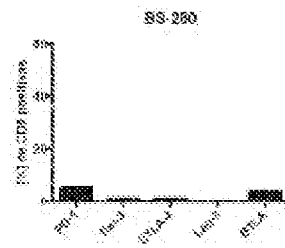


Fig. 17G

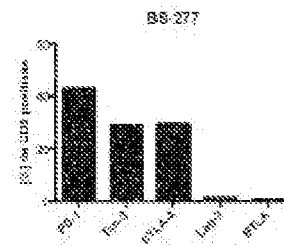


Fig. 17H

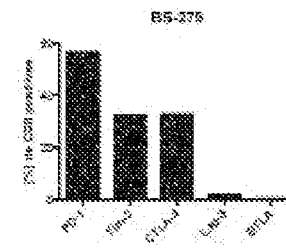


Fig. 18A

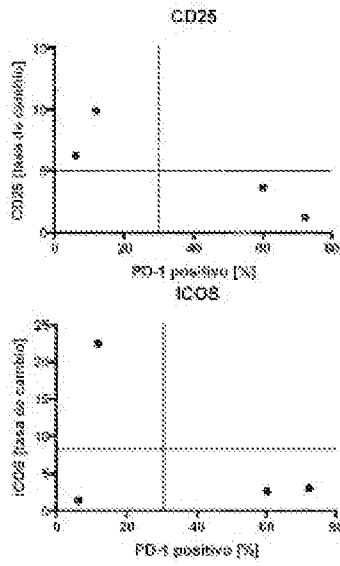


Fig. 18D

Fig. 18B

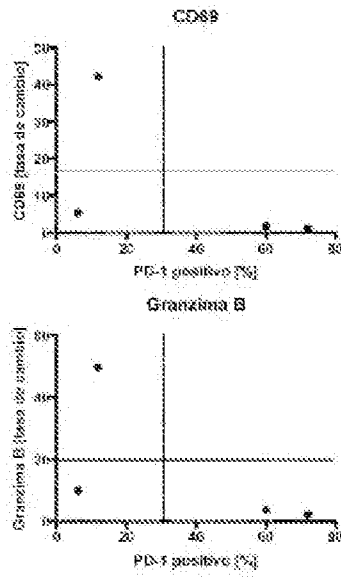


Fig. 18E

Fig. 18C

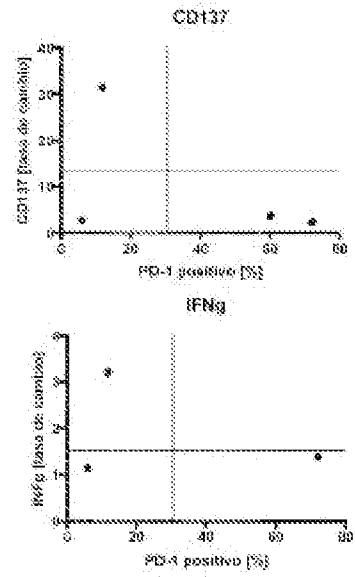


Fig. 18F

Fig. 18G

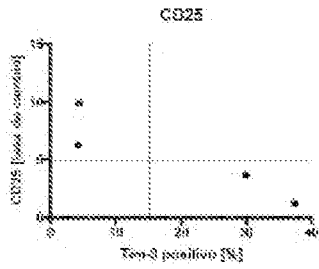


Fig. 18H

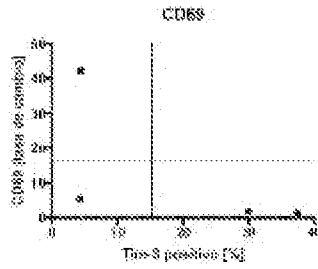


Fig. 18I

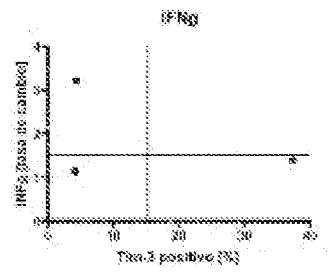
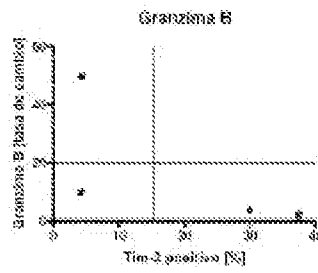
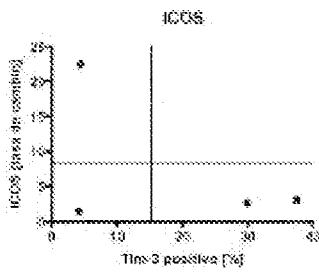
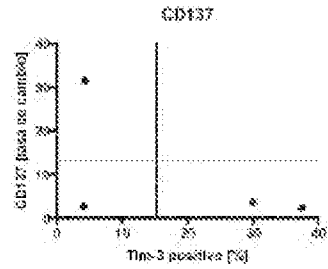


Fig. 18J

Fig. 18K

Fig. 18L

Fig. 18M

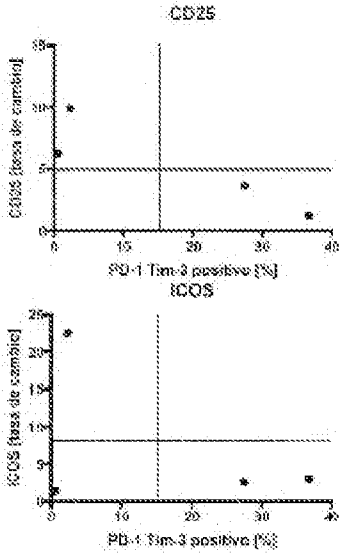


Fig. 18P

Fig. 18N

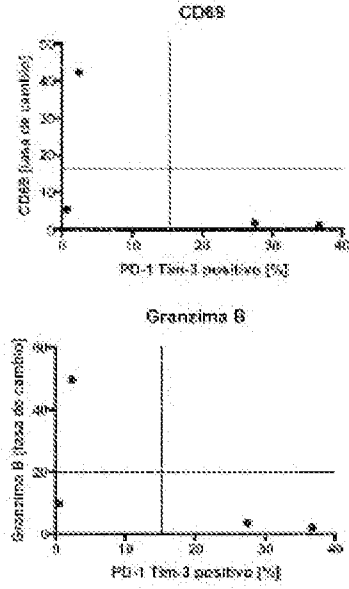


Fig. 18Q

Fig. 18O

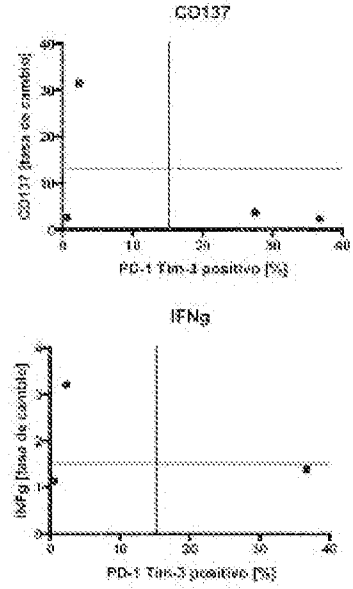


Fig. 18R

Fig. 19A

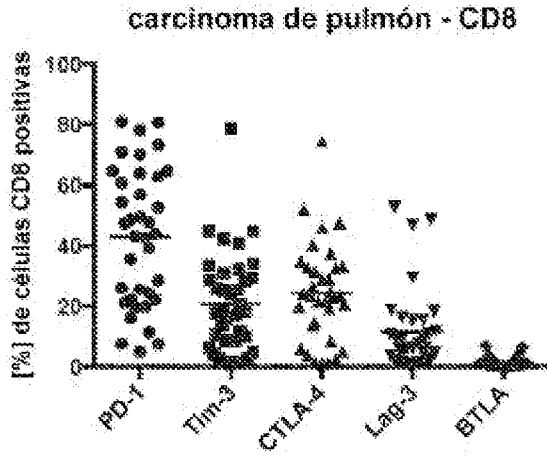
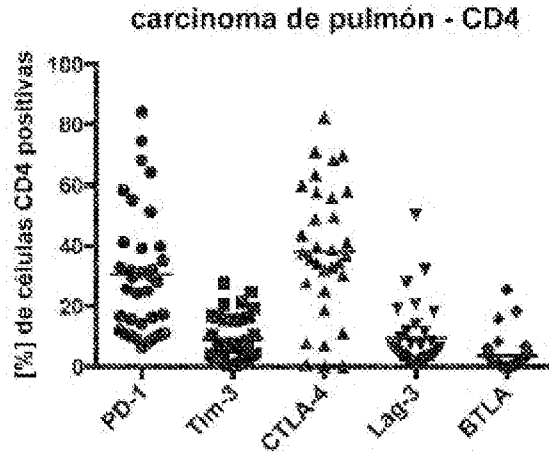


Fig. 19B



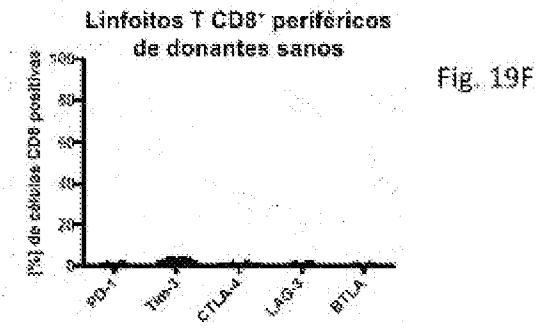
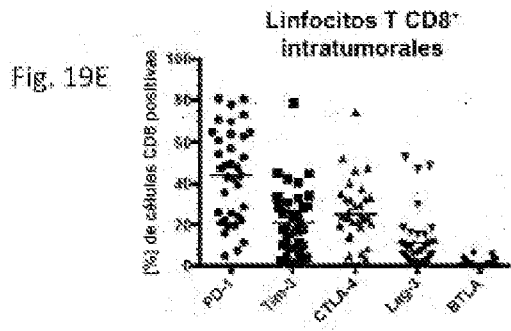
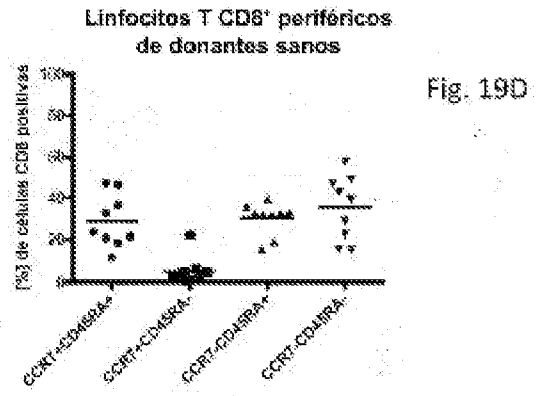
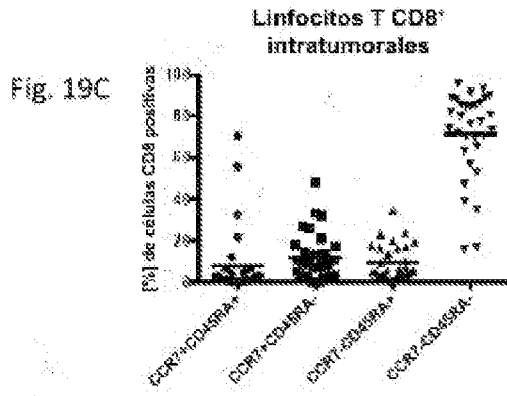


Fig. 19G

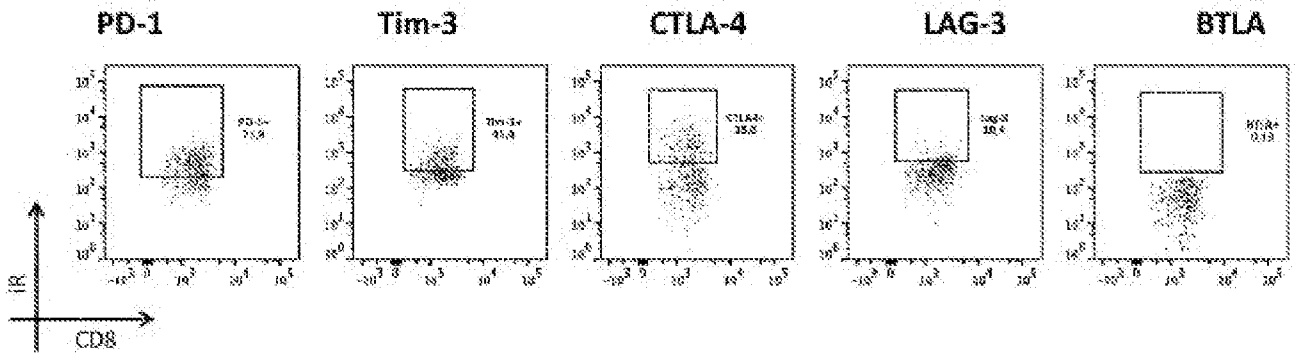


Fig. 19H

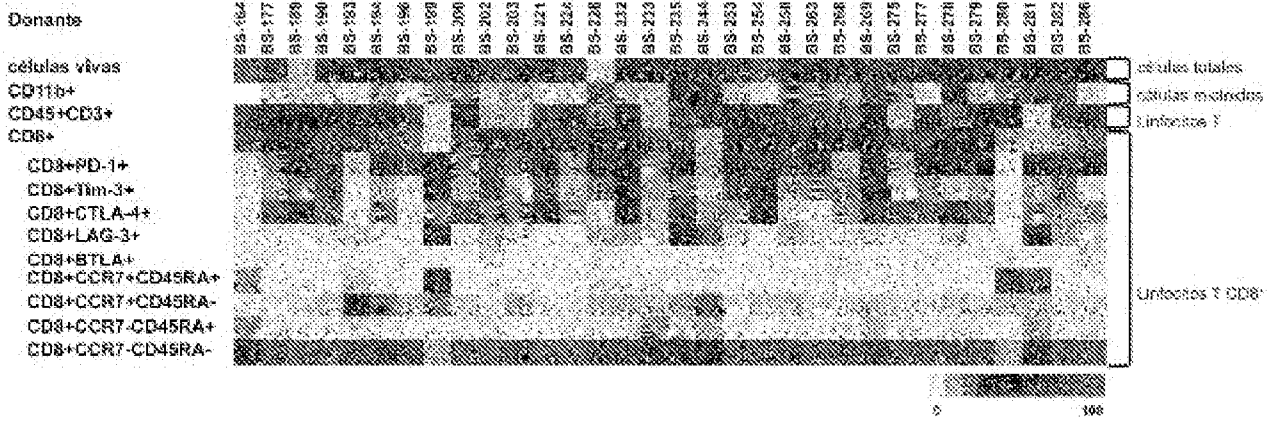


Fig. 20A

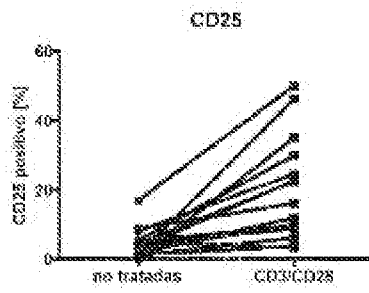


Fig. 20B

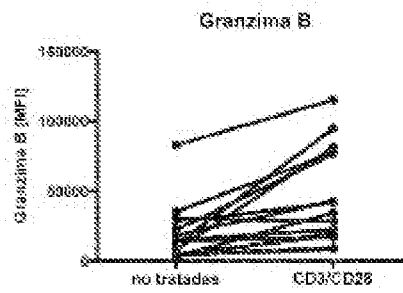


Fig. 20C

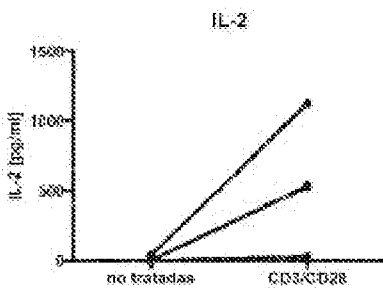


Fig. 20D

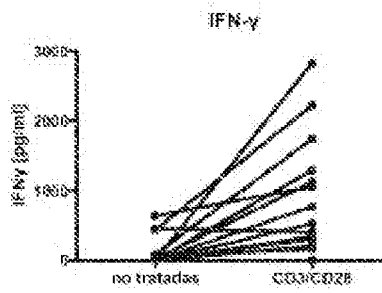


Fig. 20E

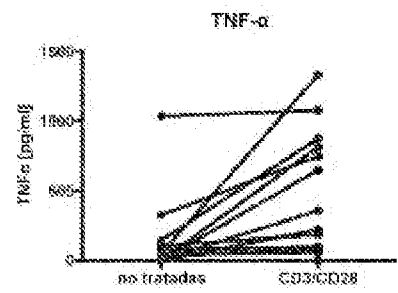


Fig. 21A

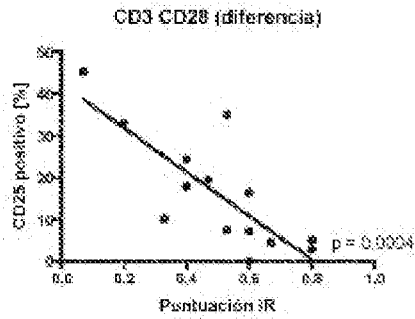


Fig. 21B

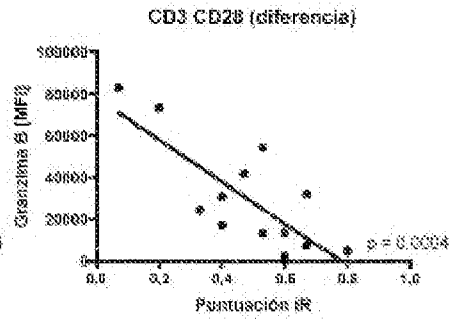


Fig. 21C

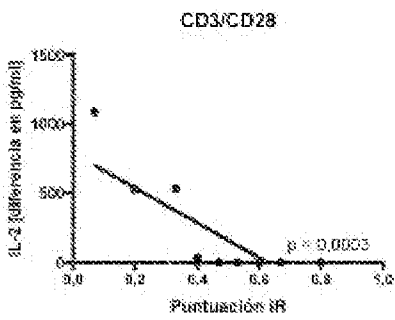


Fig. 21D

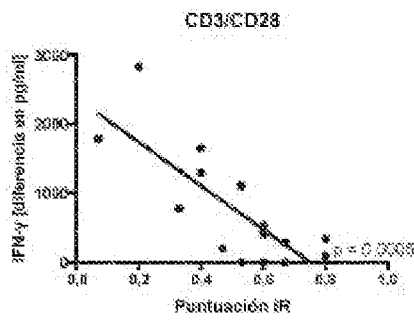
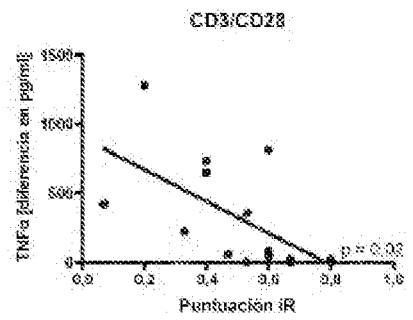
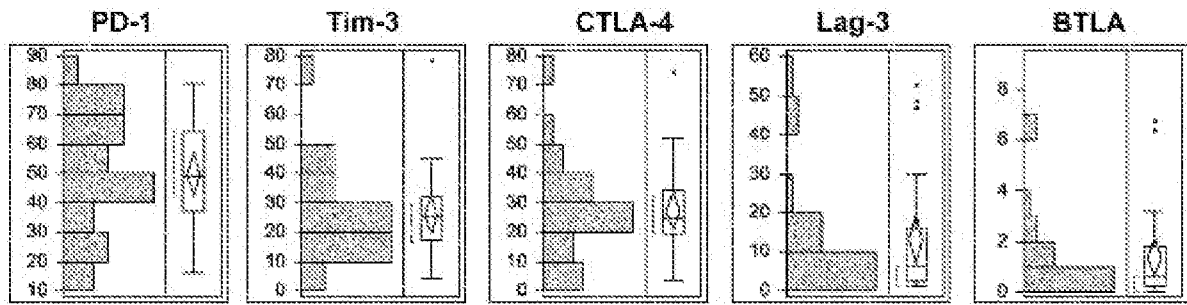


Fig. 21E





PD-1 [%]	Tim-3 [%]	CTLA-4 [%]	Lag-3 [%]	BTLA [%]	Puntos
16-37,4	4,57-17	3,7-19,5	1,4-2,6	0-0,3	0
37,5-49,5	17,1-25,1	19,5-24,8	2,7-6,3	0,4-0,6	1
49,6-64,2	25,2-32,2	24,9-34,1	6,4-15,8	0,7-1,3	2
64,3-80,6	32,3-76,6	34,2-74,5	15,9-52,6	1,9-6,8	3
Máximo					15

Fig. 21F

Fig. 21G

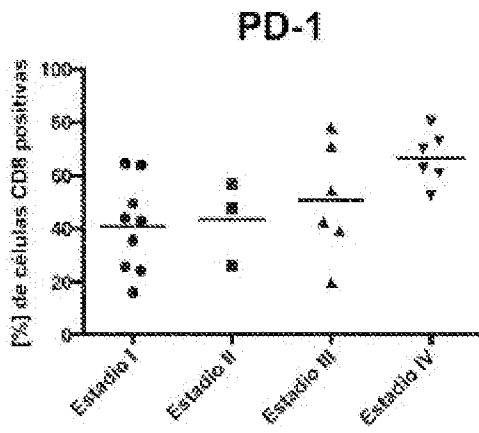


Fig. 21H

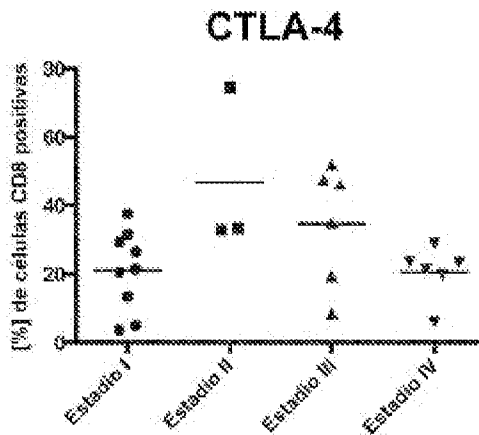
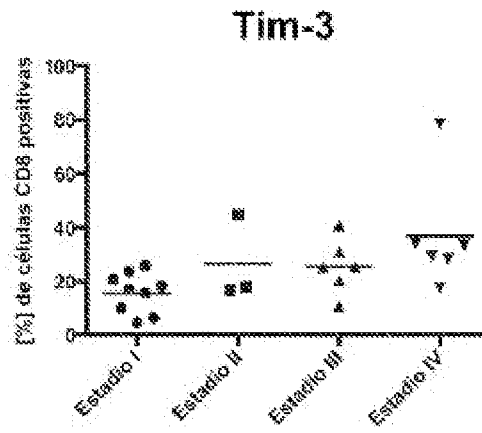


Fig. 21I

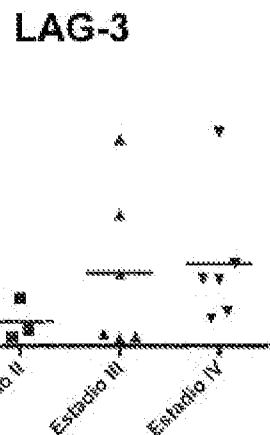


Fig. 21J

BTLA

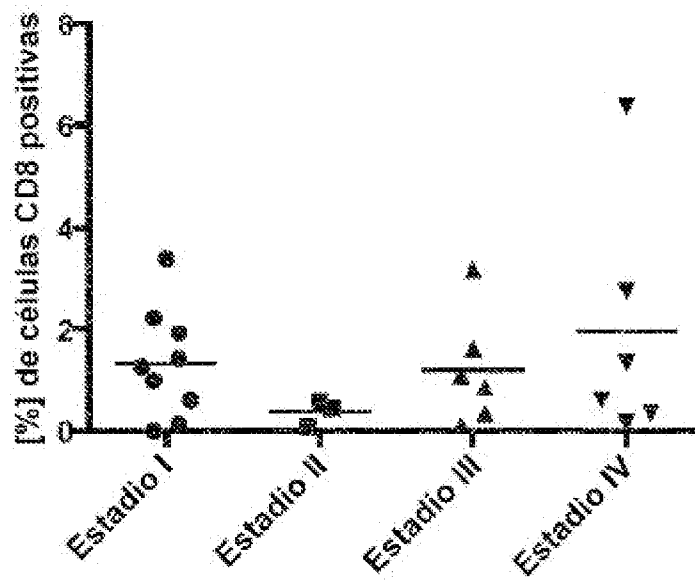


Fig. 21K

Fig. 21L

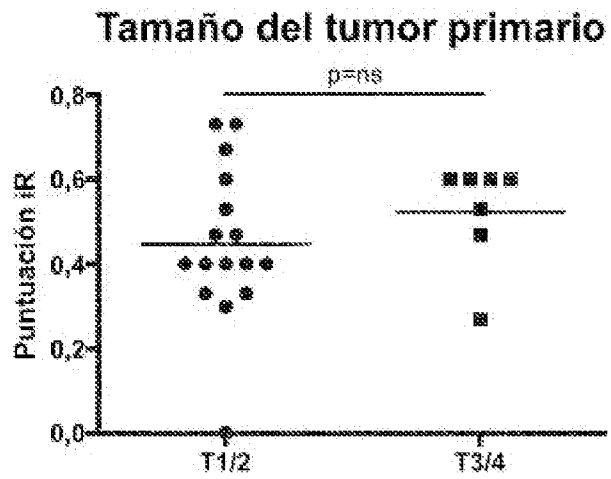


Fig. 21M

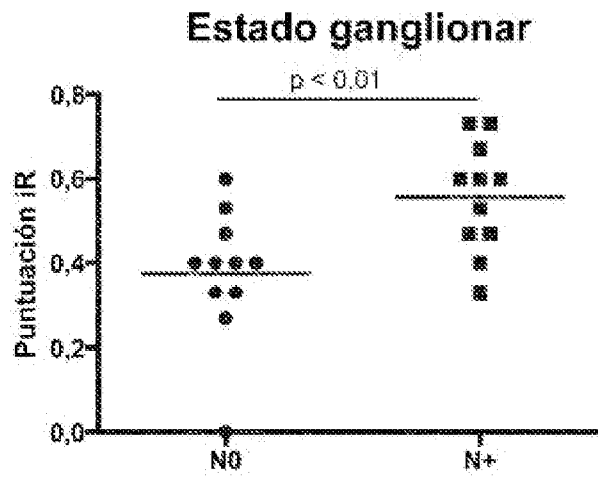


Fig. 22A

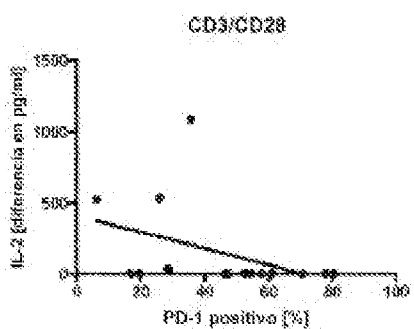


Fig. 22B

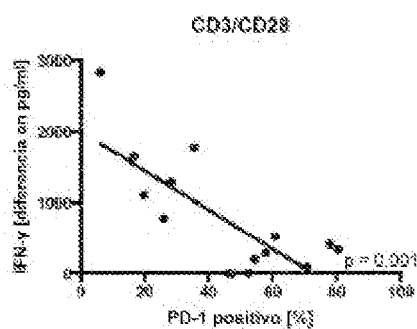


Fig. 22C

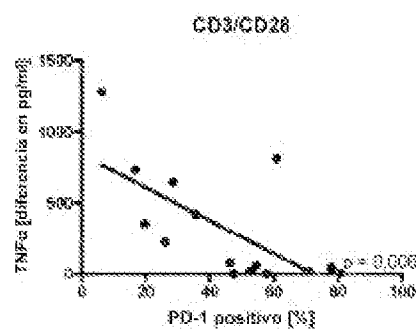


Fig. 22D

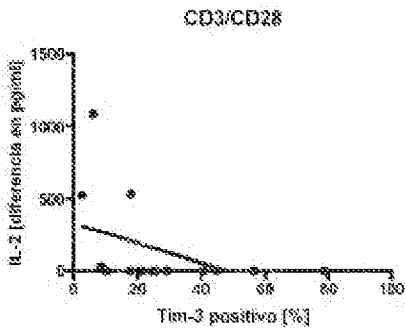


Fig. 22E

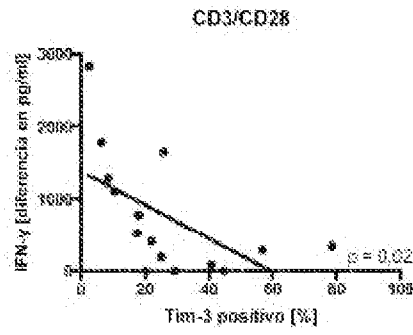


Fig. 22F

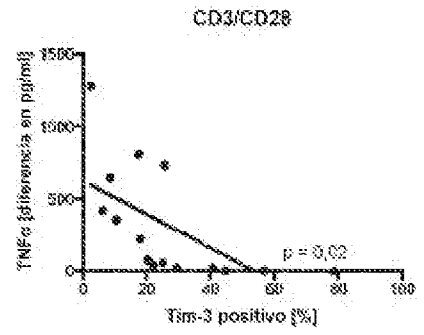


Fig. 22G

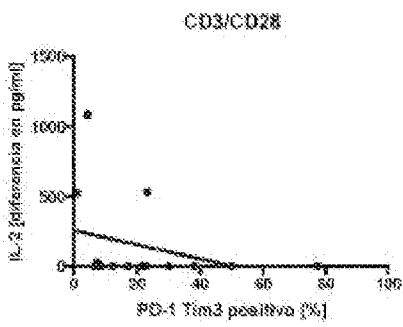


Fig. 22H

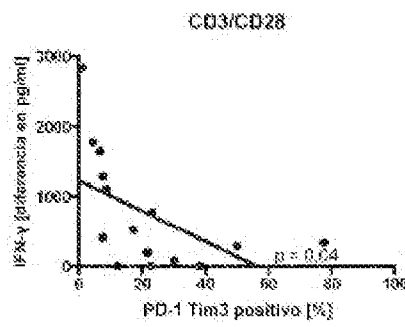


Fig. 22I

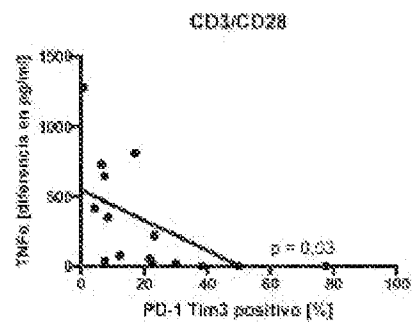


Fig. 22A

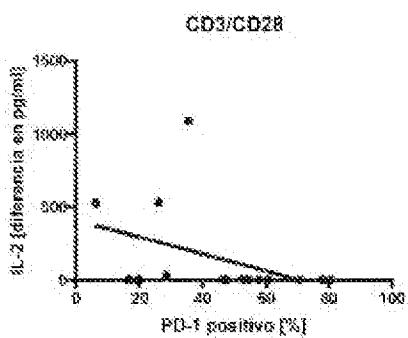


Fig. 22B

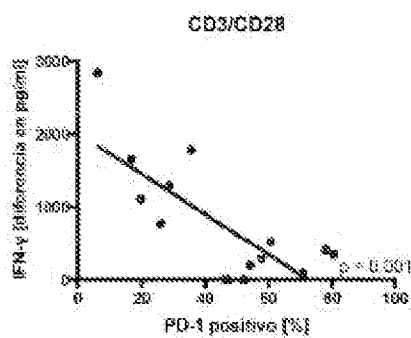


Fig. 22C

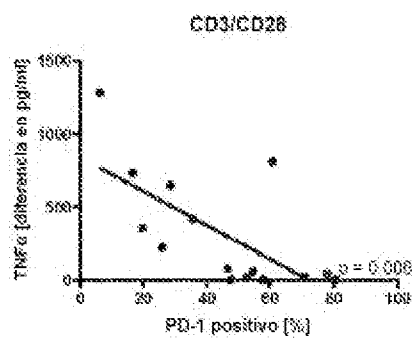


Fig. 23D

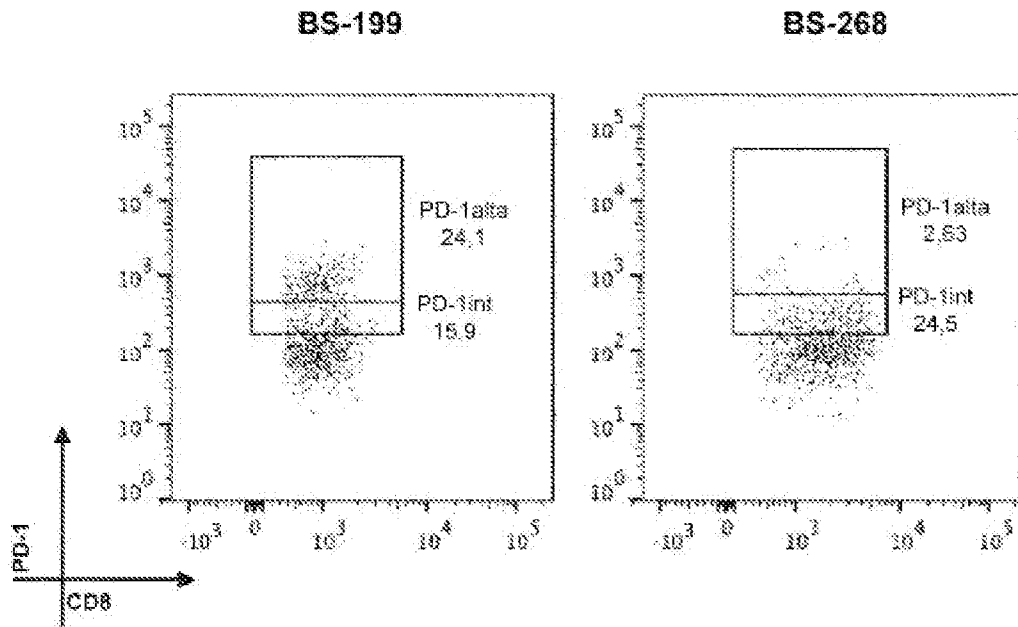


Fig. 23E

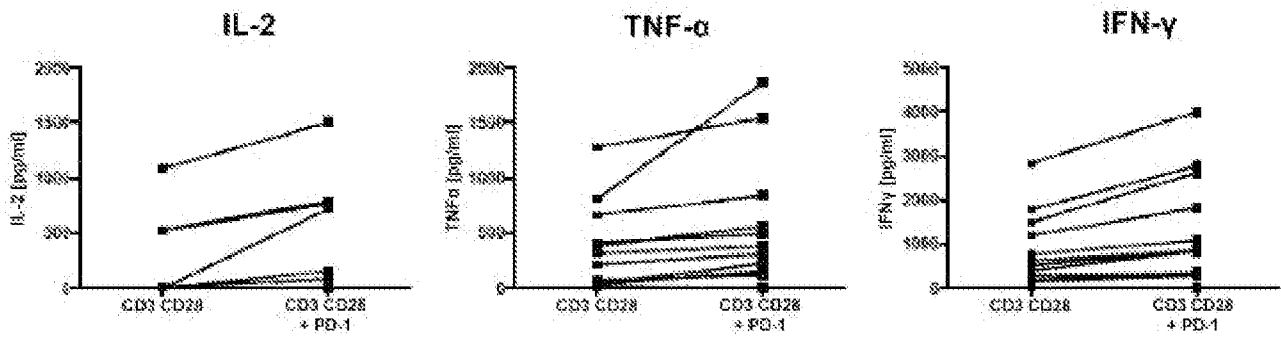


Fig. 24A

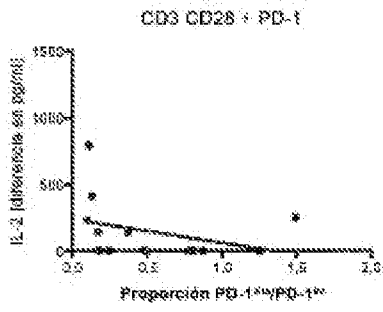


Fig. 24B

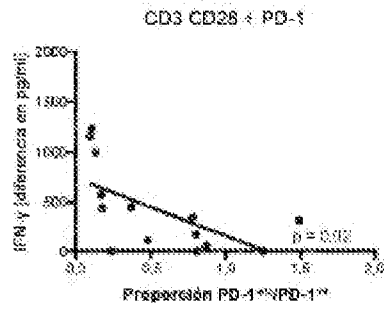


Fig. 24C

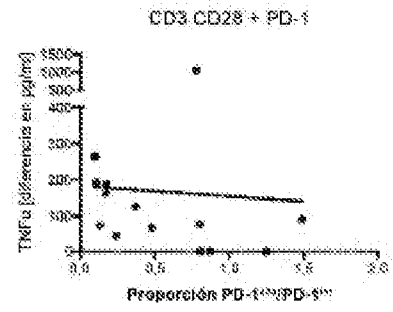


Fig. 24D

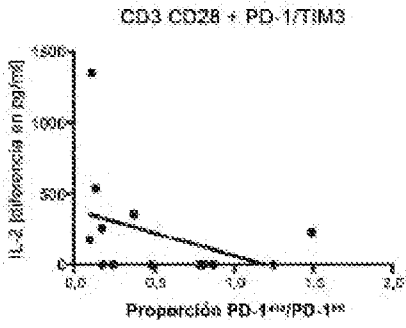


Fig. 24E

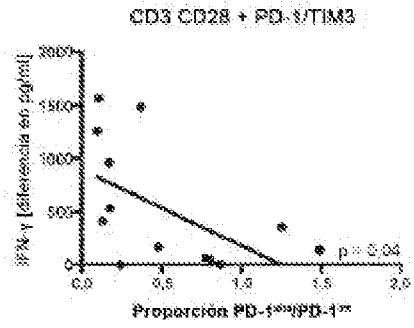


Fig. 24F

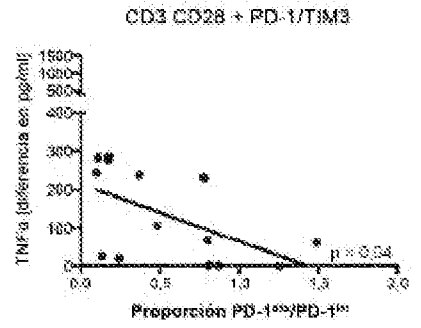


Fig. 25A

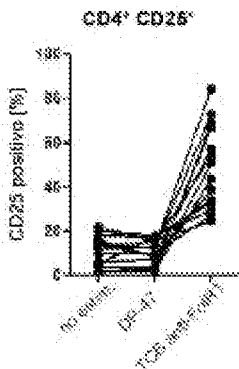


Fig. 25B

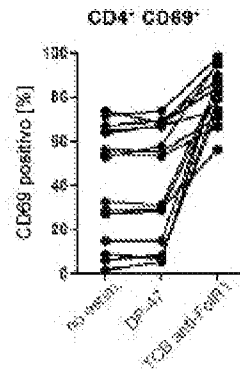


Fig. 25C

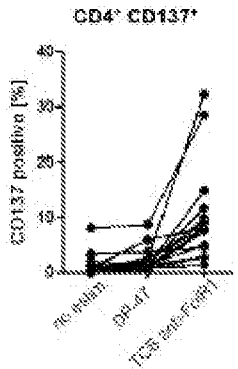


Fig. 25D

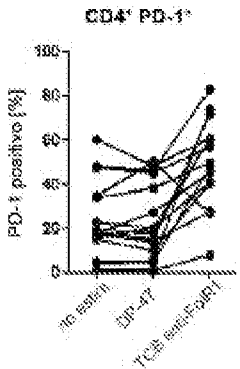
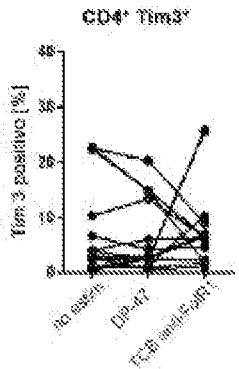
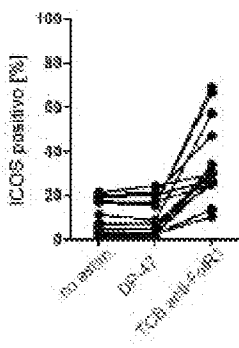


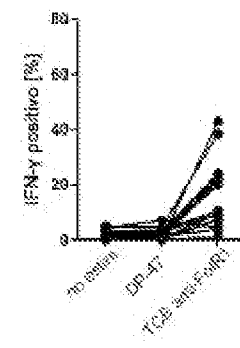
Fig. 25E



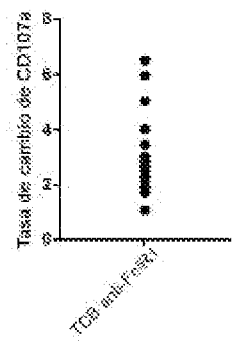
CD4⁺ ICOS⁺



CD4⁺ IFN- γ ⁺



CD4⁺ CD107a



CD4⁺ granzima B

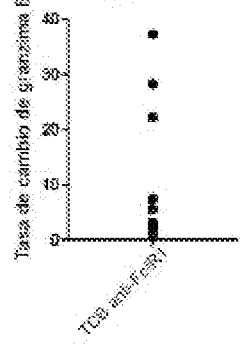


Fig. 25F

Fig. 25G

Fig. 25H

Fig. 25I

Fig. 26A

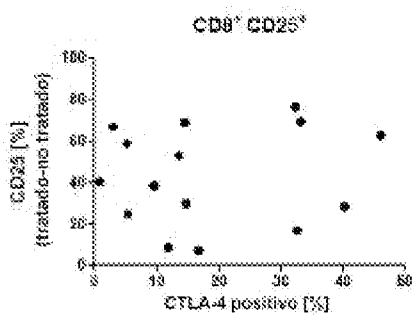


Fig. 26B

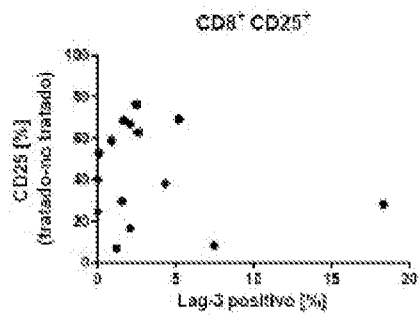


Fig. 26C

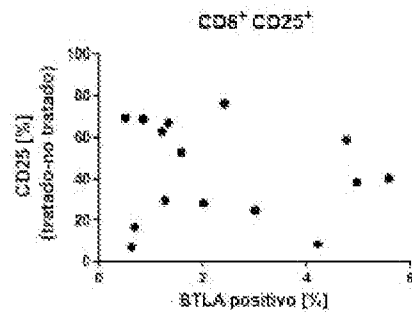


Fig. 27A

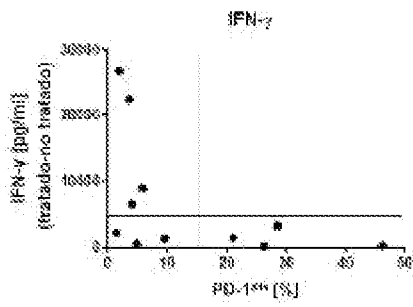


Fig. 27B

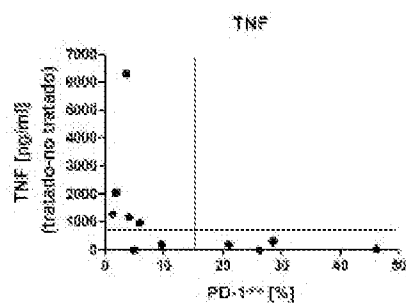


Fig. 27C

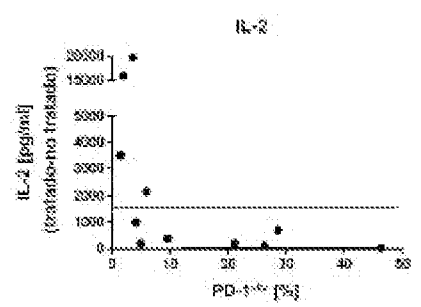


Fig. 28A

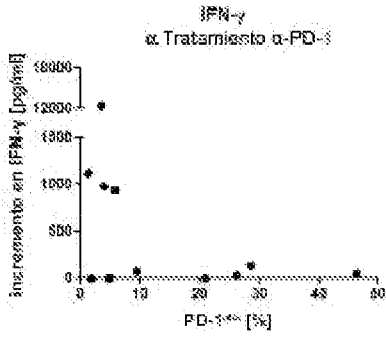


Fig. 28B

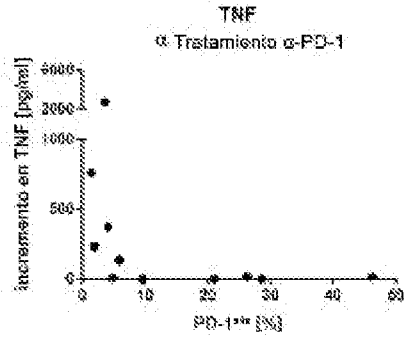


Fig. 28C

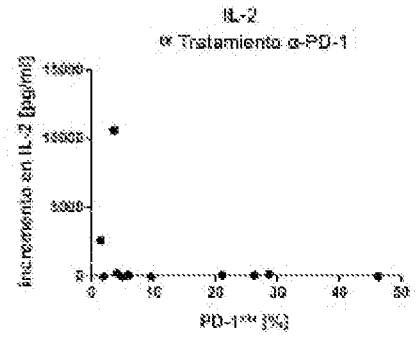


Fig. 28D

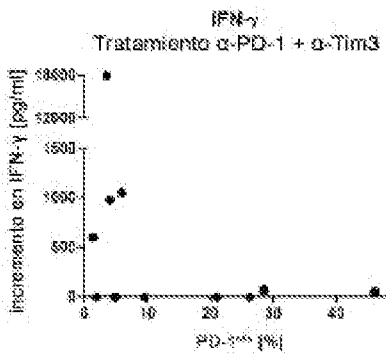


Fig. 28E

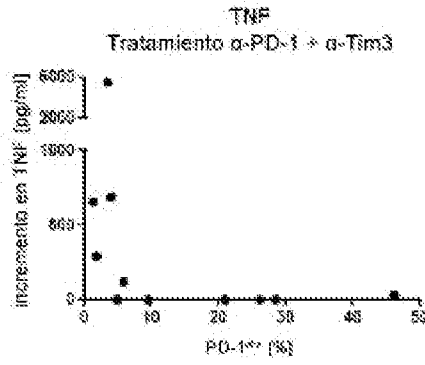


Fig. 28F

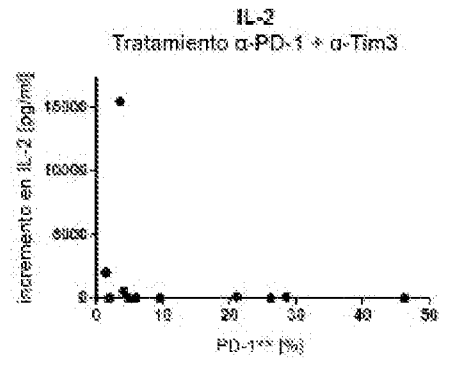


Fig. 29A

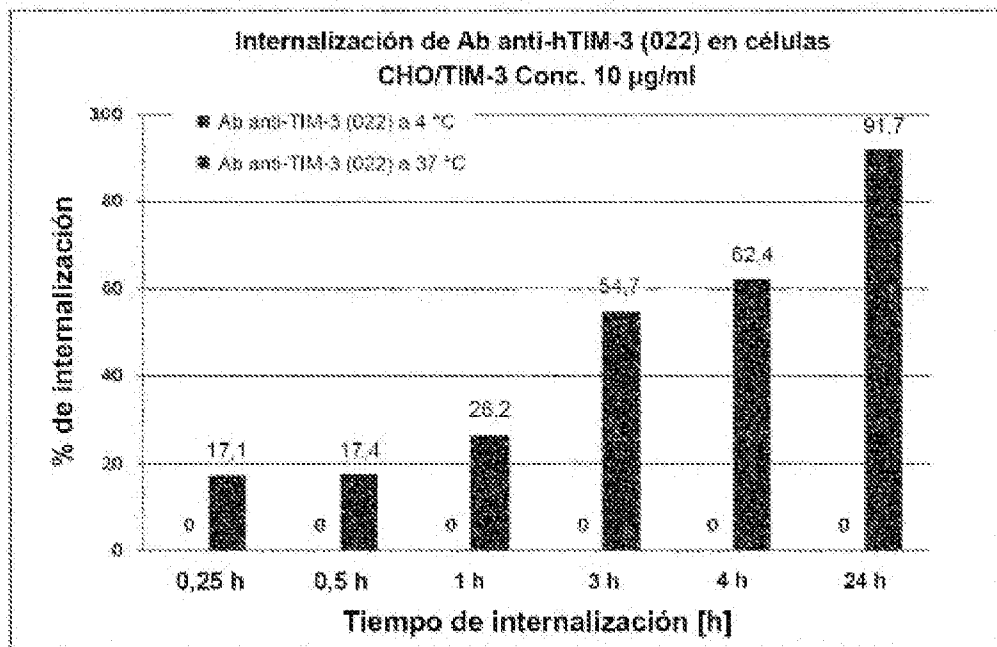


Fig. 29B

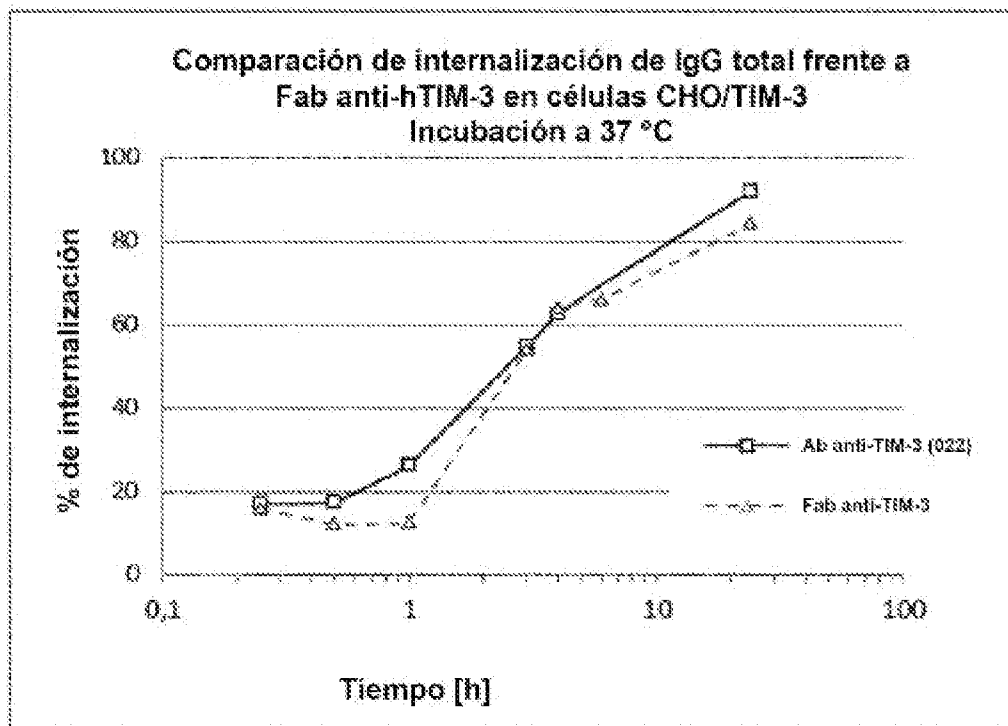


Fig. 30A

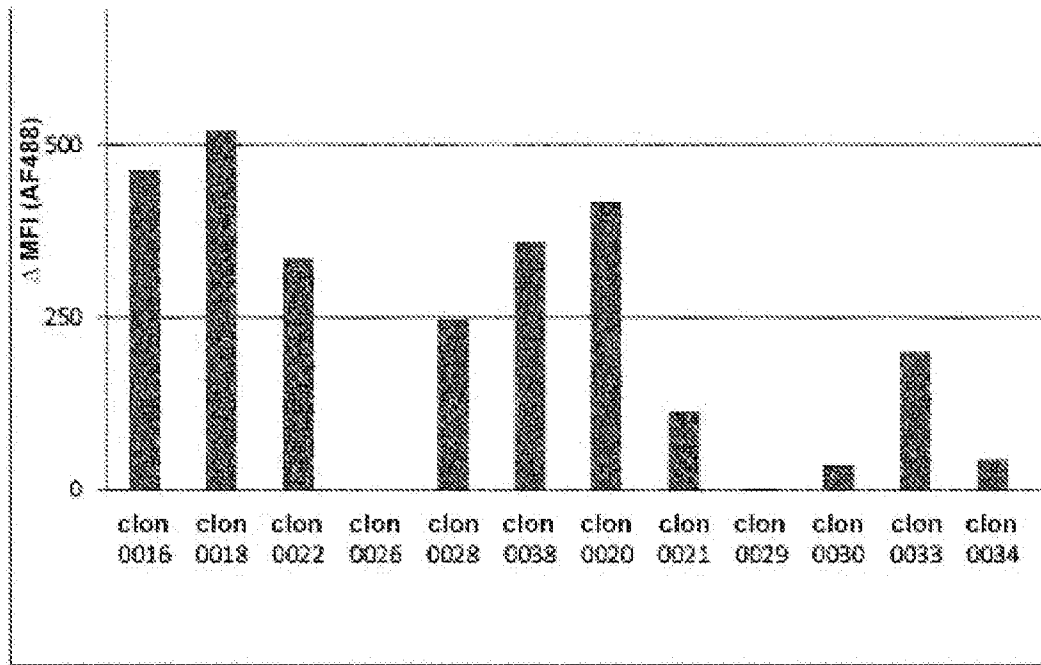


Fig. 30B

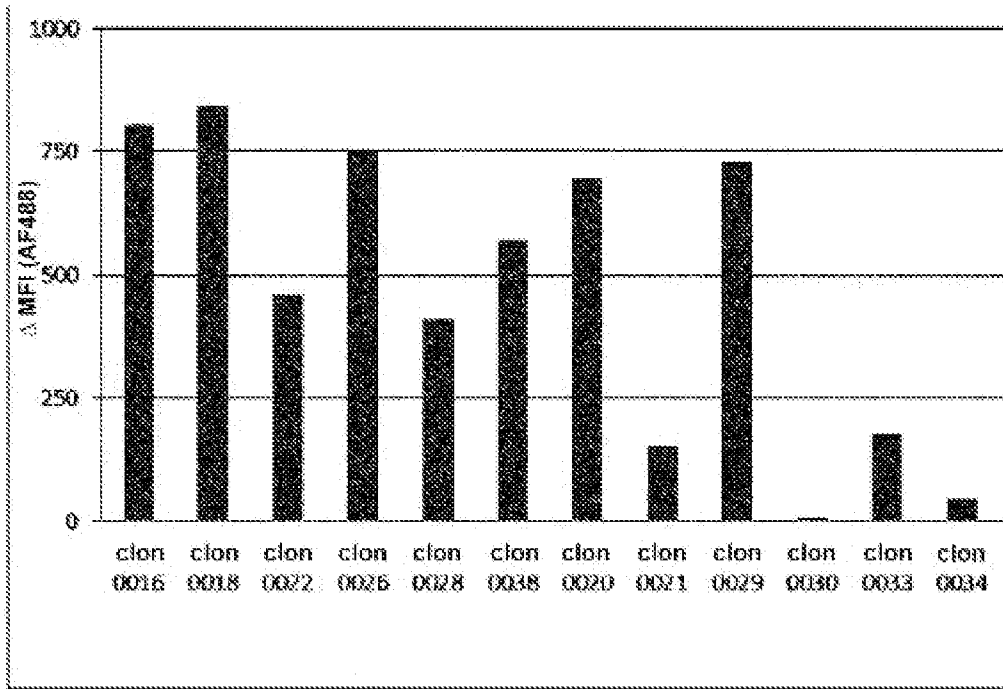


Fig. 31

1) LMA M2-PB0136

4a) LMA-PB0193

3) LMA-PB0135 M0

2) LMA-PB0142

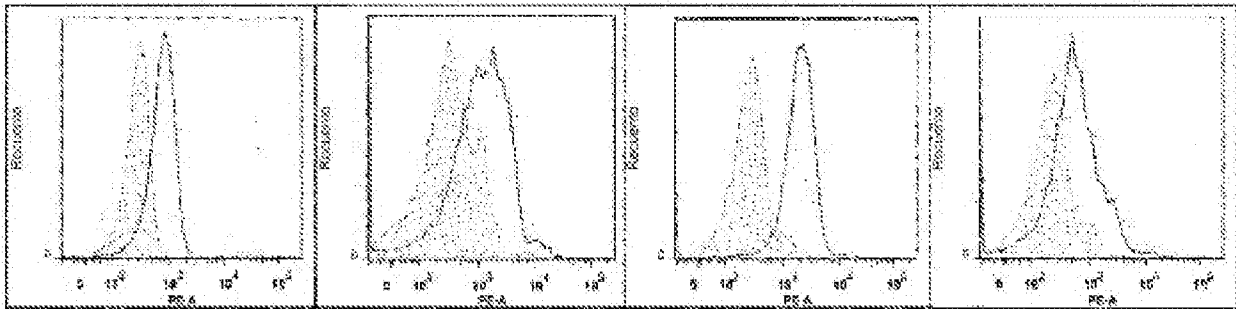


Fig. 32

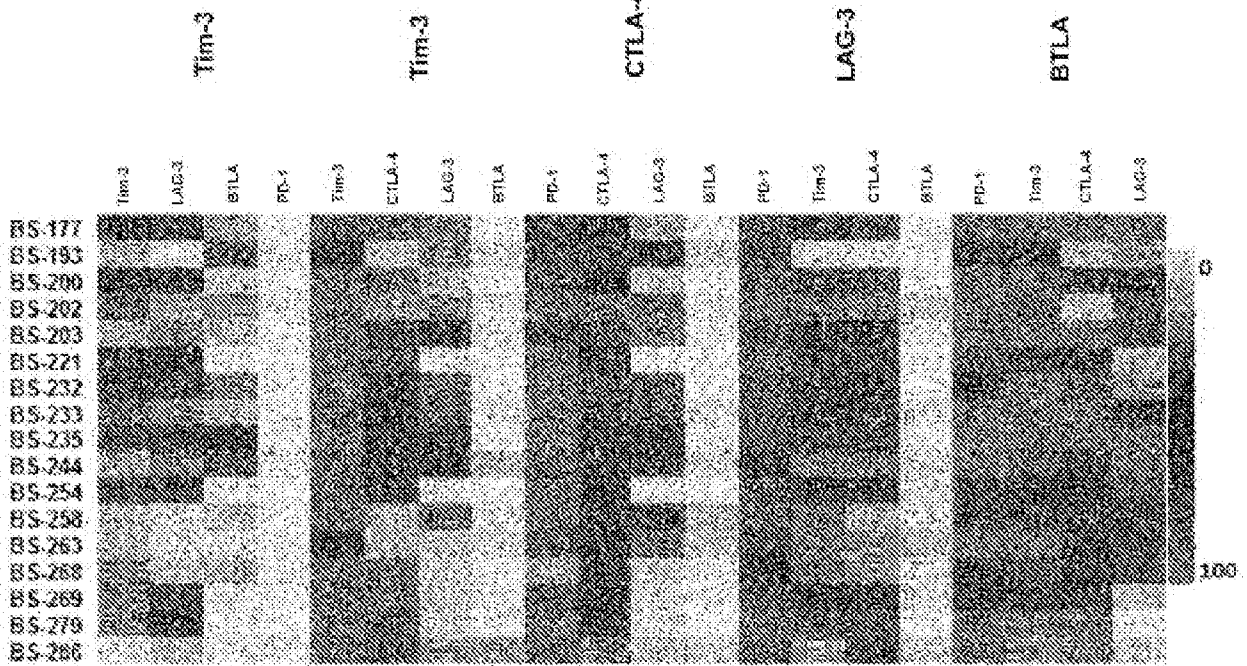


Fig. 33

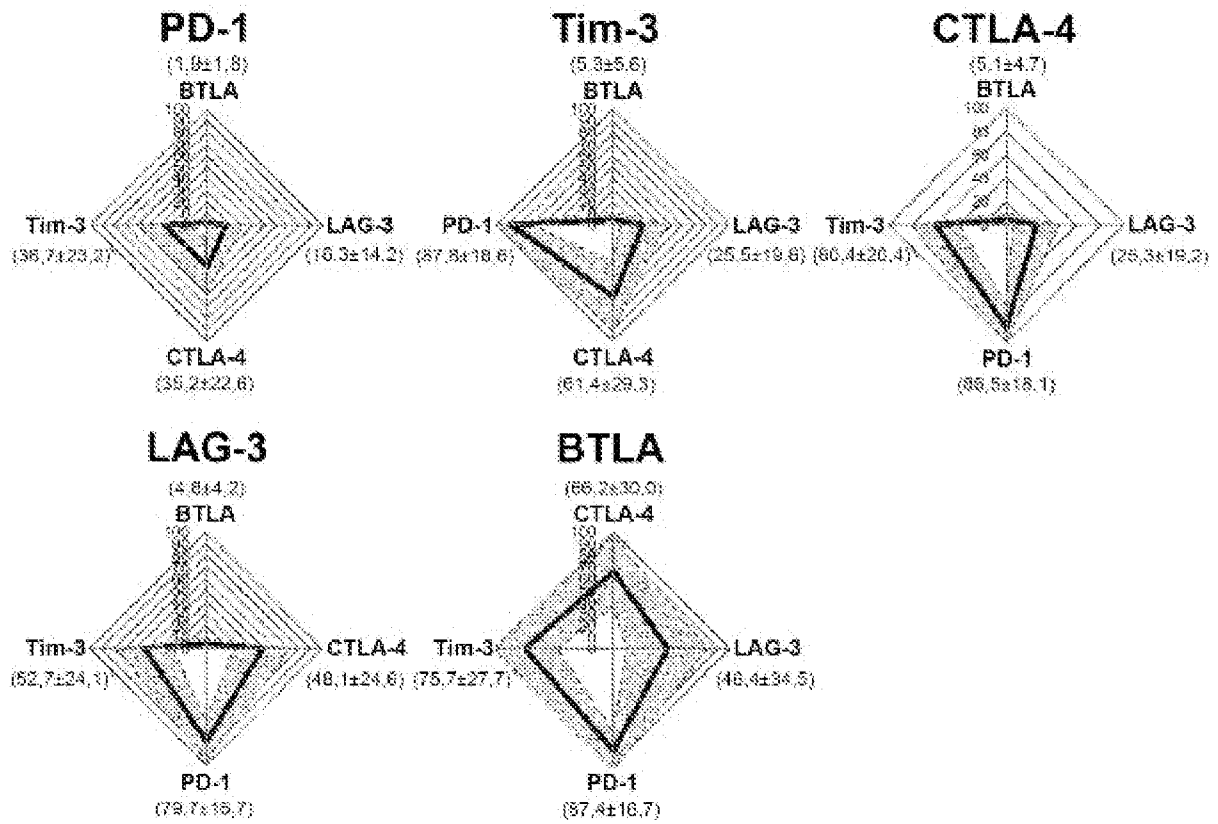


Fig. 34A

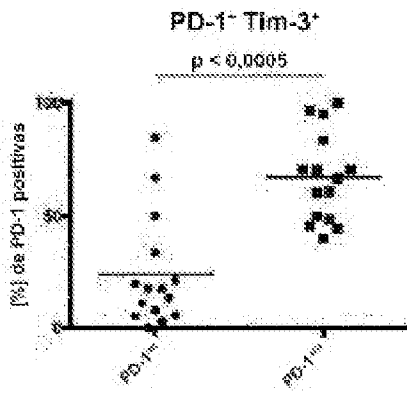


Fig. 34B

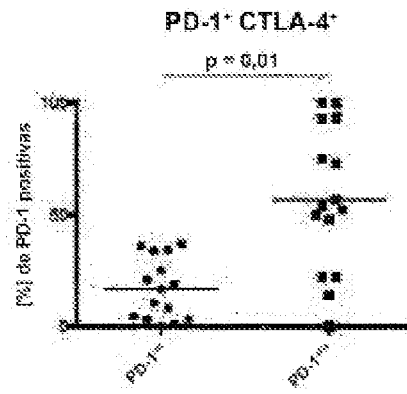


Fig. 34C

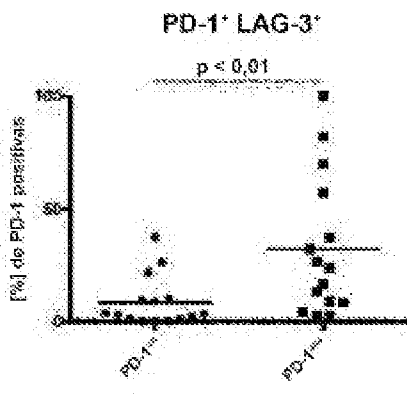


Fig. 34D

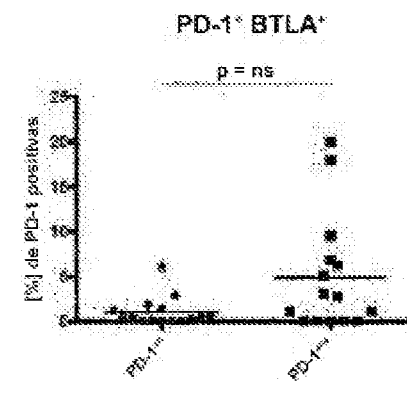


Fig. 35A

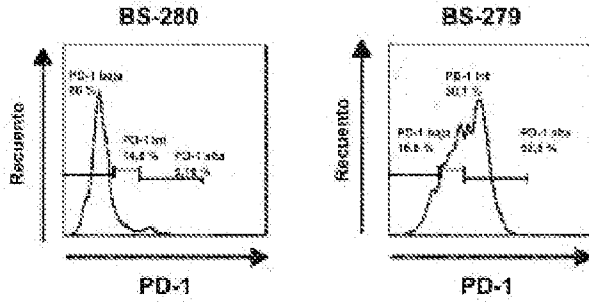


Fig. 35B

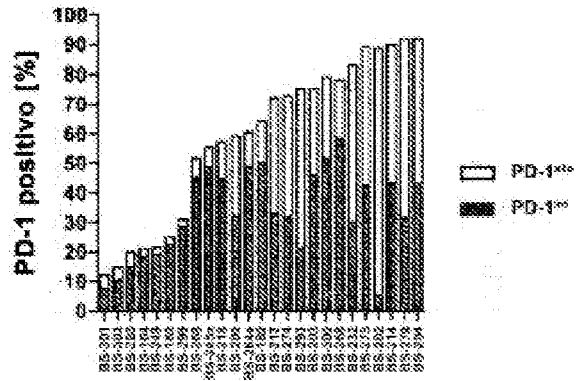


Fig. 35C

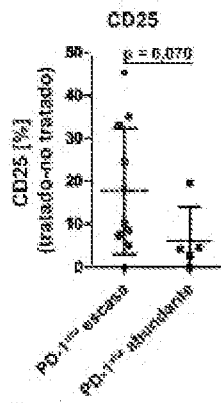


Fig. 35D

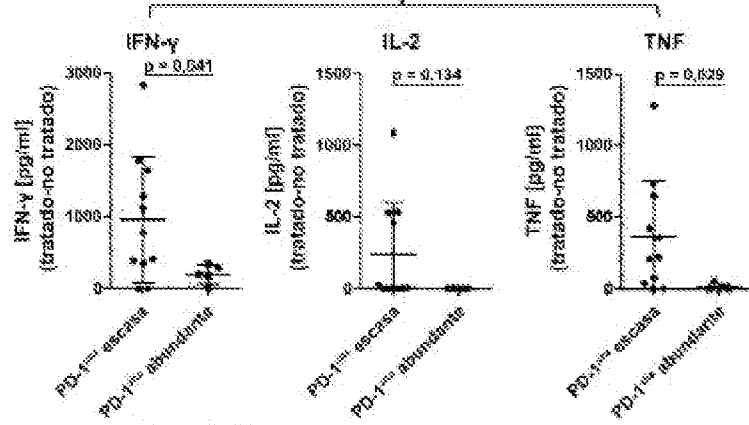


Fig. 35E

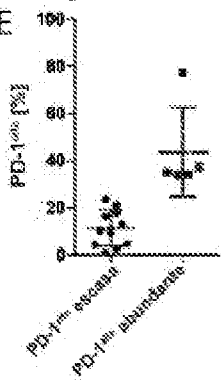


Fig. 35F

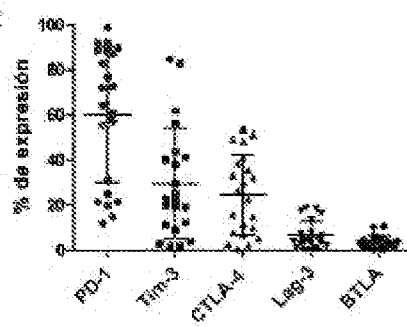


Fig. 36A

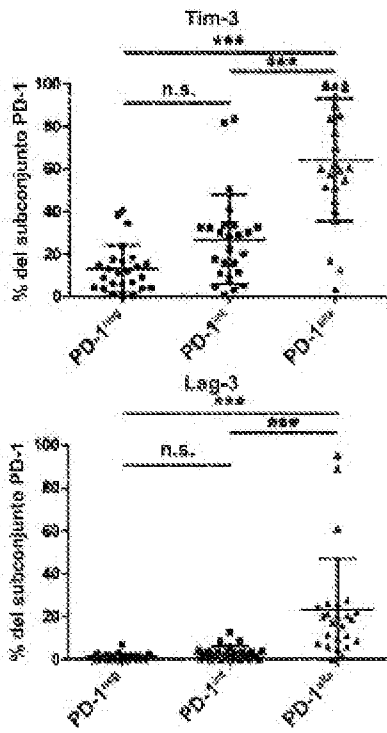


Fig. 36C

Fig. 36B

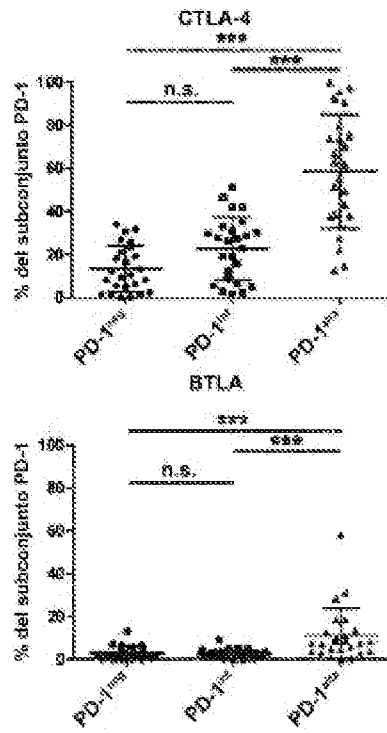


Fig. 36D

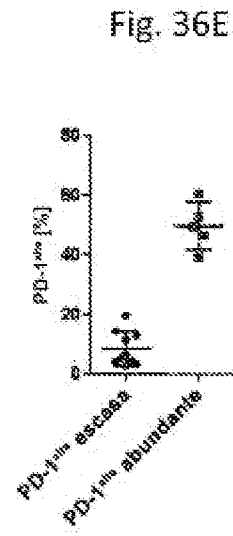


Fig. 36E

Fig. 37A

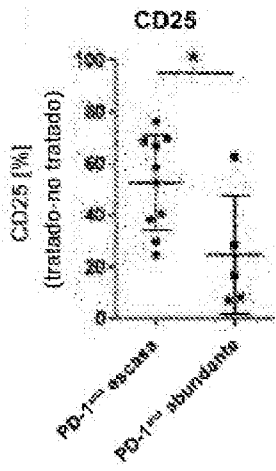


Fig. 37B

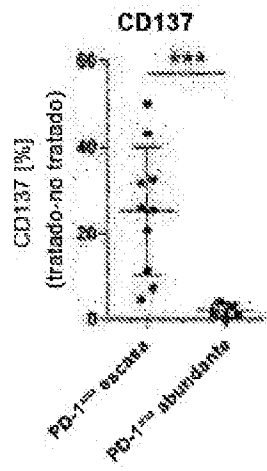


Fig. 37C

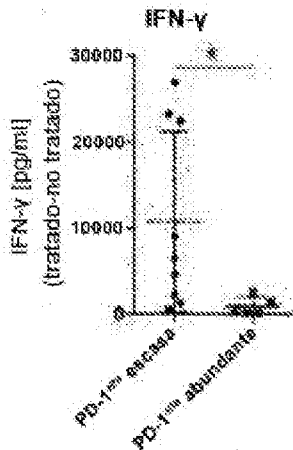
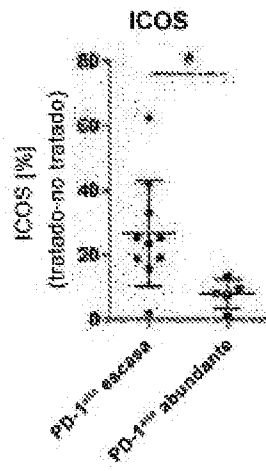


Fig. 37D

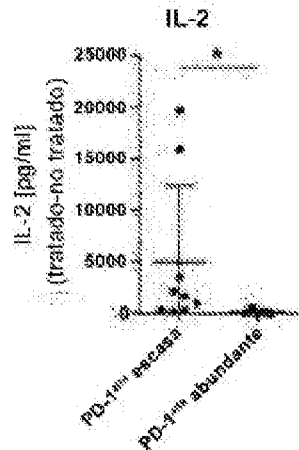


Fig. 37E

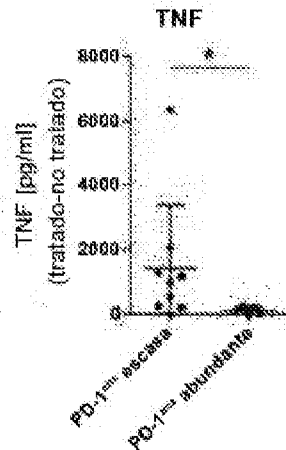


Fig. 37F

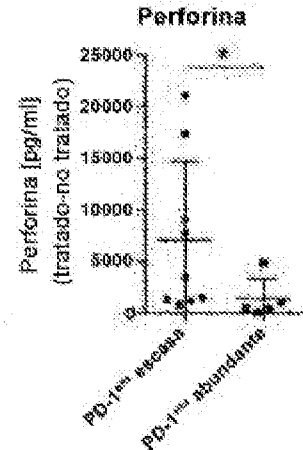


Fig. 37G

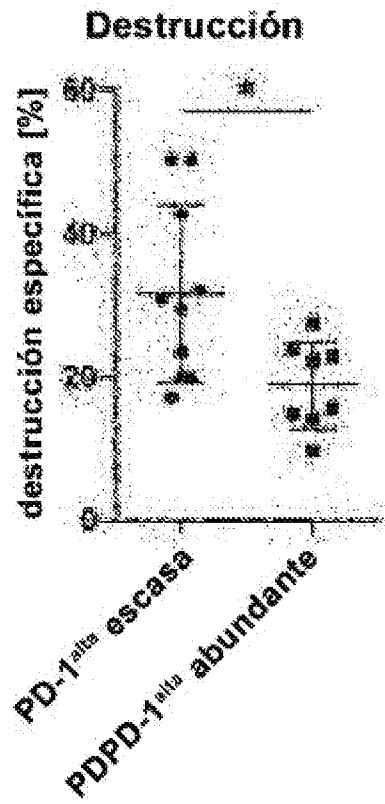


Fig. 37H

Fig. 38A

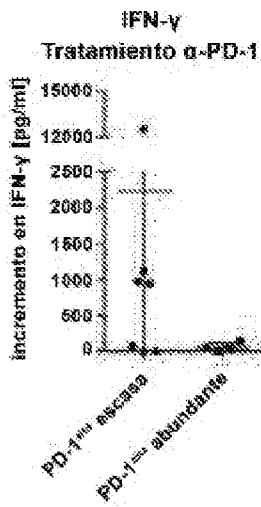


Fig. 38B

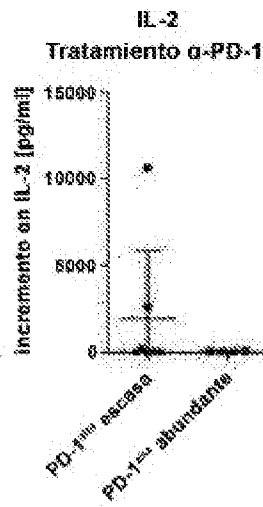


Fig. 38C

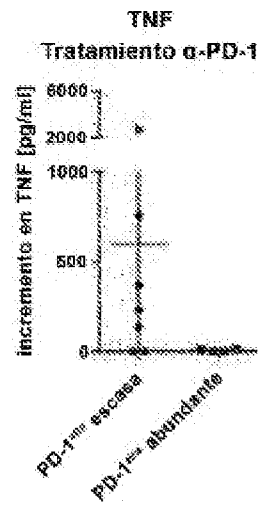


Fig. 38D

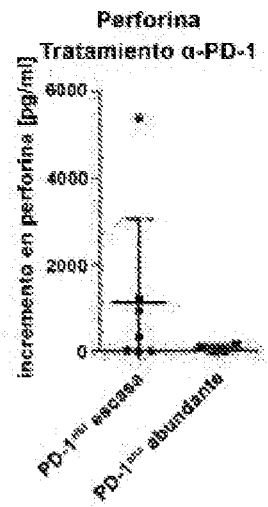


Fig. 38E

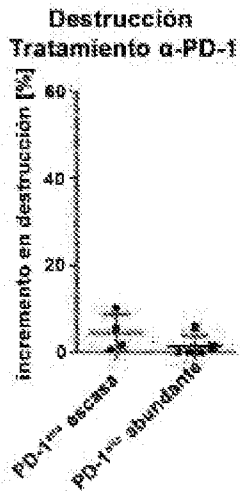


Fig. 39

ID del paciente	Tipo de cáncer	Histopatología	Material	Sexo	Edad [años]	CD3* [%]	CD8* [% de CD3*]	CD4* [% de CD3*]	FoIR1* [%]	FoIR1 [MFI]
BS-160	cáncer de ovario	adenocarcinoma endometrioides	derrame pleural	mujer	56	20,9	12,2	81,8	12,1	14100
BS-164	cáncer de pulmón	carcinoma de células escamosas	derrame pericárdico	varón	71	35,2	33,2	62,3	33,8	1348
BS-189	cáncer de pulmón	adenocarcinoma	tumor resecao	varón	78	14,7	34,1	54,2	4,7	1081
BS-206	cáncer de pulmón	carcinoma de células escamosas	tumor resecao	mujer	76	49,2	31,3	57,6	6,0	-
BS-202	cáncer de pulmón	carcinoma indiferenciado	derrame pleural	varón	71	16,2	56,8	23	0,0	-
BS-203	cáncer de pulmón	adenocarcinoma	derrame pleural	varón	66	16,4	38,3	50,9	0,0	-
BS-212	cáncer de ovario	adenocarcinoma seroso	ascitis	mujer	66	7,98	57,7	53,2	48,7	6131
BS-214	cáncer renal	carcinoma de células claras	tumor resecao	varón	63	45,8	63,6	15,9	18,9	4408
BS-218	cáncer de ovario	adenocarcinoma seroso	tumor resecao	mujer	55	36,3	85,2	39,3	21,3	3927
BS-232	cáncer de pulmón	carcinoma de células escamosas	tumor resecao	varón	71	53,7	54,4	38,1	6,8	555
BS-245a	cáncer de ovario	adenocarcinoma seroso	tumor resecao	mujer	67	16,7	26,8	66,3	20,4	7880
BS-249	cáncer renal	carcinoma de células claras	derrame pleural	mujer	58	9,4	28,1	50,1	0,0	-
BS-254	cáncer de pulmón	adenocarcinoma	tumor resecao	varón	68	62,7	81,3	48,9	6,6	8786
BS-264a	cáncer de ovario	adenocarcinoma seroso	tumor resecao	mujer	53	34,3	43,7	44,2	5,9	2844
BS-268	cáncer de pulmón	adenocarcinoma	tumor resecao	varón	62	30,3	51,1	81,3	0,5	10483
BS-269	cáncer de pulmón	adenocarcinoma	tumor resecao	varón	51	41,6	45,1	46,5	3,2	1136
BS-274	cáncer de pulmón	NOS	tumor resecao	varón	81	40	42,8	47,8	0,0	-
BS-278	cáncer de pulmón	carcinoma de células escamosas	tumor resecao	mujer	64	56,4	48,9	41,7	0,0	-
BS-279	cáncer de pulmón	carcinoma de células grandes	tumor resecao	varón	67	81,3	40,4	50,5	0,3	33,8
BS-280	cáncer de pulmón	adenocarcinoma	derrame pleural	mujer	66	49,2	26,8	76,3	2,9	41,8
BS-293	cáncer de pulmón	carcinoma de células escamosas	tumor resecao	varón	49	87,8	60,6	28,3	0,3	118
BS-299	cáncer de pulmón	adenocarcinoma	derrame pleural	varón	46	38,8	13,8	28	0,0	-
BS-308	cáncer de pulmón	adenocarcinoma	tumor resecao	varón	74	15,5	25,7	69,8	0,4	2943
BS-303	cáncer de ovario	adenocarcinoma seroso	derrame pleural	mujer	73	17,8	14,4	80,7	25,0	1045
BS-303	cáncer de ovario	adenocarcinoma seroso	derrame pleural	mujer	53	22	32,7	61,7	8,6	5485

Fig. 40A

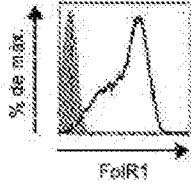


Fig. 40B

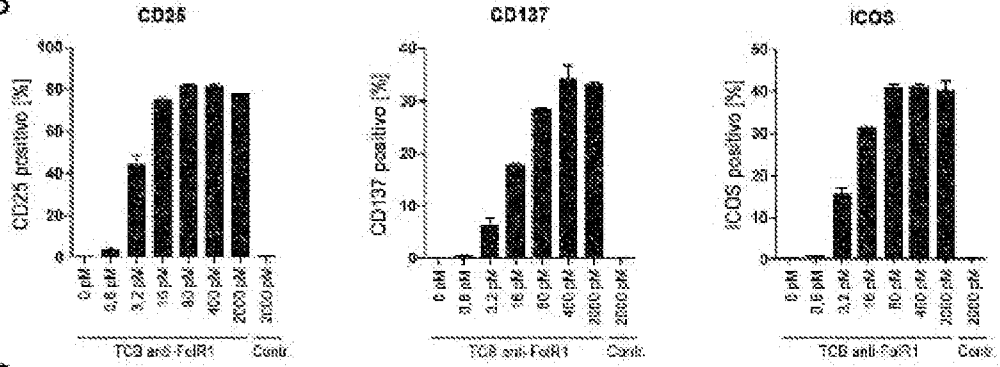


Fig. 40C

