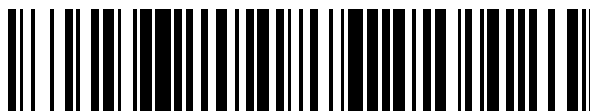


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 075**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2012** **PCT/EP2012/072364**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13092001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2012** **E 12798623 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017** **EP 2794658**

54 Título: **Molécula de anticuerpo biespecífica**

30 Prioridad:

19.12.2011 US 201161577327 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

SYNIMMUNE GMBH (100.0%)
Auf der Morgenstelle 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es:

JUNG, GUNDRAM;
DURBEN, MICHAEL y
GROSSE-HOVEST, LUDGER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 628 075 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

Molécula de anticuerpo biespecífica

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo biespecífica, así como a un método para producirla, a su uso y a una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo biespecífica. En particular, la invención proporciona una molécula de anticuerpo que es capaz de mediar la activación restringida a las células diana de células inmunitarias.

Antecedentes

Los anticuerpos monoclonales contra el complejo de receptor de células T específico de antígeno (TCR)/CD3 pueden activar las células T de forma eficaz. Sin embargo, esta activación requiere que el anticuerpo esté multimerizado - a través de su parte Fc - sobre la superficie de las células que expresan el receptor Fc, que con frecuencia proporcionan también señales auxiliares para la activación de células T (Davis, L., Vida, R. y Lipsky, P.E., Regulation of human T lymphocyte mitogenesis by antibodies to CD3, J. Immunol. [1986] 137: 3758-3767).

De forma similar, los anticuerpos biespecíficos, que reconocen tanto un antígeno presente en células diana (por ejemplo FLT3 o CD19 en células de leucemia, el antígeno CSPG4 en células de melanoma o EGFR en células de glioblastoma) como el complejo de receptor de células T específico de antígeno (TCR)/CD3, pueden activar las células T (Jung, G., Ledbetter, J.A., y Muller-Eberhard, H.J., Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A [1987] 84: 4611-4615; Jung, G., & Eberhard, H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, Immunol.Today [1988] 9: 257-260; Jung, G., Brandl, M., Eisner, W., Fraunberger, P., Reifemberger, G., Schlegel, U., Wiestler, O.D., Reulen, H.J., Wilmanns, W. Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ T-cell activation and therapeutic efficacy, Int J Cancer, [2001] 91: 225-30), y además dirigir las células activadas hacia las células diana (Staerz, U.D., Kanagawa, O., y Bevan, M.J., Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells, Nature [1985] 314: 628-631; Perez, P., Hoffman, R.W., Shaw, S., Bluestone, J.A., y Segal, D.M. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody, Nature [1985] 316: 354-356; Jung, G., Honsik, C.J., Reisfeld, R. A. y Muller-Eberhard, H.J. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 83: 4479-4483, 1986). Como resultado, se produce la lisis de células tumorales mediada por células T. Los anticuerpos agonistas de la molécula coestimuladora de células T, tales como CD28, aumentan la activación de células T mediada por anti-CD3. Estos anticuerpos coestimuladores son particularmente eficaces si además se proporcionan en un formato biespecífico (Grosse-Hovest, L., Hartlapp, J., Marwan, W., Brem, G., Rammensee, H.G., y Jung, G., A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra- agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, Eur.J.Immunol. [2003] 33: 1334-1340). En cualquier caso, se considera un requisito incondicional para las aplicaciones terapéuticas de anticuerpos biespecíficos que tienen especificidad de CD3, que pueda excluirse la unión a receptores Fc (Jung, G., y Eberhard, H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, Immunol.Today [1988] 9: 257-260; Jung, G., Freimann, U., Von Marshall, Z., Reisfeld, R.A., y Wilmanns, W., Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, Eur.J.Immunol. [1991] 21: 2431-2435). Dicha unión a receptores Fc ocasionaría la activación de células T *in vivo*, que tiene lugar, independientemente de la unión a un antígeno diana, en cualquier localización en la que puedan encontrarse células que expresan el receptor Fc, por ejemplo, dentro del sistema reticuloendotelial, linfático y hematopoyético entero. Por experiencia se sabe que dicha activación de células T ocasiona la activación sistémica de células T, acompañada de un síndrome de liberación de citocinas, una temible reacción adversa durante el uso terapéutico de anticuerpos o citocinas activadoras de células T (Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C., Aebersold, P. M., Linehan, W.M., Seipp, C.A., y White, D.E., Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients, Ann.Surg. [1989] 210: 474- 484; Tibben, J.G., Boerman, O.C., Massuger, L.F., Schijf, C.P., Claessens, R.A., y Corstens, H., Pharmacokinetics, biodistribution and biological effects of intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR F(ab')2 in ovarian carcinoma patients, IntJ.Cancer [1996] 66: 477-483; Kroesen, B.J., Buter, J., Sleijfer, D.T., Janssen, R.A., van der Graaf, W.T., The, T.H., de, L.L. y Mulder, N.H., Phase I study of intravenously applied bispecific antibody in renal cell cancer patients receiving subcutaneous interleukin 2, Br.J.Cancer [1994] 70: 652-661). Por lo tanto, en el formateo de anticuerpos de CD3 biespecíficos, es necesario que el objetivo sea evitar una activación sistémica mediada por Fc de las células T y, de este modo, permitir la activación restringida a las células diana, lo cual es exclusivamente dependiente de la unión de la parte diana del anticuerpo biespecífico al antígeno diana correspondiente (Jung, G., y Eberhard, H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, Immunol. Today [1988] 9: 257-260; Jung, G., Freimann, U., Von Marshall, Z., Reisfeld, R.A., and Wilmanns, W. Target cell- induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, Eur. J. Immunol. [1991] 21: 2431-2435). De lo anterior se deduce que, cuando se selecciona el antígeno diana, tiene que tenerse cuidado de que la expresión se restrinja a las células malignas tanto como sea posible. De esta manera, la activación por células no malignas y la liberación asociada de citocinas deben mantenerse tan bajas como sea posible.

Se aplican consideraciones similares si se construyen anticuerpos biespecíficos que contienen anticuerpos efectores agonistas que se unen a receptores desencadenantes presentes en células inmunitarias distintas de las células T, tales como CD16 expresado en células NK. En cualquier caso, debe evitarse la unión mediada por Fc de los anticuerpos a receptores Fc de acuerdo con el razonamiento indicado anteriormente para las células T.

El anticuerpo biespecífico que más ha avanzado en el desarrollo clínico hoy en día es Blinatumomab (Micromet, Inc., Rockville, MD), un anticuerpo monocatenario biespecífico con especificidad CD19xCD3 y una actividad terapéutica excelente contra células de linfoma y leucemia (Bargou, R., et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science* [2008] 321: 974-977; Topp, M.S., et al., Targeted therapy with the T-cell- engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, *J.Clin.Oncol.* [2011] 29: 2493-2498).

Como el formato de una sola cadena no contiene ningún dominio de la parte Fc, este anticuerpo está restringido a las células diana dentro del significado explicado anteriormente, es decir, solo activa las células T en presencia de células diana que expresan CD19 (Brischwein.K., et al., Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class, *J.Immunother.* [2007] 30: 798-807).

Sin embargo, CD19 también se expresa en células B normales de forma que, a pesar de la restricción a las células diana, después de la aplicación terapéutica, se produce una liberación sistémica de citocinas que produce una citotoxicidad significativa ya a dosis diarias de aproximadamente 100 µg (Bargou.R., et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science* [2008] 321: 974-977; Topp, M.S., et al., Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy- refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, *J.Clin.Oncol.* [2011] 29: 2493-2498).

Además, el formato de una sola cadena tiene los siguientes inconvenientes: (i) el peso molecular de aproximadamente 50 kDa es relativamente bajo y está asociado con una corta semivida en suero, (ii) los anticuerpos de este formato se agregan fácilmente y (iii) son difíciles de producir en procesos de fermentación convencionales (Grosse-Hovest.L., Hartlapp,I., Marwan.W., Brem.G., Rammensee.H.G., y Jung.G., A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, *Eur.J.Immunol.* [2003] 33: 1334-1340; Grosse-Hovest.L., et al., Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* [2004] 101: 6858-6863).

El documento WO 2011/047180 desvela agentes de unión biespecíficos que se dirigen específicamente tanto a IGF-1 como a las vías de señalización intracelular de ErbB. El documento WO 2009/018386 desvela proteínas de unión a epítopo multiespecíficas, métodos de fabricación y usos de las mismas en la prevención, tratamiento o diagnóstico de enfermedades agudas o crónicas. El documento WO 2007/109254 desvela moléculas de unión estabilizadas que consisten en o comprenden un scFv estabilizado y métodos para fabricar dichas moléculas estabilizadas. El documento WO 2011/025964 desvela proteínas de unión a DLL4, incluyendo anticuerpos, anticuerpos con injertos de CDR, anticuerpos humanos y fragmentos de unión a DLL4 de los mismos, proteínas que se unen a DLL4 con alta afinidad y proteínas de unión a DLL4 que neutralizan la actividad de DLL4. El documento WO 2006/031994 desvela el diseño y la producción de dominios Fc de inmunoglobulinas incluyendo variantes para estabilizar sus formas monoméricas. Lu et al., 2002, *Journal of Immunological Methods*, 267(2): 213-226 desvela proteínas de fusión Fab-scFv.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar una molécula de anticuerpo biespecífica que solucione al menos una de las dificultades anteriores y que pueda usarse generalmente en terapia, entre otras cosas, para la activación de células inmunitarias restringida estrictamente a las células diana, como se ha descrito anteriormente.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo biespecífica recombinante que consiste en un fragmento Fab que comprende un primer sitio de unión para un primer antígeno, un fragmento Fv monocatenario que comprende un segundo sitio de unión para un segundo antígeno y un dominio CH2 de inmunoglobulina, donde el fragmento Fab comprende además la región de bisagra, donde el fragmento Fab y el fragmento Fv monocatenario están unidos a través del dominio CH2, donde al menos un resto de aminoácido del dominio CH2 que puede mediar la unión a receptores Fc está ausente o mutado, y donde, además, los restos de aminoácido de las posiciones 226 y 229 de la secuencia (numeración de posiciones de la secuencia de acuerdo con el índice EU), están ausentes o mutados, donde dicho al menos un resto de aminoácido de la región de bisagra o del dominio CH2 que puede mediar la unión a receptores Fc está ausente o mutado, se selecciona del grupo que consiste en las posiciones de secuencia 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 297, 327 y 330 (numeración de posiciones de la secuencia de acuerdo con el índice EU).

La divulgación proporciona una molécula de anticuerpo tetramérica. La molécula de anticuerpo tetramérica incluye

un dímero de la molécula de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto. El dímero generalmente se define por un enlace entre restos de cisteína de dos moléculas de anticuerpo del primer aspecto, particularmente entre cisteínas en la región de bisagra. Dichos restos de cisteína típicamente son aminoácidos conservados (C226 y C229 en inmunoglobulinas IgG humanas).

La divulgación proporciona una molécula de anticuerpo biespecífica recombinante. La molécula de anticuerpo biespecífica recombinante incluye un fragmento Fab que incluye un primer sitio de unión para un primer antígeno, un fragmento Fv monocatenario que incluye un segundo sitio de unión para un segundo antígeno, un dominio CH2 de inmunoglobulina y un dominio CH3 de inmunoglobulina. El fragmento Fab y el fragmento Fv monocatenario están unidos a través del dominio CH2/dominio CH3. Al menos un resto de aminoácido del dominio CH2 que puede mediar la unión a los receptores Fc está ausente o mutado. Típicamente, está cambiado al menos uno de los restos de cisteína que forman enlaces disulfuro intercatenarios (C226 y C229 en anticuerpos IgG humanos). Algunas de estas moléculas pueden contener modificaciones adicionales en la región CH3 que impiden la dimerización con dominios CH3 homotípicos.

La divulgación proporciona una molécula de anticuerpo tetramérica. La molécula de anticuerpo tetramérica consiste en un dímero de la molécula de anticuerpo biespecífica recombinante de acuerdo con el tercer aspecto. El dímero generalmente se define por un enlace entre cisteínas conservadas en la región de bisagra (C226 y C229 en anticuerpos IgG humanos).

La divulgación proporciona una molécula de anticuerpo biespecífica recombinante adicional. Esta molécula de anticuerpo incluye un fragmento Fab que incluye un primer sitio de unión para un primer antígeno, un fragmento Fv monocatenario que incluye un segundo sitio de unión para un segundo antígeno, un dominio CH2 de inmunoglobulina y un dominio CH3 de inmunoglobulina. El fragmento Fab y el fragmento Fv monocatenario están unidos entre sí a través del dominio CH2 y el dominio CH3. Al menos un resto de cisteína de esta molécula de anticuerpo que es capaz de formar un puente disulfuro para la dimerización está ausente o mutado.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico codifica una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención.

La invención proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención.

La divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad. El método incluye el uso de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la divulgación. En general, la molécula de anticuerpo se administra a un paciente que lo necesita.

La invención proporciona una célula hospedadora que incluye una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

La invención proporciona un método para producir una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención. El método incluye expresar un ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo en condiciones que permitan la expresión de la molécula de ácido nucleico.

La invención se entenderá mucho mejor en vista de la siguiente descripción, dibujos y ejemplos no limitantes.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa esquemáticamente moléculas de anticuerpo biespecíficas de acuerdo con la invención y/o la divulgación.

La **Figura 1A** representa una molécula bivalente con un fragmento Fab, un dominio CH2 y un fragmento Fv monocatenario. La molécula de anticuerpo tiene una cadena principal en la que el dominio CH2 está acoplado a través de su extremo N a los dominios CH1 y VH de cadena pesada de un fragmento Fab y a través de su extremo C a un fragmento Fv monocatenario (formato bsFc-1/2).

La **Figura 1B** representa una molécula de anticuerpo bivalente con una cadena principal en la que el dominio CH2 está unido a la cadena ligera de un fragmento Fab, es decir, en la que la cadena principal incluye un dominio VL y un dominio CL, una región de bisagra, un dominio CH2 y un fragmento Fv monocatenario.

La **Figura 1C** muestra una molécula de anticuerpo bivalente en la que la cadena principal incluye una VL y un dominio CH1, una región de bisagra, un dominio CH2 y un fragmento Fv monocatenario. Una segunda cadena de menor peso incluye una VH y un dominio CL. En la molécula de anticuerpo de la Figura 1C, el fragmento Fab, por lo tanto, no es un fragmento Fab «clásico (natural)» en el que el dominio variable de la cadena ligera y la cadena pesada están fusionados a su dominio constante respectivo (CL o CH1, respectivamente), sino un fragmento Fab "híbrido" en el que el dominio variable está fusionado al dominio constante de la cadena «opuesta», es decir, el

dominio VH está fusionado al dominio CL y el dominio VL está fusionado al dominio CH1.

LaFigura 1D representa una molécula de anticuerpo bivalente con una cadena principal en la que el dominio CH2 está unido a un dominio CL y un dominio VH. Una segunda cadena de peso inferior incluye un dominio VL y un dominio CH1. La molécula de anticuerpo de la Figura 1D, por lo tanto, incluye un "fragmento Fab híbrido" (que incluye el primer sitio de unión) que también está presente en la molécula de la Figura 1C.

LaFigura 1E representa una molécula de anticuerpo bivalente con una construcción igual a la de la Figura 1A, en la que se han modificado aminoácidos del dominio CH2 y/o la región de bisagra (indicados por "X" como se representa en la Figura 1O, formato bsFc^{ko}-1/2). De forma similar, dichas modificaciones pueden insertarse en las moléculas representadas en 1B-1D. En las moléculas representadas en las Figuras 1A-1E, los restos de cisteína que forman enlaces disulfuro intercatenarios (C226 y C229 en anticuerpos IgG humanos) se han cambiado para impedir la formación de dímeros (●).

LaFigura 1F representa una molécula tetravalente ilustrativa que es un dímero de la unidad representada en la Figura 1A. Dicha molécula también puede construirse en las configuraciones de Fab representadas en las Figuras 1B-1D con y sin las modificaciones de Fc representadas en la Figura 1E. Estas modificaciones se presentan en la Figura 1P.

LaFigura 1G representa una molécula tetravalente ilustrativa, que es un dímero de una unidad que incluye un fragmento Fab, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario. Se han modificado aminoácidos (X) en el dominio CH2 y en la región de bisagra; resumido en la Figura 1P. Las dos cadenas principales del anticuerpo incluyen un dominio VH y un dominio CH1, una región de bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario (formato bsFc^{ko}-1). También pueden construirse moléculas similares en las configuraciones Fab representadas en las Figuras 1A-1E. En todas estas moléculas, los dímeros se definen por medio de cisteínas conservadas en la región de bisagra (C226 y C229 en anticuerpos IgG humanos).

LaFigura 1H representa una molécula tetravalente, que es un dímero de una unidad que incluye con un fragmento Fab, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario. Dentro del fragmento Fab, las dos cadenas principales del anticuerpo incluyen un dominio VH y un dominio CL.

LaFigura 1I muestra un anticuerpo tetravalente con un construcción general igual a la representada en la Figura 1G. A diferencia de la molécula de la Figura 1G, solo una de las dos cadenas principales de este anticuerpo incluye aminoácidos del dominio CH2 y la región de bisagra que se han modificado (indicados por "X").

LaFigura 1J representa una molécula tetravalente en la que las dos cadenas principales incluyen un dominio VL y un dominio CL, una región de bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario.

LaFigura 1K representa una molécula tetravalente con dos fragmentos Fab estructuralmente diferentes. La primera cadena principal del anticuerpo incluye un dominio VL y un dominio CL, una región de bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario. La segunda cadena principal del anticuerpo incluye un dominio VH y un dominio CH1, una región de bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario.

LaFigura 1L representa una molécula tetravalente, que es un dímero de una unidad que incluye un fragmento Fab, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario. Dentro del fragmento Fab, las dos cadenas principales del anticuerpo incluyen un dominio VL y un dominio CH1.

LaFigura 1M representa una molécula tetravalente adicional con dos fragmentos Fab estructuralmente diferentes. Las primera cadena principal del anticuerpo incluye un dominio VL y un dominio CH1, una región de bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario. La segunda cadena principal del anticuerpo incluye un dominio VH y un dominio CL, una región de bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y un fragmento Fv monocaténario.

LaFigura 1N representa una molécula bivalente con un fragmento Fab, un dominio CH2 y CH3 y un fragmento Fv monocaténario. La molécula de anticuerpo tiene una cadena principal en la que el dominio CH2 está acoplado, a través de su extremo N, a los dominios VH y CH1 de cadena pesada de un fragmento Fab y, a través de su extremo, C a un dominio CH3 que está acoplado a través de su extremo C a un fragmento Fv monocaténario. Dicha molécula también puede construirse en las configuraciones de Fab representadas en las Figuras 1A-1D y puede contener modificaciones de Fc en la región de bisagra y de CH2 ("X") como se representa en las Figuras 1E y 1O. Además, pueden contener modificaciones en el dominio CH3 que impiden la dimerización de este dominio y pueden influir en la unión al receptor Fc neonatal (FcRn). Los ejemplos de restos que están implicados en la dimerización y, por lo tanto, pueden modificarse por delección o mutación incluyen T366, L368, F405, Y407 y K409 (véase Dall'Aqua et al. "Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers" *Biochemistry* (1998) Volumen: 37, Número: 26, Páginas: 9266-9273. Otros restos de contacto en la interfaz del dominio CH3 que pueden modificarse incluyen Q347, Y349, T350, L351, L368, K370, K392, T394, P395, V397, L398, D399, F405, Y407 y K409. Véase S.Miller *Protein-Protein Recognition and the Association of Immunoglobulin Constant Domains*.

J.Mol.Biol. (1990) Volumen 216 págs. 965-973, y J. Deisenhofer Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution. Biochemistry (1981) Volumen 20 págs. 2361-2370 y, por lo que respecta a la unión del receptor Fc neonatal, por ejemplo, los siguientes restos de aminoácido del dominio CH2: T250, M252, S254, T256, T307 H310 y del dominio CH3: E380 M428, H433, N434, H435 (véase la revisión de Roopenian y Akilesh; FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nature Reviews Immunology (2007) Volumen 7 págs.:715-725. En todas estas moléculas, los restos de cisteína que forman enlaces disulfuro intercatenarios (C226 y C229 en anticuerpos IgG humanos) se han cambiado para impedir la formación de dímeros (●).

Otras moléculas ilustrativas no representadas en la Figura 1A-1N incluyen moléculas en la que, con respecto a las moléculas representadas, la parte de Fv monocatenaria del extremo C puede estar en una orientación VL-VH en lugar de en la orientación representada VH-VL, lo que significa que el dominio VL está fusionado al dominio constante respectivo.

La Figura 10 presenta modificaciones ilustrativas que pueden introducirse en las variantes de anticuerpo bivalente representadas en las Figuras 1A-D y en la Figura 1N para obtener derivados con deficiencias en Fc como se ejemplifica en la Figura 1E. Las modificaciones son idénticas a las mostradas en la Figura 1P con la excepción de las cisteínas conservadas (C226 y C229 en anticuerpos IgG humanos). La numeración de aminoácidos está de acuerdo con la numeración de Kabat [Índice EU], wt = secuencia de tipo silvestre de IgG1 humana; $\Delta 1$ = knock-out; Glycan = $\Delta 1$ -knock-out con delección de restos de sacárido $\cong 297$; $\Delta 2$ -5 variantes knock-out adicionales en continuación de $\Delta 1$; - = el aminoácido se ha delecionado.

La Figura 1P indica modificaciones ilustrativas que pueden usarse para obtener una molécula tetravalente como se representa en las Figuras 1F-M. La numeración de aminoácidos está de acuerdo con la numeración de Kabat [Índice EU], wt = secuencia de tipo silvestre de IgG1 humana; $\Delta 1$ = knock-out; Glycan = $\Delta 1$ -knock-out con delección de restos de sacárido $\cong 297$; $\Delta 2$ -5 variantes knock-out adicionales en continuación de $\Delta 1$; - = el aminoácido se ha delecionado.

Las Figuras 2A a 2C representan una imagen esquemática del procedimiento de clonación para la generación de una cadena pesada optimizada (cadena principal) para los anticuerpos representados en la Figura 1, como anticuerpos biespecíficos bivalentes o tetravalentes con partes Fc atenuadas para ADCC modificadas.

i) Se representa el vector original, basado en el esqueleto plasmídico de pcDNA3 (Invitrogen; el promotor de CMV y la señal de terminación de la hormona de crecimiento bovina están delecionados). Este plásmido contiene la cadena pesada de Ig de isotipo $\gamma 1$ humana con elementos reguladores del locus de cadena pesada de inmunoglobulina.

ii) Se indica el intercambio de un elemento VDJ (dominio variable de la cadena pesada) o VJ (dominio variable de la cadena ligera) a través del sitio de endonucleasas de restricción AatII y ClaI.

iii) se muestra el intercambio simple (a través de los sitios de restricción MluI y SpeI) de la cadena pesada de Ig de isotipo $\gamma 1$ humana completa contra la secuencia codificante de un fragmento scFv, un elemento de ADN con CH3 delecionado y la región de bisagra y CH2 modificados que da como resultado una cadena pesada de anticuerpo biespecífico bivalente. Para ciertas variantes de anticuerpos, por ejemplo, las representadas en la Figura 1D, el dominio CH1 puede reemplazarse por un dominio CL.

iv) El intercambio del fragmento CH1-H-CH2 modificado (a través de los sitios de restricción MluI y BspEI) contra un elemento CH1-H-CH2-CH3 con la región de bisagra y CH2 modificados da como resultado una cadena pesada de anticuerpo biespecífico tetravalente o como la mostrada en v). Si además, o solo las cisteínas en la posición C226 y C229 están intercambiadas, las moléculas resultantes son moléculas de anticuerpo biespecíficas bivalentes como las representadas en la Figura 1N.

v) Intercambio del fragmento scFv (a través de los sitios de restricción BspEI y SpeI) contra un fragmento scFv de cualquier otra especificidad de antígeno o de una orientación de VH y VL diferente. Las sustituciones iv) y v) pueden combinarse.

En **las Figuras 2B y 2C**) las regiones adyacentes a los elementos scFv y VDJ - CH1 insertados, respectivamente, se muestran con detalle.

Las Figuras 2D-F muestra una representación esquemática del procedimiento de clonación para la generación de la cadena ligera de anticuerpos mono-específicos humanos.

i) El vector parental, basado en el esqueleto plasmídico de pCR-Script (Stratagene; el promotor de lacZ y la señal de terminación están delecionadas) contiene la región VJ y la región C del gen κ humano, así como elementos reguladores del locus de cadena ligera de inmunoglobulina.

ii) Intercambio de un elemento VJ (dominio variable de la cadena ligera) o VDJ (dominio variable de la cadena pesada) a través de las endonucleasas de restricción XhoI y SpeI.

iii) Intercambio del elemento CL (cadena ligera constante) a través de las endonucleasas de restricción PmlI y BsmBI.

En **las Figuras 2E y 2F** se muestran con detalle las regiones adyacentes a los elementos VJ y CL insertados.

Los recuadros representan exones, los círculos elementos potenciadores y las líneas finas regiones UT y secuencias de intrones. L₁ y L₂, secuencias líder codificadas por dos exones diferentes (también mostrado en la Figura 2B y 2E); V, regiones variables; D, región de diversidad; J, regiones de unión; CH1, CH2, CH3, CL exones de cadenas pesada y ligera constantes respectivamente, H, región de bisagra, scFv fragmento Fv monocatenario; X = modificaciones de aminoácidos. NotI, AatII, ClaI, MluI, BspEI, SpeI, XhoI, KpnI, XhoI, SpeI, PmlI, BsmBI, Sall, endonucleasas de restricción usadas para la clonación; Amp^R y Neo^R representan las regiones codificantes para resistencia a Ampicilina y Neomicina respectivamente.

Los sitios de escisión para los péptidos señal de secreción se indican por |; y los límites de exón-intrón por [,].

La Figura 3A ilustra la activación de células T restringida a células diana (incorporación de ³H-timidina) por dos anticuerpos biespecíficos de diferente formato de acuerdo con la invención y/o divulgación, que tienen especificidad FLT3 x CD3. Los anticuerpos se usan en células que no incluyen (símbolos vacíos) y que incluyen (símbolos rellenos) células REH positivas para FLT3/CD19. ○, ●: molécula de anticuerpo bivalente como se representa en la Figura 1A con la secuencia "Glycan" como se representa en las Figuras 1E y en la Figura 1O (formato bsFc^{ko}-1/2). Fragmento Fab con sitio de unión a FLT3, fragmento scFv con sitio de unión a CD3. □, ■: molécula de anticuerpo tetravalente como se representa en la Figura 1G con la secuencia Δ1 como se representa en la Figura 1P, (formato bsFc^{ko}-1). Fragmento Fab₂ con sitio de unión a FLT3, fragmento scFv con sitio de unión a CD3. *: anticuerpo anti-CD3 monoespecífico intacto sin células diana. En ausencia de células diana, los anticuerpos de CD3 monoespecíficos intactos activan de forma eficaz las células T de una manera dependiente de Fc/FcR mientras que los anticuerpos biespecíficos son ineficaces. Esto demuestra que el formato biespecífico de la invención carece de la unión Fc/FcR casi completamente. **La Figura 3B** ilustra la activación de células T restringida a células diana (liberación de TNF) por diferentes anticuerpos biespecíficos bivalentes de acuerdo con la invención y/o divulgación, usada en células que no incluyen (símbolos vacíos) y que incluyen (símbolos rellenos) células REH positivas para FLT3/CD19. ○, ●: molécula de anticuerpo bivalente como se representa en la Figura 1A con la secuencia "Glycan" como se representa en la Figura 1E y Figura 1O, fragmento Fab con sitio de unión a FLT3, fragmento scFv con sitio de unión a CD3; ◇, ◆: molécula de anticuerpo bivalente como se representa en 1E con la secuencia "Glycan" como se representa en la Figura 1O, fragmento Fab con sitio de unión a CD19, fragmento scFv con sitio de unión a TCR; ▽, ▼: molécula de anticuerpo bivalente como se representa en la Figura 1E con la secuencia "Glycan" como se representa en la Figura 1O, fragmento Fab con sitio de unión a CSPG4, fragmento scFv con sitio de unión a CD3. El proteoglicano de Condroitinsulfato CSPG4 es un antígeno diana de células de melanoma y no se expresa en células REH.

La Figura 4 representa la lisis específica de células REH que expresan FLT3/CD19 (**A**) y células SKMel63 que expresan CSPG (**B**), respectivamente, por medio de anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención y/o divulgación y por células T citotóxicas positivas para CD8 activadas en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 h. ●: FLT3 x CD3, formato bsFc^{ko}-1/2 como se representa en la Figura 1E; ■: FLT3 x CD3, formato bsFc^{ko}-1 como se representa en la Figura 1G; ▼: CSPG4 x CD3, formato bsFc^{ko}-1/2 como se representa en la Figura 1E; ◆: CD19XTCR, formato bsFc^{ko}-1/2 como se representa en la Figura 1E.

La Figura 5 muestra una comparación de anticuerpos FLT3 x CD3 de especificidad idéntica en tres formatos diferentes: formato monocatenario biespecífico (bs-scFv), formato bsFc^{ko}-1/2 como se representa en la Figura 1E y formato bsFc^{ko}-1 como se representa en la Figura 1G. **A**: determinación de agregación (valores en porcentaje) por medio de filtración en gel. Los agregados migran cerca del volumen muerto y son un 43 %, 0 % y 2 % para bs-scFv, bsFc^{ko}-1/2 y bsFc^{ko}-1, respectivamente. Se concluye que la formación de agregados es considerablemente más pronunciada si el anticuerpo se expresa como bs-scFv en lugar de como bsFc^{ko}-1/2 o bsFc^{ko}-1. **B**: velocidad de producción después de la transfección de genes de anticuerpo en células de producción y purificación mediante cromatografía de afinidad. Como puede verse, la formación de agregados se reduce significativamente para los dos formatos Fc^{ko} de acuerdo con la invención y/o la divulgación, y las tasas de producción son sustancialmente mayores que con el formato monocatenario biespecífico (bs-scFv).

La Figura 6A muestra las secuencias de cadenas ligeras ilustrativas que pueden incluirse en un anticuerpo de la invención. Las cadenas peptídicas respectivas corresponden a la proteína madura sin la secuencia peptídica líder correspondiente. Las secuencias contienen un dominio variable N-terminal representado en negrita y un dominio constante C-terminal representado en cursiva. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del dominio variable están subrayadas.

La Figura 6B representa las secuencias de cadenas principales ilustrativas, que en el presente caso también pueden tratarse como cadenas pesadas que pueden estar incluidas en un anticuerpo de la invención y/o divulgación. Esta cadena principal particular para el formato bsFc-1/2 (Figura 1E) incluye un dominio VH, un dominio CH1, una región de bisagra, un dominio CH2 modificado, un dominio VL y un dominio VH de un fragmento scFv. En el ejemplo de secuencia 21) (SEQ ID NO: 26) la cadena principal contiene un dominio CH3 como se representa en el ejemplo Figura 1G-M (formato bsFc^{ko}-1).

Los dominios VH están representados en negrita, el dominio CH1 en letra normal y las regiones de bisagra, CH2 y CH3 en texto subrayado. La cadena principal incluye además un dominio VL, que se representa en negrita y cursiva,

y un dominio VH (negrita) de un fragmento scFv. Los dominios VH y VL están acoplados entre sí a través de un enlazador, que se representa como en cursiva y subrayado. Los restos determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones VL y VH respectivas están subrayados. El dominio CH2 y el fragmento scFv están acoplados entre sí a través de un enlazador pequeño (GQPSG), que está representado en cursiva.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo biespecífica recombinante. Esta molécula de anticuerpo está compuesta por elementos que también se encuentran en las inmunoglobulinas nativas, es decir naturales, particularmente dominios de cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas.

El término "anticuerpo" se refiere, en general, a una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina. Son ejemplos típicos de un anticuerpo las inmunoglobulinas, así como derivados o fragmentos funcionales de las mismas que conservan la especificidad de unión. En la técnica son bien conocidos los métodos para la producción de anticuerpos. El término "anticuerpo" también incluye inmunoglobulinas (Ig) de diferentes clases (es decir IgA, IgG, IgM, IgD e IgE) y subclases (tales como IgG1, IgG2 etc.). Son ejemplos ilustrativos de un anticuerpo fragmentos F_{ab}, F(ab')₂, fragmentos F_v, fragmentos F_v monocatenarios (scF_v), diacuerpos o anticuerpos de dominio (Holt LJ et al., *Trends Biotechnol.* 21(11), 2003, 484-490). Los anticuerpos de dominio puede ser anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio único variable o dominio único variable de inmunoglobulina, que tienen solo un dominio variable que puede ser VH o VL, que se unen específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otros dominios o regiones V. Dicho dominio único variable de inmunoglobulina puede incluir no solo un polipéptido de dominio único variable de anticuerpo aislado, sino también un polipéptido más grande que incluye o consiste en uno o más monómeros de una secuencia polipeptídica de dominio único variable de anticuerpo. La definición del término "anticuerpo", de esta manera, también incluye realizaciones tales como anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados.

Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención puede tener uno o más dominios que tienen una secuencia con al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con un dominio natural correspondiente de una inmunoglobulina M, una inmunoglobulina G, una inmunoglobulina A, una inmunoglobulina D o una inmunoglobulina E. Debe indicarse a este respecto que el término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa dentro de una desviación del 20 %, tal como dentro de una desviación del 10 % o dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado.

Por consiguiente, la cadena principal (cadena polipeptídica más larga) de una molécula de anticuerpo de la invención puede incluir, o consistir en, dominios con la identidad de secuencia anterior con un dominio correspondiente de una cadena pesada mu de inmunoglobulina, de una cadena pesada gamma de inmunoglobulina, de una cadena pesada alfa de inmunoglobulina, de una cadena pesada delta de inmunoglobulina o de una cadena pesada épsilon de inmunoglobulina. Además, una molécula de anticuerpo de la invención puede incluir o consistir en dominios con la identidad de secuencia anterior con un dominio correspondiente de una cadena ligera lambda de inmunoglobulina o de una cadena ligera kappa de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, los dominios de cadena pesada entera de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención tienen al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con las regiones correspondientes de una cadena pesada mu de inmunoglobulina, de una cadena pesada gamma de inmunoglobulina (tal como cadenas pesadas gamma 1, gamma 2, gamma 3 o gamma 4), de una cadena pesada alfa de inmunoglobulina (tal como cadenas pesadas alfa 1 o alfa 2), de una cadena pesada delta de inmunoglobulina o de una cadena pesada épsilon de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, todos los dominios de cadena ligera presentes en una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención tienen al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con las regiones correspondientes de una cadena ligera lambda de inmunoglobulina (tal como cadenas ligeras lambda 1, lambda 2, lambda 3 o lambda 4) o de una cadena ligera kappa de inmunoglobulina.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a secuencias de aminoácido desveladas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos por parejas a los restos de aminoácido de una secuencia de referencia, es decir una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para conseguir la máxima identidad de secuencias en porcentaje, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento para determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos

puede conseguirse de diversas formas que están dentro de la experiencia en este campo, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles públicamente tales como los programas BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir un alineamiento máximo a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando. Esto mismo ocurre para secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento.

El término "variable" se refiere a las partes de los dominios de inmunoglobulina que presentan variabilidad en su secuencia y que están implicados en la determinación de la especificidad y afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, el o los "dominios variables"). La variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos; se concentra en subdominios de cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Estos subdominios se denominan "regiones hipervariables", "HVR" o "HV" o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR). Las partes más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se denominan regiones "marco" (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales incluyen, cada uno, cuatro regiones FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas y próximas por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno (véase Kabat et al., véase más adelante). En general, las inmunoglobulinas naturales incluyen seis CDR (véase más adelante); tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En las inmunoglobulinas naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis CDR, y se cree que H3 en particular juega un papel único para conferir una especificidad fina a las inmunoglobulinas. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión al antígeno, pero presentan varias funciones efectoras tales como, por ejemplo, citotoxicidad dependiente de anticuerpo, mediada por células y activación del complemento.

La cadena pesada μ , cadena pesada γ , cadena pesada α , cadena pesada δ , cadena pesada ϵ , cadena ligera λ o cadena ligera κ de inmunoglobulina correspondiente puede ser de cualquier especie, tal como una especie de mamífero, incluyendo una especie de roedor, un anfibio, por ejemplo, de la subclase Lissamphibia que incluye, por ejemplo, ranas, sapos, salamandras o tritones o una especie de invertebrado. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitación, una rata, un ratón, un conejo, una cobaya, una ardilla, un hámster, un erizo, un ornitorrinco, una pica americana, un armadillo, un perro, un lémur, una cabra, un cerdo, una vaca, una zarigüeya, un caballo, un murciélago, una marmota, un orangután, un macaco rhesus, un mono lanudo, un macaco, un chimpancé, un tití cabeciblanco (*saguinus oedipus*), un tití o un ser humano.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una glicoproteína que incluye al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) unidas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada tiene una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada incluye tres dominios C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera tiene una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera incluye un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Las CDR contienen la mayoría de los restos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Cada V_H y V_L tiene tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un epítipo de un antígeno.

Cada cadena ligera de una inmunoglobulina incluye un dominio variable (V) N-terminal (V_L) y un dominio constante (C) (CL). Cada cadena pesada incluye un dominio V N-terminal (V_H), tres o cuatro dominios C (C_H) y una región de bisagra. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la divulgación de forma similar contiene estos dominios y regiones (aunque un sitio de unión de la molécula de anticuerpo biespecífica esté formado solo por un fragmento F_v monocatenario).

Cuando se usa en el presente documento, una inmunoglobulina típicamente es una proteína glicosilada tetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. En las inmunoglobulinas pueden encontrarse dos tipos de cadena ligera, denominadas λ y κ . Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y siete de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Una inmunoglobulina IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que las inmunoglobulinas IgA contienen de 2 a 5 de las unidades de 4 cadenas básicas que pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas generalmente tiene aproximadamente 150.000 daltons.

El término "aminoácido" o "resto de aminoácido" se refiere a un ácido α - o β -amino carboxílico.

Cuando se usa en relación con una proteína o péptido, el término "aminoácido" o "resto de aminoácido" típicamente se refiere a un ácido α -amino carboxílico que tienen su definición reconocida en la técnica, tal como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: L-alanina (Ala o A); L-arginina (Arg o R); L-asparagina (Asn o N); ácido L aspártico (Asp o D); L-cisteína (Cys o C); L-glutamina (Gln o Q); ácido L glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); L-histidina (His o H); L-isoleucina (ILE o I); L-leucina (Leu o L); L-lisina (Lys o K); L-metionina (Met o M); L-fenilalanina (Phe o F); L-prolina (Pro o P); L-serina (Ser o S); L-treonina (Thr o T); L-triptófano (Trp o W); L-tirosina (Tyr o Y); y L-valina (Val o V), aunque cuando se desee pueden usarse aminoácidos modificados, sintéticos o raros tales como, por ejemplo, taurina, ornitina, selenocisteína, homocisteína, hidroxiprolina, tioprolina, yodotirosina, 3-nitrotirosina, ornitina, citrulina, canavanina, 5-hidroxitriptófano, carnosina, cicloleucina, 3,4-dihidroxi fenilalanina, N-acetilcisteína, prolinol, alilglicina o ácido acetidina-2-carboxílico. En general, los aminoácidos pueden agruparse como aminoácidos que tienen una cadena lateral no polar (por ejemplo Ala, Cys, ILE, Leu, Met, Phe, Pro, Val); una cadena lateral cargada negativamente (por ejemplo Asp, Glu); una cadena lateral cargada positivamente (por ejemplo Arg, His, Lys); o una cadena lateral polar no cargada (por ejemplo Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp y Tyr).

El término "epítipo", también conocido como "determinante antigénico" se refiere a la parte de un antígeno a la que se une específicamente un anticuerpo o receptor de células T, formándose de esta manera un complejo. De esta manera, el término "epítipo" incluye cualquier molécula o determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. El sitio o sitios de unión (parátipo) de una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento puede unirse/interaccionar específicamente con epítipos conformacionales o continuos, que son únicos para la estructura diana. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. En algunas realizaciones, los determinantes de epítipo incluyen agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Con respecto a los antígenos polipeptídicos, un epítipo conformacional o discontinuo se caracteriza por la presencia de dos o más restos de aminoácido discretos, separados en la secuencia primaria, pero que se ensamblan formando una estructura consistente sobre la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega para proporcionar la proteína/antígeno nativo (Sela, M., Science (1969) 166, 1365-1374; Laver, W.G., et al. Cell (1990) 61, 553-556). Los dos o más restos de aminoácido discretos que contribuyen al epítipo pueden estar presentes en secciones separadas de una o más cadenas polipeptídicas. Estos restos se agrupan en la superficie de la molécula cuando la cadena o cadenas polipeptídicas se pliegan en una estructura tridimensional para constituir el epítipo. Por el contrario, un epítipo continuo o lineal consiste en dos o más restos de aminoácido discretos, que están presentes en un solo segmento lineal de una cadena polipeptídica. Como ejemplo ilustrativo, un epítipo CD3 "dependiente de contexto" se refiere a la conformación de dicho epítipo. Dicho epítipo dependiente de contexto, localizado en la cadena ϵ de CD3, solo puede desarrollar su conformación correcta si está incluido dentro del resto de la cadena ϵ y mantenido en la posición correcta por heterodimerización de la cadena ϵ con la cadena δ o γ de CD3. Por el contrario, un epítipo de CD3 independiente de contexto puede ser un polipéptido de 1-27 restos de aminoácido N-terminal o un fragmento funcional del mismo de ϵ de CD3. En general, los epítipos pueden ser de naturaleza lineal o pueden ser un epítipo discontinuo. De esta manera, como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo discontinuo formado por una relación espacial entre aminoácidos de un antígeno distinta de una serie ininterrumpida de aminoácidos. El término "epítipo" también incluye un determinante antigénico de un hapteno, que se conoce como una molécula pequeña que puede servir como antígeno al presentar uno o más epítipos reconocidos inmunológicamente tras la unión a un elemento de mayor tamaño, tal como una molécula de mayor tamaño, por ejemplo una proteína.

Se dice que un anticuerpo o molécula/fragmento de anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que los anticuerpos se "unen al mismo epítipo" si los anticuerpos compiten de forma cruzada de forma que solo un anticuerpo puede unirse al epítipo en un momento dado, es decir un anticuerpo impide la unión o modula el efecto del otro.

El término "específico" en este contexto, o "que reconoce específicamente", también usado como "dirigido a", significa de acuerdo con la presente invención que la molécula de anticuerpo es capaz de interaccionar específicamente con y/o unirse a al menos dos, por ejemplo a al menos tres o a al menos cuatro aminoácidos de un epítipo, pero no se une esencialmente a otro epítipo o antígeno. Dicha unión puede ejemplificarse por la especificidad de un "principio de llave y cerradura". Se cree que la unión específica se efectúa por motivos específicos en la secuencia de aminoácidos de la región de unión del anticuerpo, y el anticuerpo y el epítipo o el antígeno se unen entre sí como resultado de su estructura primaria, secundaria o terciaria así como el resultado de modificaciones secundarias de dicha estructura. Puede obtenerse la interacción específica del sitio de interacción de epítipo/antígeno con su epítipo/antígeno específico así como una unión sencilla de dicho sitio al antígeno. Además, la interacción específica del sitio de interacción de antígeno con su epítipo/antígeno específico puede dar como resultado, como alternativa, el inicio de una señal tal como, por ejemplo, debido a la inducción de un cambio de la conformación del antígeno o una oligomerización del antígeno.

Típicamente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es mayor de 10^{-6} M. En particular, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es de aproximadamente 10^{-8} a 10^{-11} M (K_D) o de

aproximadamente 10^{-9} a 10^{-11} M o incluso superior. De esta manera, también se incluyen en la presente invención moléculas de anticuerpo con una afinidad del primer sitio de unión y/o el segundo sitio de unión en el intervalo picomolar (con una K_D de 10^{-12} M). Si es necesario, la unión no específica de un sitio de unión puede reducirse sin afectar de forma sustancial a la unión específica variando las condiciones de unión.

En algunas realizaciones, un antígeno al que se une un anticuerpo de acuerdo con la invención es un antígeno que está incluido en la matriz extracelular o es un antígeno de la superficie celular. En algunas realizaciones, un antígeno al que se une un anticuerpo de acuerdo con la invención es un antígeno asociado a tumores. Se entiende que dicho antígeno asociado a tumores puede incluirse en la matriz extracelular o puede ser un antígeno de la superficie celular.

La expresión "matriz extracelular" se refiere a la región de tejido de un animal multicelular, incluyendo un ser humano, que se encuentra en el espacio intercelular, es decir, entre las células del tejido respectivo. La matriz extracelular es básicamente una red de proteínas tales como colágenos fibrilares y no fibrilares o elastina, de glicoproteínas tales como laminina o fibronectina, de proteoglicanos tales como condroitín sulfato o queratán sulfato y de polisacáridos tales como ácido hialurónico. La matriz extracelular sirve, entre otras cosas, para separar tejidos diferentes entre sí o para regular la comunicación intercelular. En algunas realizaciones, un antígeno asociado a tumores puede expresarse parcial o exclusivamente en la matriz extracelular de un tumor.

La expresión "antígeno de la superficie celular", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que se presenta en la superficie de una célula. Típicamente, dicha molécula se localiza en o sobre la membrana plasmática de la célula de tal forma que al menos parte de esta molécula permanece accesible desde el entorno, es decir, desde el exterior de la célula. Una molécula respectiva consiste en o incluye típicamente restos de aminoácido y/o sacárido. Un ejemplo ilustrativo de una molécula de la superficie celular, que está localizada en la membrana plasmática, es una proteína transmembrana que, en su conformación tridimensional, tiene regiones de hidrofilia e hidrofobia. Una o más regiones hidrófobas permiten que la molécula de la superficie celular esté incluida o esté insertada en la membrana plasmática hidrófoba de la célula, mientras que las regiones hidrófilas de la proteína se extienden sobre cualquier lado de la membrana plasmática hacia el citoplasma y el espacio extracelular, respectivamente. Los ejemplos de una molécula de la superficie celular localizada en la membrana plasmática incluyen, pero sin limitación, una proteína con un resto de cisteína modificado postraduccionalmente que lleva un grupo palmitoilo, una proteína modificada en el resto de cisteína C-terminal que lleva un grupo farnesilo o una proteína modificada en el extremo C que lleva un anclaje de glicosil fosfatidil inositol ("GPI"). Estos grupos permiten la unión covalente de proteínas a la superficie externa de la membrana plasmática, con lo que permanecen accesibles para el reconocimiento por moléculas extracelulares tales como anticuerpos. Los ejemplos de antígenos de la superficie celular incluyen una molécula de receptor de la superficie celular tal como un receptor acoplado a proteína G (por ejemplo, el receptor β adrenérgico), un receptor de tirosina quinasa (tal como EGFR, EGFRvIII, Her2/neu, HER2/c-neu, PDGFR α , ILR-1, TNFR, CD30, CD33 o GMCSFR), un receptor de membrana con actividad tirosina quinasa asociada (tal como IL6R o LIFR) o un receptor de membrana con actividad Ser/Thr quinasa (tal como TGF β R), por nombrar solo algunos ejemplos.

Los ejemplos de antígeno asociado a tumores que está incluido en la matriz extracelular incluyen, pero sin limitación, un proteoglicano tal como el Proteoglicano de Condroitín Sulfato asociado a Melanoma (CSPG4) o CD44v6, incluyendo una mucina tal como Muc-1 o una enzima unida a la membrana tal como la anhidrasa Carbónica IX (CAIX). Son ejemplos de dichos antígenos tenascina y la proteína activadora del fibroblasto (FAP).

La expresión "molécula de anticuerpo aislada", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son elementos que podrían interferir con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo se purifica hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo, según se determina por el método de Lowry, tal como más de un 99 % en peso. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo se purifica en un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria. En algunas realizaciones, el anticuerpo se purifica hasta la homogeneidad a juzgar por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. En algunas realizaciones, puede estar presente una molécula de anticuerpo aislada dentro de células recombinantes, sin que estén presentes uno o más componentes del entorno natural del anticuerpo. Típicamente, un anticuerpo aislado se prepara por al menos una etapa de purificación.

Los términos " V_H " y " V_L " se usan en el presente documento para hacer referencia al dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera, respectivamente, de una inmunoglobulina. Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables. De esta manera, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable incluye restos de aminoácido de una "Región Determinante de Complementariedad" o "CDR". Hay tres CDR (o regiones CDR) de cadena pesada y tres CDR (o regiones CDR) de cadena ligera en la parte variable de una inmunoglobulina. De esta manera, "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a las tres CDR de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) o

a las tres CDR de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) o a todas las CDR de cadena pesada y todas las CDR de cadena ligera, si es apropiado. Tres CDR constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena ligera y tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena pesada. Las CDR determinan la especificidad por el antígeno de una molécula de inmunoglobulina y están separadas por secuencias de aminoácidos que incluyen regiones de soporte o marco. Las longitudes y los límites exactos de las CDR de la definición están sujetos a diferentes sistemas de clasificación y numeración. La estructura y el plegamiento de la proteína del anticuerpo puede hacer que otros restos se consideren parte de la región de unión al antígeno y así lo debe entender un experto en la materia. Las CDR proporcionan la mayor parte de los restos de contacto para la unión de la inmunoglobulina al antígeno o epítipo.

La CDR3 es típicamente la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión del anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser de tan solo dos restos de aminoácido o de más de 26 aminoácidos. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Como revisión de la estructura de un anticuerpo, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988. Un experto en la materia reconocerá que cada estructura de subunidad, por ejemplo, una estructura de CH, VH, CL, VL, CDR, FR incluye fragmentos activos, por ejemplo, la parte de la subunidad VH, VL o CDR que se une al antígeno, es decir, el fragmento de unión al antígeno, o, por ejemplo, la parte de la subunidad CH que se une y/o activa, por ejemplo, un receptor Fc y/o el complemento. Las CDR típicamente se refieren a las CDR de Kabat, como se describe en *Sequences of Proteins of immunological Interest*, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al. Otro patrón para caracterizar el sitio de unión al antígeno es el referido a los bucles hipervariables como describe Chothia. Véase, por ejemplo Chothia, et al. (1992; *J. Mol. Biol.* 227:799-817; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628-4638. Otro patrón es la definición de AbM usada por el programa informático de modelado de anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Véase, en general, por ejemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Como alternativa, pueden llevarse a cabo realizaciones descritas con respecto a las CDR de Kabat usando relaciones descritas similares con respecto a los bucles hipervariables de Chothia o a los bucles definidos por AbM.

Los restos de la "Región Marco" o "FR" son los restos del dominio variable distintos de los de la región hipervariable. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. De esta manera, una "región marco humana" es una región marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente en un 85 % o más, normalmente en un 90-95 % o más) a la región marco de una inmunoglobulina humana natural. La región marco de un anticuerpo, que es la región marco combinada de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno.

Se entiende que las expresiones "Fab", "región Fab", "parte Fab" o "fragmento Fab" definen un polipéptido que incluye un dominio de inmunoglobulina V_H, un C_H1, un V_L y un C_L. Fab puede hacer referencia a esta región aislada o a esta región en el contexto de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención, así como a una inmunoglobulina de longitud completa o a un fragmento de inmunoglobulina. Típicamente, una región Fab contiene una cadena ligera entera de un anticuerpo. Puede considerarse que una región Fab define "un brazo" de una molécula de inmunoglobulina. Contiene la parte de unión al epítipo de esa Ig. La región Fab de una inmunoglobulina natural puede obtenerse como un fragmento proteolítico por digestión con papaína. Una "parte F(ab')₂" es el fragmento proteolítico de una inmunoglobulina digerida con pepsina. Una "parte Fab" es el producto resultante de la reducción de los enlaces disulfuro de una parte F(ab')₂. Como se usan en el presente documento, las expresiones "Fab", "región Fab", "parte Fab" o "fragmento Fab" pueden incluir además una región de bisagra que define el extremo C terminal del brazo del anticuerpo (véase anteriormente). Esta región de bisagra corresponde a la región de bisagra encontrada en el extremo C terminal del dominio C_H1 dentro de una inmunoglobulina de longitud completa en la que los brazos de la molécula de anticuerpo puede considerarse que definen una Y. En la técnica se usa la expresión región de bisagra porque una inmunoglobulina tiene alguna flexibilidad en esta región.

Un "Fv" o "fragmento Fv" consiste solo en los dominios V_L y V_H de un "solo brazo" de una inmunoglobulina. De esta manera, un "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión completo. Un fragmento Fv de "dos cadenas" consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en una asociación fuerte no covalente. Una especie de Fv monocatenario (scFv) incluye un dominio V_H y V_L de una inmunoglobulina, estando presentes estos dominios en una sola cadena polipeptídica en la que están unidos covalentemente entre sí por un enlazador peptídico flexible. Típicamente, en un fragmento scFv, los dominios variables de la cadena ligera y pesada se asocian en una estructura dimerica análoga a la presente en una especie de Fv de dos cadenas. En fragmentos Fv monocatenarios, es posible tener el dominio variable de la cadena ligera dispuesto en el extremo N de la cadena polipeptídica individual, seguido del enlazador y el dominio variable de la cadena pesada dispuesto en el extremo C de la cadena polipeptídica o viceversa, teniendo dispuesto el dominio variable de la cadena pesada en el extremo N y el dominio variable de la cadena ligera en el extremo C, con el enlazador peptídico dispuesto entre ellos. El enlazador peptídico puede ser cualquier enlazador flexible conocido en la técnica, por ejemplo, constituido por restos de glicina y serina. También es posible estabilizar adicionalmente la asociación de dominios entre el dominio V_H y V_L mediante la introducción de enlaces disulfuro en regiones marco (véase Reiter et al. *Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds*

engineered into conserved framework regions, Biochemistry 1994, 33, 6551-5459). Dichos fragmentos scFv también se conocen como fragmentos scFv estabilizador por disulfuro (ds-scFv).

La expresión "región Fc" o "fragmento Fc" se usa en el presente documento para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. La parte Fc interviene en la función efectora de los anticuerpos, por ejemplo, la activación del sistema del complemento, y de células efectoras inmunitarias que llevan el receptor Fc, tales como células NK. En las moléculas de IgG humanas, la región Fc se genera por escisión mediante papaína del extremo N terminal en la Cys226. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana normalmente se define como un tramo desde el resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación de la molécula de anticuerpo, o mediante modificación recombinante por ingeniería genética del ácido nucleico que codifica una cadena pesada de la molécula de anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede incluir poblaciones de anticuerpo con todos los restos K447 retirados, y poblaciones de anticuerpo sin los restos K447 retirados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para uso en los anticuerpos de la divulgación incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 de mamífero, por ejemplo, humanas o murinas. La región Fc contiene dos o tres dominios constantes, dependiendo de la clase del anticuerpo. En realizaciones en las que la inmunoglobulina es una IgG, la región Fc tiene un dominio C_H2 y un dominio C_H3.

Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención tiene dos cadenas, una cadena más corta, que en algunas realizaciones puede ser una cadena ligera, y una cadena principal, que en algunas realizaciones puede considerarse también la cadena pesada. La molécula de anticuerpo normalmente es un dímero de estas dos cadenas. Basándose en los dominios incluidos en una molécula de anticuerpo de la invención, puede considerarse que la molécula de anticuerpo tiene un fragmento Fab, que generalmente incluye una región de bisagra, un dominio C_H2, y un fragmento Fv monocaténario. En algunas moléculas de la divulgación, la molécula de anticuerpo también tiene un dominio C_H3, generalmente dispuesto en posición C terminal del dominio C_H2. En algunas moléculas, la disposición de los dominios de un anticuerpo de la divulgación corresponde a la disposición de dominios en una inmunoglobulina. Como dos ejemplos, la cadena más corta de una molécula de anticuerpo de la invención puede tener un dominio VL en el extremo N y un dominio CL en el extremo C de la cadena más corta, y la cadena principal puede tener un dominio VH en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C terminal de la misma. En algunas realizaciones, la cadena más corta puede tener un dominio VL en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C de la cadena más corta. En algunas realizaciones, la cadena más corta puede tener un dominio VH en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C de la cadena más corta. En algunas realizaciones, la cadena más corta puede tener un dominio VH en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C de la cadena más corta. En algunas realizaciones, la cadena más corta puede tener un dominio VH en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C de la cadena más corta. En algunas realizaciones, la cadena principal puede tener un dominio VL en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C terminal de la misma. En algunas realizaciones, la cadena principal puede tener un dominio VH en el extremo N y un dominio CL en el extremo C terminal de la misma. En algunas realizaciones, la cadena principal puede tener un dominio VL en el extremo N y un dominio CL en el extremo C terminal de la misma.

La cadena más corta del anticuerpo puede estar unida a la cadena principal del anticuerpo por medio de uno o más, incluyendo dos o tres, enlaces disulfuro. Un enlace disulfuro respectivo puede definir un puente entre un resto de cisteína C terminal de la cadena más pequeña y un resto de cisteína dentro de la región de bisagra de la cadena principal del anticuerpo.

En una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención, la región C terminal de la cadena principal puede definirse por un fragmento Fv monocaténario. El extremo C de la cadena principal, en algunas realizaciones, puede definirse por el dominio VH del fragmento scFv. En algunas realizaciones, el extremo C de la cadena principal puede definirse por el dominio VL del fragmento scFv. Por consiguiente, el fragmento scFv, en algunas realizaciones, puede acoplarse al dominio CH2 de la cadena principal a través del dominio VH, por ejemplo, al extremo N terminal del dominio VH. En algunas realizaciones, el fragmento scFv puede acoplarse al dominio CH2 de la cadena principal a través del dominio VL, por ejemplo, el extremo N terminal del dominio VL. En algunas realizaciones, el dominio CH2 de la molécula de anticuerpo está unido al fragmento scFv a través del dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) del fragmento scFv. En algunas realizaciones, el dominio CH2 está unido al fragmento scFv a través del dominio variable de la cadena pesada (dominio VH) del fragmento scFv.

En algunas realizaciones, el fragmento Fab de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención, está unido al dominio CH2 a través de un dominio de cadena pesada del fragmento Fab. Por consiguiente, la cadena principal del anticuerpo puede tener un dominio de cadena pesada tal como un dominio CH1 (supra), que está acoplado al dominio CH2. Como se ha explicado anteriormente, un dominio CH1 respectivo puede acoplarse al dominio CH2 a través de una región de bisagra. El dominio de cadena pesada respectivo del fragmento Fab, en algunas realizaciones, puede estar dispuesto en el extremo N de la cadena polipeptídica de la cadena principal del anticuerpo. En algunas realizaciones, el fragmento Fab de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención está unido al dominio CH2 a través de un dominio de cadena ligera del fragmento Fab. Por consiguiente, la cadena principal de la molécula de anticuerpo puede tener un dominio de cadena ligera tal como un dominio CL, que está

acoplado al dominio CH2. De nuevo, un dominio CL respectivo puede acoplarse al dominio CH2 a través de una región de bisagra. El dominio de cadena ligera respectivo del fragmento Fab, en algunas realizaciones, puede estar dispuesto en el extremo N de la cadena polipeptídica de la cadena principal de la molécula de anticuerpo. Para prevenir la dimerización de las moléculas en realizaciones bivalentes (Figura 1A-E y 1N), pueden cambiarse los restos de cisteína en la región de bisagra que proporcionan enlaces disulfuro intercatenarios. En realizaciones tetravalentes (Figuras 1F-M), estos restos de cisteína están conservados. En estas realizaciones, por consiguiente, puede considerarse que la molécula de anticuerpo define un dímero de una molécula de anticuerpo dimérica bivalente como se ha descrito anteriormente y cada cadena principal y cada cadena más corta pueden seleccionarse de forma individual. Como ejemplo, la primera de las cadenas más cortas puede tener un dominio VH en el extremo N y un dominio CL en el extremo C. La primera cadena principal puede tener un dominio VL en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C terminal de la misma. Además, la primera cadena principal puede tener un dominio CH2 y un dominio CH3, así como un fragmento scFv C terminal. El fragmento scFv puede acoplarse al dominio CH3 a través del dominio VL. La segunda de las cadenas más cortas puede tener un dominio VH en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C. La segunda cadena principal puede tener un dominio VL en el extremo N y un dominio CL en el extremo C terminal de la misma. La segunda cadena principal también puede tener un dominio CH2 y un dominio CH3, así como un fragmento scFv C terminal. El fragmento scFv puede acoplarse al dominio CH3 a través del dominio VL.

Una molécula de anticuerpo tetramérica respectiva puede estar compuesta por dos moléculas de anticuerpo diméricas que están unidas entre sí a través de uno o más, tales como dos, enlaces disulfuro. Dicho enlace disulfuro puede definir un puente entre un resto de cisteína de la cadena principal de una primera molécula de anticuerpo dimérica y un resto de cisteína de la cadena principal de una segunda molécula de anticuerpo dimérica. Típicamente, los restos de cisteína respectivos están situados dentro de la región de bisagra de la cadena principal correspondiente de cada molécula de anticuerpo dimérica. En algunas moléculas de anticuerpo, una o las dos cadenas principales, es decir, la cadena principal de la primera molécula dimérica y la cadena principal de la segunda molécula dimérica de una molécula de anticuerpo tetramérica, tiene un resto de cisteína en la posición 226 de la secuencia y/o en la posición 229 de la secuencia de uno de los dominios de bisagra respectivos, de acuerdo con la numeración de Kabat [Índice EU]. En una molécula de anticuerpo de la divulgación, se define un enlace disulfuro entre el dominio de bisagra de la primera cadena principal y un dominio de bisagra de la segunda cadena principal por al menos uno de un resto de cisteína en la posición 226 de la secuencia y un resto de cisteína en la posición 229 de la secuencia de uno de los dominios de bisagra, de acuerdo con la numeración de Kabat [Índice EU]. Una molécula de anticuerpo tetramérica puede tener uno o más enlaces disulfuro que unen las regiones de bisagra de las dos cadenas principales de las moléculas de anticuerpo diméricas y un enlace disulfuro que une las regiones de bisagra de las dos cadenas principales de las moléculas de anticuerpo diméricas. En algunas moléculas de anticuerpo de la divulgación, dos moléculas de anticuerpo diméricas de una molécula de anticuerpo tetramérica de acuerdo con la divulgación pueden estar unidas por medio de un enlace disulfuro que se define por un resto de cisteína que está incluido en el dominio CH2 de la cadena principal de una primera molécula de anticuerpo dimérica y un resto de cisteína que está incluido en el dominio CH2 de la cadena principal de una segunda molécula de anticuerpo dimérica.

Como ejemplo adicional, la primera de las cadenas más cortas puede tener un dominio VL en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C. La primera cadena principal puede tener un dominio VH en el extremo N y unido al mismo por el extremo C terminal un dominio CL. Además, la primera cadena principal puede tener un dominio CH2 y un dominio CH3, así como un fragmento scFv C terminal. El fragmento scFv puede estar acoplado al dominio CH3 a través del dominio VH. La segunda de las cadenas más cortas puede tener un dominio VL en el extremo N y un dominio CL en el extremo C. La segunda cadena principal puede tener un dominio VH en el extremo N y un dominio CH1 en el extremo C terminal de la misma. La segunda cadena principal también puede tener un dominio CH2 y un dominio CH3, así como un fragmento scFv C terminal. El fragmento scFv puede estar acoplado al dominio CH3 a través del dominio VH.

Una molécula de anticuerpo "bienespecífica" o "bifuncional" es una molécula de anticuerpo que tiene dos sitios de unión a epítipo/antígeno diferentes y, por consiguiente, tiene especificidades de unión por dos epítopos diana diferentes. Estos dos epítopos pueden ser epítopos del mismo antígeno o de antígenos diferentes. Por el contrario, un "anticuerpo bivalente" puede tener sitios de unión con la misma especificidad antigénica.

Un "anticuerpo bienespecífico" puede ser una molécula de anticuerpo que se une a un antígeno o epítipo en uno de dos o más brazos de unión, definidos por un primer par de cadenas pesada y ligera o de cadenas principal y más corta/más pequeña (supra), y se une a un antígeno o epítipo diferente en un segundo brazo, definido por un segundo par de cadenas pesada y ligera o de cadenas principal y más pequeña. Dicha realización de un anticuerpo bienespecífico tiene dos brazos de unión a antígeno distintos, tanto en especificidad como en secuencias de CDR. Típicamente, un anticuerpo bienespecífico es monovalente para cada antígeno al que se une. Un anticuerpo bienespecífico es una molécula de anticuerpo híbrida, que puede tener una primera región de unión que se define por una primera región variable de cadena ligera y una primera región variable de cadena pesada, y una segunda región de unión que se define por una segunda región variable de cadena ligera y una segunda región variable de cadena pesada. En algunas realizaciones, una de estas regiones de unión puede definirse por un par de cadenas pesada/ligera. Como se ha explicado anteriormente, en el contexto de la presente invención, la molécula de

anticuerpo biespecífica tiene una primer sitio de unión, definido por regiones variables de una cadena principal y una cadena más pequeña, y un segundo sitio de unión diferente definido por una región variable de un fragmento scFv que está incluido en la cadena principal de la molécula de anticuerpo.

- 5 En la técnica se conocen métodos de fabricación de una molécula de anticuerpo biespecífica, por ejemplo, conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes o, por ejemplo, también conjugación química de dos fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, de dos fragmentos Fab. Como alternativa, las moléculas de anticuerpo biespecíficas se fabrican de forma recombinante. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la coexpresión de dos pares de cadena H-cadena L de inmunoglobulina, donde las dos
- 10 cadenas H tienen diferentes especificidades de unión. Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de diez estructuras de anticuerpo diferentes de las cuales solo una tiene la especificidad de unión deseada. Un enfoque alternativo implica la fusión de los dominios variables con las especificidades de unión deseadas a la región constante de cadena pesada que incluye al menos parte de la región de bisagra, las regiones CH2 y CH3. En una realización, la región CH1 que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica estas fusiones, y si se desea la cadena L, están insertados en vectores de expresión distintos y después se cotransfectan a un organismo hospedador adecuado. Es posible considerar la inserción de las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas en un vector de expresión.

- 20 La molécula de anticuerpo biespecífica de la invención puede actuar como un anticuerpo monoclonal (MAb) con respecto a cada diana. En algunas realizaciones, el anticuerpo es quimérico, humanizado o completamente humano.

- Generalmente se entiende que un "anticuerpo de especificidad doble" que puede ser, por ejemplo, una inmunoglobulina de longitud completa o una construcción con propiedades de unión de tipo inmunoglobulina, tiene
- 25 dos brazos de unión, en particular brazos definidos por un par de HC/LC, que pueden unirse a dos antígenos o epítopos diferentes en cada uno de ellos (véase la publicación PCT WO 02/02773). Por consiguiente, una proteína de unión de especificidad doble tiene dos brazos de unión a antígeno idénticos, con especificidad idéntica y secuencias de CDR idénticas, y es bivalente para cada antígeno al que se une.

- 30 El receptor de células T (TCR) es un receptor particular que está presente en la superficie celular de las células T, es decir, los linfocitos T. *In vivo* el receptor de células T existe como un complejo de varias proteínas. El receptor de células T generalmente tiene dos cadenas peptídicas separadas, típicamente las cadenas alfa y beta del receptor de células T (TCR α y TCR β), en algunas células T, cadenas gamma y delta del receptor de células T (TCR γ y TCR δ). Las otras proteínas del complejo son proteínas CD3: Heterodímeros CD3 $\epsilon\gamma$ y CD3 $\epsilon\delta$ y, lo que es más importante, un homodímero CD3 ζ , que tiene un total de seis motivos ITAM. Los motivos ITAM en CD3 ζ pueden fosforilarse por Lck y, a su vez, reclutar ZAP-70. Lck y/o ZAP-70 también pueden fosforilar las tirosinas en muchas otras moléculas, entre ellas CD28, LAT y SLP-76, que permiten la agregación de complejos de señalización alrededor de estas
- 35 proteínas.

- 40 Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención incluye una cadena ligera con un dominio VL y un dominio CL. La molécula de anticuerpo incluye además una cadena principal que incluye un dominio VH, un dominio CH1 y una región de bisagra. El dominio VH está dispuesto en el extremo N de la cadena principal y el dominio VH está unido al dominio CH1, directamente unido al mismo o acoplado a través de un péptido de enlace típicamente de 20 o menos, incluyendo 10 o menos restos de aminoácido. La región de bisagra está unida al extremo C terminal del dominio CH1. Por consiguiente, puede considerarse que la parte de la molécula de anticuerpo que se define por la disposición adyacente del dominio VL, el CL, el VH y el CH1 así como la región de bisagra, define un fragmento Fab y, por consiguiente, también se denomina así en el presente documento. Como ocurre en una inmunoglobulina natural, el emparejamiento del dominio VH y el dominio VL conjuntamente define un solo sitio de unión a antígeno. Por lo tanto, el fragmento Fab de un anticuerpo de la invención incluye el sitio de unión para un primer antígeno. En una molécula de anticuerpo respectiva, la cadena ligera está unida a la cadena principal por un enlace disulfuro. En algunos ejemplos, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la divulgación es un dímero que incluye dos cadenas principales y dos cadenas ligeras como se ha descrito anteriormente (véase también más adelante).
- 45
- 50

- En algunas realizaciones, la secuencia de una molécula de anticuerpo biespecífica recombinante de acuerdo con la invención puede compararse con la secuencia de IgG1, ya que la secuencia de la molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención tiene un cierto grado de similitud con la secuencia de IgG1, como se ilustra adicionalmente más adelante. En comparación con la secuencia de aminoácidos de IgG1 de acuerdo con Kabat et al. (1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda) una cadena principal de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención en algunas
- 60 realizaciones incluye un dominio V_H en las posiciones de aminoácido 1 a 117, un dominio C_{H1} en las posiciones 118 a 215, una región de bisagra en las posiciones 216 a 230 y un dominio C_{H2} en las posiciones 231 a 340.

- De acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la cadena principal de un anticuerpo de la invención, el fragmento Fab, que consiste en el dominio V_H, el dominio C_{H1} y la región de bisagra, en estas realizaciones típicamente abarca los aminoácidos 1 a 230. Dentro de este fragmento Fab, el dominio V_H típicamente se define por los aminoácidos 1 a 118, el dominio C_{H1} se define por los aminoácidos 119 a 216 y la región de bisagra se define por los aminoácidos
- 65

217 a 231, de acuerdo con la numeración de Kabat. La cadena de anticuerpo con la secuencia SEQ ID NO: 6 puede servir como ejemplo de una realización respectiva. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención tiene, en las posiciones 342 y siguientes de la cadena principal, una secuencia quimérica compuesta de un dominio V_H y un dominio V_L . En algunas realizaciones, el dominio V_L está dispuesto para definir el dominio C terminal de esta secuencia quimérica. En algunos ejemplos, el anticuerpo de acuerdo con la divulgación tiene, en comparación con la secuencia de aminoácidos de IgG1 de acuerdo con Kabat et al., un dominio C_H3 en las posiciones 342 a 447, seguido de una secuencia quimérica compuesta de un dominio V_H y un dominio V_L C terminal. En los ejemplos en los que está incluido un dominio C_H3 en el anticuerpo de acuerdo con la divulgación, este dominio C_H3 se define por los aminoácidos 342 a 448 de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la cadena principal de la molécula de anticuerpo. La secuencia quimérica compuesta de un dominio V_H y un dominio V_L , que puede ser C terminal (supra), en estos ejemplos está localizada en las posiciones 449 y siguientes de la secuencia de aminoácidos de la cadena principal de la molécula de anticuerpo.

Una molécula de anticuerpo biespecífica de acuerdo con la invención puede tener dos sitios de unión de cualquier especificidad deseada. En algunas realizaciones, uno de los sitios de unión es capaz de unirse a un antígeno asociado a tumores. En algunas realizaciones, el sitio de unión incluido en el fragmento Fab es un sitio de unión específico para un antígeno de superficie asociado a tumores. En algunas realizaciones, el sitio de unión incluido en el fragmento Fv monocatenario es un sitio de unión específico para un antígeno asociado a tumores tal como el antígeno de superficie asociado a tumores.

La expresión "antígeno de superficie asociado a tumores", como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno que es o puede presentarse en una superficie que está localizada en o dentro de células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse en la superficie celular con una parte extracelular que, con frecuencia, está combinada con una parte transmembrana y citoplásmica de la molécula. En algunas realizaciones, estos antígenos pueden presentarse solo por las células tumorales y no por las células normales, es decir no tumorales. Los antígenos tumorales pueden expresarse exclusivamente en células tumorales o pueden representar una mutación específica de tumor en comparación con las células no tumorales. En dicha realización, un antígeno respectivo puede denominarse antígeno específico de tumor. Algunos antígenos se presentan tanto por las células tumorales como por las células no tumorales, y pueden denominarse antígenos asociados a tumores. Estos antígenos asociados a tumores pueden sobreexpresarse en las células tumorales en comparación con las células no tumorales o son accesibles para la unión de anticuerpos en las células tumorales debido a una estructura menos compacta del tejido tumoral en comparación con el tejido no tumoral. En algunas realizaciones, el antígeno de superficie asociado a tumores está localizado en el sistema vascular de un tumor.

Son ejemplos ilustrativos de un antígeno de superficie asociado a tumores CD10, CD19, CD20, CD22, CD33, tirosina quinasa 3 de tipo Fms (FLT-3, CD135), proteoglicano 4 de condroitín sulfato (CSPG4, proteoglicano de condroitín sulfato asociado a melanoma), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Her2neu, Her3, IGFR, CD133, IL3R, proteína activadora de fibroblasto (FAP), CDCP1, Derlin1, Tenascina, frizzled 1-10, los antígenos vasculares VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR- α (CD140a), PDGFR- β (CD140b) Endogлина, CLEC14, Tem1-8 y Tie2. Otros ejemplos pueden incluir A33, CAMPATH-1 (CDw52), antígeno carcinoembrionario (CEA), Carboanhidrasa IX (MN/CA IX), CD21, CD25, CD30, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, EGFR de2-7, EGFRvIII, EpCAM, Ep-CAM, proteína de unión a Folato, G250, tirosina quinasa 3 de tipo Fms (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R (CD115), HLA-DR, IGFR, receptor de IL-2, IL3R, MCSP (proteoglicano de condroitín sulfato de la superficie celular asociado a melanoma), Muc-1, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno específico de próstata (PSA) y TAG-72. Son ejemplos de antígenos expresados en la matriz extracelular de tumores tenascina y la proteína activadora de fibroblasto (FAP).

En algunas realizaciones, uno de los sitios de unión de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención puede unirse a una molécula receptora específica de células T y/o molécula receptora específica de células citolíticas naturales (células NK). Un receptor específico de células T es el denominado "receptor de células T" (TCR), que permite que una célula T se una y, si están presentes señales adicionales, se active por y responda a un epítipo/antígeno presentado por otra célula denominada célula presentadora de antígeno o APC. Se sabe que el receptor de células T se parece a un fragmento Fab de una inmunoglobulina natural. Generalmente es monovalente, comprendiendo cadenas α y β , y en algunas realizaciones comprende cadenas γ y cadenas δ (supra). Por consiguiente, en algunas realizaciones, el TCR es TCR (alfa/beta) y en otras realizaciones es TCR (gamma/delta). El receptor de células T forma un complejo con el correceptor de células T CD3. CD3 es una proteína compleja y está compuesta por cuatro cadenas distintas. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ y dos cadenas CD3 ϵ . Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como receptor de células T (TCR) y la cadena ζ para generar una señal de activación en los linfocitos T. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un receptor específico de células T es el correceptor de células T CDR3. En algunas realizaciones, un receptor específico de células T es CD28, una proteína que también se expresa en las células T. CD28 puede proporcionar señales coestimuladoras, que son necesarias para la activación de células T. CD28 juega papeles importantes en la proliferación y supervivencia de las células T, la producción de citocinas y el desarrollo de células T coadyuvantes de tipo 2. Otro ejemplo adicional de un receptor específico de células T es CD134, también denominado OX40. CD134/OX40 se expresa después de 24 a 72 horas tras la activación y puede considerarse que define una molécula

coestimuladora secundaria. Otro ejemplo de un receptor de células T es 4-1BB, capaz de unirse al Ligando de 4-1BB en las células presentadoras de antígeno (APC), con lo que se genera una señal coestimuladora para la célula T. Otro ejemplo de un receptor encontrado predominantemente en las células T es CD5, que también se encuentra en las células B a bajos niveles. Otro ejemplo de un receptor que modifica las funciones de las células T es CD95, también conocido como receptor Fas, que media la señalización apoptótica por un ligando Fas expresado en la superficie de otras células. Se ha notificado que CD95 modula las vías de señalización dirigidas por TCR/CD3 en los linfocitos T en reposo.

Un ejemplo de una molécula receptora específica de células NK es CD16, un receptor Fc de baja afinidad, y NKG2D. Un ejemplo de una molécula receptora que está presente en la superficie tanto de las células T como de las células citolíticas naturales (NK) es CD2 y otros miembros de la superfamilia de CD2. CD2 puede actuar como molécula coestimuladora en células T y NK.

En algunas realizaciones, el primer sitio de unión de la molécula de anticuerpo se une a un antígeno de superficie asociado a tumores y el segundo sitio de unión se une a una molécula receptora específica de células T y/o una molécula receptora específica de células citolíticas naturales (NK). En algunas realizaciones, el primer sitio de unión de la molécula de anticuerpo se une a uno de A33, CAMPATH-1 (CDw52), antígeno carcinoembrionario (CEA), carboanhidrasa IX (MN/CA IX), CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, CDCP1, Her3, proteoglicano 4 de condroitín sulfato (CSPG4, proteoglicano de condroitín sulfato asociado a melanoma), CLEC14, Derlin1, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFR de2-7, EGFRvIII, EpCAM, Endogлина, Ep-CAM, proteína activadora de fibroblasto (FAP), proteína de unión a folato, G250, tirosina quinasa 3 de tipo Fms (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R (CD115), frizzled 1-10, Her2/neu, HLA-DR, IGFR, receptor de IL-2, IL3R, MCSP (proteoglicano de condroitín sulfato de la superficie celular asociado a melanoma), Muc-1, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno específico de próstata (PSA), TAG-72, Tenascina, Tem1-8, Tie2 y VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR- α (CD140a), PDGFR- β (CD140b) y el segundo sitio de unión se une a una molécula receptora específica de células T y/o una molécula receptora específica de células citolíticas naturales (NK). En algunas realizaciones, el primer sitio de unión de la molécula de anticuerpo se une a un antígeno de superficie asociado a tumores y el segundo sitio de unión se une a uno de CD3, el receptor de células T (TCR), CD28, CD16, NKG2D, OX40, 4-1 BB, CD2, CD5 y CD95.

En algunas realizaciones, el primer sitio de unión de la molécula de anticuerpo se une a una molécula receptora específica de células T y/o una molécula receptora específica de células citolíticas naturales (NK) y el segundo sitio de unión se une a un antígeno de superficie asociado a tumores. En algunas realizaciones, el primer sitio de unión del anticuerpo se une a una molécula receptora específica de células T y/o una molécula receptora específica de células citolíticas naturales (NK) y el segundo sitio de unión se une a uno de A33, CAMPATH-1 (CDw52), antígeno carcinoembrionario (CEA), carboanhidrasa IX (MN/CA IX), CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, CDCP1, Her3, proteoglicano 4 de condroitín sulfato (CSPG4, proteoglicano de condroitín sulfato asociado a melanoma), CLEC14, Derlin1, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFR de2-7, EGFRvIII, EpCAM, Endogлина, Ep-CAM, proteína activadora de fibroblasto (FAP), proteína de unión a folato, G250, tirosina quinasa 3 de tipo Fms (FLT-3, CD135), frizzled 1-10, Her2/neu, HLA-DR, IGFR, receptor de IL-2, IL3R, MCSP (proteoglicano de condroitín sulfato de la superficie celular asociado a melanoma), Muc-1, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno específico de próstata (PSA), TAG-72, Tenascina, Tem1-8, Tie2 y VEGFR2. En algunas realizaciones, el primer sitio de unión del anticuerpo se une a uno de CD3, el receptor de células T (TCR), CD28, CD16, NKG2D, OX40, 4-1BB, CD2, CD5 y CD95, y el segundo sitio de unión se une a un antígeno de superficie asociado a tumores.

El término "glicosilación" significa la unión de oligosacáridos (carbohidratos que contienen dos o más azúcares sencillos unidos entre sí, por ejemplo, de dos a aproximadamente doce azúcares sencillos unidos entre sí) a una glicoproteína. Las cadenas laterales de oligosacárido típicamente están unidas al esqueleto de la glicoproteína a través de enlaces N u O. Los oligosacáridos de anticuerpos desvelados en el presente documento generalmente están unidos a un dominio CH2 de una región Fc como N-oligosacáridos. "N-glicosilación" se refiere a la unión del resto de carbohidrato a un resto de asparagina en una cadena de glicoproteína. El experto en la materia reconocerá que, por ejemplo, cada uno de los dominios CH2 de las IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 murinas así como las IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humanas tienen un solo sitio de N-glicosilación en el resto 297.

Las secuencias de dominios o regiones incluidas en una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser secuencias de cualquier especie deseada. Dependiendo del uso posterior de la molécula de anticuerpo, sin embargo, puede ser deseable en algunas realizaciones introducir alteraciones que impidan efectos secundarios indeseados producidos por el anticuerpo. El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos lleva asociada la posibilidad de los problemas ahora bien establecidos de la inmunogenicidad, que significa que el sistema inmunitario del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como no propio y crear una respuesta neutralizadora. Esto es particularmente evidente tras la administración múltiple del anticuerpo no humano a un paciente humano. Se han creado diversas técnicas a lo largo de los años para solucionar estos problemas y, generalmente, implican reducir la composición de secuencias de aminoácidos no humanos en el anticuerpo intacto conservando al mismo tiempo la facilidad relativa en la obtención

de anticuerpos no humanos a partir de un animal inmunizado, por ejemplo, un ratón, rata o conejo. En general se han usado dos enfoques para conseguir esto. El primero son anticuerpos quiméricos, que generalmente tienen un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor tal como de ratón) fusionado a una región constante humana. Como el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo se define por restos dentro del dominio variable, el anticuerpo quimérico conserva su afinidad de unión por el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y, por lo tanto, puede realizar funciones efectoras tales como las descritas anteriormente. Los anticuerpos quiméricos típicamente se producen usando métodos de ADN recombinante. Se aísla ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo, ADNc) y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo de la invención). Las células de hibridoma sirven como fuente típica de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se pone en vectores de expresión que después se introducen por transfección en células hospedadoras tales como células COS de *E. coli*, células CHO o células de mieloma que de otra forma no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo las regiones constantes H y L no humanas, por ejemplo murinas, por la secuencia codificante de cadenas L y H humanas correspondientes (véase, por ejemplo Morrison; PNAS [1984] 81,6851).

El segundo enfoque implica la generación de anticuerpos humanizados en los que el contenido no humano del anticuerpo se reduce por humanización de los dominios variables. Han ganado popularidad dos técnicas de humanización. La primera es la humanización por injerto de CDR. Las CDR definen bucles (supra) y la especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características químicas de su superficie de CDR. Estas características, a su vez, se determinan por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los restos que incluyen las CDR. Puede conseguirse un gran disminución de la inmunogenicidad injertando solo las CDR de anticuerpos no humanos, por ejemplo murinos (anticuerpos "donadores") sobre regiones marco ("regiones marco aceptoras") y constantes humanas (véase Jones et al (1986) Nature 321, 522-525 y Verhoeven M et al (1988) Science 239, 1534-1536). Sin embargo, el injerto de CDR per se puede no dar como resultado la retención completa de las propiedades de unión a antígeno y con frecuencia se observa que algunos restos marco (algunas veces denominados "retromutaciones") del anticuerpo donador necesitan conservarse en la molécula humanizada si se desea recuperar una afinidad de unión a antígeno significativa (véase Queen C et al (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M et al (1991) Nature 351, 501-502). En este caso, se eligen dominios variables humanos que muestran la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donador no humano a partir de una base de datos para proporcionar la región marco humana (FR). La selección de FR humanas puede realizarse a partir de anticuerpos humanos individuales o anticuerpos humanos consenso. Cuando se sustituyen restos clave necesarios del anticuerpo donador en la región marco aceptora humana para conservar las conformaciones de CDR, puede usarse un modelado informático del anticuerpo para ayudar a identificar dichos restos importantes desde el punto de vista estructural. Véase, por ejemplo, el documento WO99/48523.

Como alternativa, la humanización puede conseguirse por un proceso de remodelación de la superficie ("veneering"). Un análisis estadístico de dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana y murina única reveló que los patrones precisos de restos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos, y las posiciones de la superficie más individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de restos diferentes (véase Padlan E. A. et al; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 y Pedersen J. T. et al (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973). Por lo tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano al reemplazar restos expuestos en sus regiones marco que difieren de los encontrados normalmente en los anticuerpos humanos. Como la antigenicidad de las proteínas puede correlacionarse con la accesibilidad de la superficie, el reemplazo de los restos de la superficie puede ser suficiente para hacer que el dominio variable de ratón sea "invisible" al sistema inmunitario humano (véase también Mark G. E. et al (1994) en Handbook of Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, págs. 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina remodelación de la superficie ("veneering") porque solo se altera la superficie del anticuerpo, permaneciendo sin alterar los restos de soporte.

Una molécula de anticuerpo de la invención puede producirse usando cualquier sistema de expresión conocido y bien establecido y la tecnología de cultivo de células recombinantes, por ejemplo, por expresión en hospedadores bacterianos (sistemas procariotas), o sistemas eucariotas tales como levaduras, hongos, células de insecto o células de mamífero. Una molécula de anticuerpo de la presente invención puede producirse en organismos transgénicos tales como una cabra, una planta o un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada por ingeniería genética que tiene fragmentos grandes de los loci de inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción de anticuerpos de ratón. Un anticuerpo también puede producirse por síntesis química.

Para la producción recombinante de una molécula de anticuerpo de la invención, típicamente se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para la clonación (amplificación) o expresión adicional. Un ejemplo ilustrativo de un sistema de expresión adecuado es un sistema glutamato sintetasa (tal como el vendido por Lonza Biologics), siendo la célula hospedadora, por ejemplo, CHO o NS0. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales. Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones y minicromosomas, de los cuales son una realización típica los plásmidos. En general, estos vectores incluyen además una secuencia

señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operativamente al polinucleótido de cadena ligera y/o pesada para facilitar la expresión. Los polinucleótidos que codifican las cadenas ligera y pesada pueden insertarse en vectores separados y transfectarse al interior de la misma célula hospedadora o, si se desea, tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector para la transfección en la célula hospedadora. Las dos cadenas pueden disponerse, por ejemplo, bajo el control de un operón dicistrónico y expresarse para dar como resultado la molécula de anticuerpo funcional y correctamente plegada como se describe en Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*, Gene 151, 131-135, o Skerra, A. (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments, Gene 141, 79-8. De esta manera, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para construir un vector que codifica las cadenas ligera y/o pesada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, incluyendo dicho método insertar en un vector, un polinucleótido que codifica una cadena ligera y/o cadena pesada de una molécula de anticuerpo de la invención.

Cuando se usan técnicas recombinantes, la molécula de anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio (véase también Skerra 1994, supra). Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el desecho en forma de partículas, bien las células hospedadoras o bien los fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. El anticuerpo también puede producirse en un entorno oxidante. Dicho entorno oxidante puede proporcionarse por el periplasma de bacterias Gram negativas tales como *E. coli*, en el medio extracelular de bacterias Gram positivas o en el lumen del retículo endoplásmico de células eucariotas (incluyendo células animales tales como células de insecto o de mamífero) y normalmente favorece la formación de enlaces disulfuro estructurales. Sin embargo, también es posible producir una molécula de anticuerpo de la invención en el citosol de una célula hospedadora tal como *E. coli*. En este caso, el polipéptido puede obtenerse directamente en un estado soluble y plegado o recuperarse en forma de cuerpos de inclusión, seguido por renaturalización *in vitro*. Otra opción es el uso de cepas hospedadoras específicas que tienen un medio intracelular oxidante, que de esta manera puede permitir la formación de enlaces disulfuro en el citosol (Venturi M, Seifert C, Hunte C. (2002) "High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm." J. Mol. Biol. 315, 1-8).

La molécula de anticuerpo producida por las células puede purificarse usando cualquier tecnología de purificación convencional, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica de purificación preferida. Las moléculas de anticuerpo pueden purificarse por purificación de afinidad con proteínas/ligandos que se unen de forma específica y reversible a dominios constantes tales como los dominios CH1 o los dominios CL. Son ejemplos de dichas proteínas bacterianas que se unen a inmunoglobulina tales como Proteína A, Proteína G, Proteína A/G o Proteína L, donde la unión de la proteína L se restringe a moléculas de anticuerpo que contienen cadenas ligera kappa. Un método alternativo para la purificación de anticuerpos con cadenas ligeras kappa es el uso de anticuerpos anti-kappa acoplados a perlas (KappaSelect). La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La Proteína A puede usarse para purificar anticuerpos (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). Se recomienda la Proteína G para todos los isotipos de ratón y para la gamma3 humana (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La elección del método de purificación que se usa para una molécula de anticuerpo particular de la invención está dentro del conocimiento del experto en la materia.

También es posible equipar a una de las cadenas de la molécula de anticuerpo de la invención con una etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad tales como Strep-tag® o Strep-tag® II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766), la etiqueta myc, la etiqueta FLAG™-tag, la etiqueta His6 o la etiqueta HA facilitan la detección y también simplifican la purificación de la molécula de anticuerpo recombinante.

Los términos "mutado", "mutante" y "mutación", cuando hacen referencia a un ácido nucleico o un polipéptido, se refieren al intercambio, delección o inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, en comparación con el ácido nucleico o polipéptido natural, es decir, con una secuencia de referencia que puede considerarse que define el tipo silvestre.

A este respecto, se entiende que el término "posición", cuando se usa de acuerdo con la presente invención, significa la posición de un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento. Esta posición puede indicarse con respecto a una secuencia nativa parecida, por ejemplo, una secuencia de una cadena o dominio de IgG natural. El término "correspondiente", como se usa en el presente documento, también incluye que una posición no está determinada necesariamente, o no solo, por el número de nucleótidos/aminoácidos precedentes. De esta manera, la posición de un aminoácido dado de acuerdo con la presente invención que puede sustituirse puede variar debido a la delección o adición de aminoácidos en cualquier sitio en la cadena de anticuerpo.

De esta manera, por una "posición correspondiente" de acuerdo con la presente divulgación se entiende que los aminoácidos pueden diferir en el número indicado, pero pueden seguir teniendo aminoácidos extraños similares.

Dichos aminoácidos que pueden intercambiarse, delecionarse o añadirse también se incluyen en la expresión "posición correspondiente". Para determinar si un resto de aminoácido en una secuencia de aminoácidos dada corresponde a cierta posición en la secuencia de aminoácidos de un dominio o cadena de inmunoglobulina natural, el experto en la materia puede usar medios y métodos bien conocidos en este campo, por ejemplo, alineamientos, bien manuales o bien mediante el uso de programas informáticos tales como BLAST2.0, que significa Basic Local Alignment Search Tool o ClustalW o cualquier otro programa adecuado que sea apropiado para generar alineamientos de secuencia.

En algunas realizaciones, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. En general, son sustituciones conservativas las siguientes sustituciones, indicadas con el aminoácido a mutar seguido de uno o más reemplazos que pueden considerarse conservativos: Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu. También son posibles otras sustituciones y pueden determinarse empíricamente o de acuerdo con otras sustituciones conservativas o no conservativas conocidas. Como orientación adicional, cada uno de los ocho grupos siguientes contienen aminoácidos que típicamente puede considerarse que definen sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (Ala), Glicina (Gly);
- 2) Ácido aspártico (Asp), Ácido glutámico (Glu);
- 3) Asparagina (Asn), Glutamina (Gln);
- 4) Arginina (Arg), Lisina (Lys);
- 5) Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Metionina (Met), Valina (Val);
- 6) Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr), Triptófano (Trp);
- 7) Serina (Ser), Treonina (Thr); y
- 8) Cisteína (Cys), Metionina (Met)

Si estas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, tales como los siguientes, o como se describen adicionalmente más adelante haciendo referencia a las clases de aminoácidos, y los productos pueden seleccionarse por una característica deseada. Son ejemplos de dichos cambios más sustanciales: Ala → Leu, Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, Norleucina; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala.

En algunas realizaciones, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención incluye uno o más restos de aminoácido, incluyendo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho restos de aminoácido, que están mutados para impedir la dimerización a través de restos de cisteína o para modular la función de Fc. En algunas de estas realizaciones, están mutados uno o más restos de aminoácido del dominio CH2 y/o de la región de bisagra que puede mediar la unión a receptores Fc. Si están presentes, dichos uno o más restos de aminoácidos capaces de mediar la unión a receptores Fc pueden ser un resto de aminoácido que puede activar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad mediada por el complemento (CDC). En algunas realizaciones, un resto de aminoácido respectivo capaz de mediar la unión a receptores Fc se sustituye por otro aminoácido, generalmente cuando se compara la secuencia con la secuencia de un dominio natural correspondiente de una inmunoglobulina, tal como una IgG. En algunas realizaciones, dicho resto de aminoácido capaz de mediar la unión a receptores Fc está delecionado, generalmente con respecto a la secuencia de un dominio natural correspondiente en una inmunoglobulina, tal como una IgG. Sin embargo, en otras realizaciones de la invención que están relacionadas con una molécula de anticuerpo biespecífica que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fv monocatenario y un dominio CH2 de inmunoglobulina, está dentro del alcance de la invención introducir mutaciones en el dominio CH2 de $\gamma 1$ humana, por ejemplo, que optimizan la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Dichas mutaciones se describen en las solicitudes de patente internacional WO2011/076922 y WO2011/089211, por ejemplo.

En algunas realizaciones, dichos uno o más restos de aminoácido mutados, por ejemplo, sustituidos o delecionados, son un aminoácido localizado en una de las posiciones 226, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 297, 327 y 330. De nuevo, la numeración de aminoácidos usada corresponde a las posiciones de secuencia de acuerdo con la numeración de Kabat [Índice EU]. Una delección correspondiente de un aminoácido puede ser, por ejemplo, una delección del aminoácido 228, generalmente una prolina en IgG, una delección del aminoácido 229, generalmente una cisteína en IgG, una delección del aminoácido 230, generalmente una prolina en IgG, una delección del aminoácido 231, generalmente una alanina en IgG, una delección del aminoácido 232, generalmente una prolina en IgG, una delección del aminoácido 233, generalmente un ácido glutámico en IgG, una delección del aminoácido 234, generalmente una leucina en IgG, una delección del aminoácido 235, generalmente una leucina en IgG, una delección del aminoácido 236, generalmente una glicina en IgG, una delección del aminoácido 237, generalmente una glicina en IgG, una delección del aminoácido 238, generalmente una prolina en IgG y una delección del aminoácido 265, generalmente un ácido aspártico en IgG. Una sustitución correspondiente de un aminoácido puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido 226, generalmente una cisteína en IgG, una sustitución del aminoácido 228, generalmente una prolina en IgG, una sustitución del aminoácido 229, generalmente una cisteína en IgG, una

sustitución del aminoácido 230, generalmente una prolina en IgG, una sustitución del aminoácido 231, generalmente una alanina en IgG, una sustitución del aminoácido 232, generalmente una prolina en IgG, una sustitución del aminoácido 233, generalmente un ácido glutámico en IgG, una sustitución del aminoácido 234, generalmente una leucina en IgG, una sustitución del aminoácido 235, generalmente una leucina en IgG, una sustitución del aminoácido 265, generalmente un ácido aspártico en IgG, una sustitución del aminoácido 297, generalmente una asparagina en IgG, una sustitución del aminoácido 327, generalmente una alanina en IgG, y una sustitución del aminoácido 330, generalmente una alanina en IgG. Una sustitución respectiva puede ser una de las sustituciones Cys226→Ser, sustitución Cys229→Ser, sustitución Glu233→Pro, sustitución Leu234→Val, sustitución Leu235→Ala, sustitución Asp265→Gly, sustitución Asn297→Gln, sustitución Ala327→Gln, sustitución Ala327→Gly y sustitución Ala330→Ser. Como puede deducirse de lo anterior, en algunas realizaciones uno o dos de los restos de cisteína en las posiciones 226 y 229 en la región de bisagra se sustituyen por otro aminoácido, por ejemplo, se sustituyen por un resto de serina. De esta manera, puede prevenirse la formación de un enlace disulfuro con otra cadena principal. Además, y como también se explica más adelante, la delección y/o sustitución (mutación) de restos de aminoácidos seleccionados en el dominio CH2 que puede mediar la unión a receptores Fc puede hacer que una molécula de anticuerpo de la invención tenga una actividad menor o nula en términos de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y fijación del complemento.

Otro tipo de variante de aminoácidos de un anticuerpo altera el patrón de glicosilación original (si lo hay) de la molécula de anticuerpo. Por alteración se entiende la delección de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de anticuerpos típicamente es una N-glicosilación u O-glicosilación. La N-glicosilación se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a una cadena lateral de asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La O-glicosilación se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, la mayoría de las veces serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo convenientemente se realiza alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de N-glicosilación). La alteración también puede realizarse por la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de O-glicosilación).

En el contexto de la presente invención, en algunas realizaciones, la parte de la cadena principal de la molécula de anticuerpo de la invención, que representa la región Fc de una inmunoglobulina, es típicamente inerte, o al menos esencialmente de baja influencia, con respecto a la unión a receptores Fc. Como se ha dicho, esto se consigue delecionando y/o sustituyendo (mutando) al menos uno de los restos de aminoácido seleccionados en el dominio CH2 que pueden mediar la unión a un receptor Fc. Dichas moléculas también se denominan en el presente documento moléculas de anticuerpo "atenuado en Fc" o moléculas de anticuerpo "Fc^{ko}". De esta manera, la parte de una cadena de anticuerpo de acuerdo con la invención que puede considerarse que representa una parte de un fragmento Fc, es decir, el dominio CH2, podría definir un "soporte" sin proporcionar una función biológica particular tal como una función efectora, por ejemplo. Sin embargo, se ha descubierto en la presente invención que este soporte puede proporcionar ventajas significativas en términos de purificación, eficacia de producción y/o estabilidad de las moléculas de anticuerpo de la invención en comparación con moléculas de anticuerpo conocidas (véanse los Ejemplos).

En algunas realizaciones, el reconocimiento y, por consiguiente, la unión de esta parte correspondiente a Fc a un receptor Fc dado es de aproximadamente 2 veces menor, aproximadamente 5 veces menor, aproximadamente 8 veces menor, aproximadamente 10 veces menor, aproximadamente 12 veces menor, aproximadamente 15 veces menor, aproximadamente 20 veces menor o más veces menor que las de la región Fc de una inmunoglobulina natural. En algunas realizaciones, esta parte correspondiente de Fc carece completamente de su capacidad de unirse a receptores Fc. La unión de un anticuerpo a receptores Fc, incluyendo la determinación de una constante de disociación, puede determinarse fácilmente por el experto en la materia usando técnicas convencionales tales como resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando una medición Biacore™. De forma similar, puede usarse cualquier otro método para medir la unión biomolecular que, por ejemplo, puede basarse en medios espectroscópicos, fotoquímicos, fotométricos o radiológicos. Son ejemplos para los métodos de detección correspondientes espectroscopía de correlación de fluorescencia, reticulación fotoquímica y el uso de marcadores fotoactivos o radiactivos respectivamente. Algunos de estos métodos pueden incluir técnicas de separación adicionales tales como electroforesis o HPLC.

Cuando se requiera, puede realizarse una sustitución o delección de restos de aminoácido, como se ha explicado anteriormente para este efecto. Las mutaciones adecuadas pueden tomarse de Armour et al. (Eur. J. Immunol. [1999] 29, 2613-2624), por ejemplo. Pueden tomarse otras posiciones adecuadas para mutaciones en una secuencia de una cadena de anticuerpo a partir de los datos de estructura cristalina publicados sobre el complejo entre FcγRIII y el fragmento Fc de IgG1 humana (Sondermann et al., Nature [2000] 406, 267-273). Además de medir la afinidad de unión como se ha descrito anteriormente para evaluar el nivel de "atenuación de Fc" o pérdida de afinidad de unión, también es posible evaluar funcionalmente la capacidad (o falta de capacidad) de mediar la unión a un receptor Fc.

En el caso de moléculas de anticuerpo que se unen a CD3 como una diana, es posible, por ejemplo, evaluar la unión a través de la mitogenicidad de dichas moléculas de anticuerpo de unión a CD3 en las células. La mitogenicidad está mediada por la unión de anticuerpos CD3 a los receptores Fc en células accesorias tales como monocitos. Si una molécula de anticuerpo de la invención que tiene un sitio de unión para CD3 no muestra ningún efecto mitogénico mientras que el anticuerpo anti-CD3 monoclonal parental que tiene una parte Fc funcional induce una mitosis fuerte en las células T, está claro que, debido a la ausencia de mitosis, la molécula de anticuerpo de la invención carece de la capacidad de unión a Fc y, por lo tanto, puede considerarse una molécula "knock-out para Fc". Se han descrito ejemplos ilustrativos de un método para evaluar la mitogenicidad mediada por anti CD3 por Davis, Vida y Lipsky (J.Immunol (1986) 137, 3758), y por Ceuppens, JL, y van Vaeck, F, (véase J.Immunol. (1987) 139, 4067, o Cell. Immunol. (1989) 118, 136). Se han descrito otros ejemplos adecuados ilustrativos de un ensayo para evaluar la mitogenicidad de un anticuerpo por Rosenthal-Allieri et al. (Rosenthal-Allieri MA, Ticcioni M, Decked M, Breittmeyer JP, Rochet N, Rouleaux M, y Senik A, Bernerd A, Cell Immunol. 1995 163(1):88-95) y Grosse-Hovest et al. (Grosse-Hovest L, Hartlapp I, Marwan W, Brem G, Rammensee H-G, y Jung G, Eur J Immunol. [2003] May;33(5):1334-1340). Además, la ausencia de unión de Fc puede evaluarse por la capacidad de una molécula de anticuerpo de la invención de mediar una o más de las funciones efectoras bien conocidas de la parte Fc.

Como se ha indicado anteriormente, pueden realizarse sustituciones o deleciones de restos de cisteína para introducir o retirar uno o más enlaces disulfuro, incluyendo la introducción o eliminación de un enlace disulfuro potencial o previamente existente. Por lo tanto, el enlace entre una cadena principal y una cadena de peso menor/longitud más corta de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención puede controlarse, incluyendo establecerse, reforzarse o anularse. Al introducir o retirar uno o más restos de cisteína, puede introducirse o retirarse un puente disulfuro. Como ejemplo ilustrativo, una molécula de anticuerpo tetramérica de acuerdo con la divulgación generalmente tiene uno o más enlaces disulfuro que se unen a dos moléculas de anticuerpo diméricas. Uno de estos enlaces disulfuro típicamente se define por una cisteína en la cadena principal de una primera molécula de anticuerpo dimérica y una cisteína en la región de bisagra de una segunda molécula de anticuerpo dimérica. A este respecto, en algunas realizaciones, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede incluir una sustitución de aminoácidos de un resto de cisteína nativo en las posiciones 226 y/o 229, con respecto a la secuencia de inmunoglobulina IgG humana de acuerdo con la numeración de Kabat [Índice EU], por otro resto de aminoácido.

También pueden realizarse sustituciones o deleciones de restos de aminoácido tales como arginina, asparagina, serina, treonina o tirosina para modificar el patrón de glicosilación de un anticuerpo. Como ejemplo ilustrativo, una molécula de IgG tiene un solo carbohidrato biantenar unido a N en Asn297 del dominio CH2. En el caso de la IgG de suero o producida *ex vivo* en hibridomas o células modificadas por ingeniería genética, las IgG son heterogéneas con respecto al carbohidrato unido a Asn297. En el caso de la IgG humana, el oligosacárido del núcleo típicamente consiste en GlcNAc₂Man₃GlcNAc, con números diferentes de restos externos.

Como se ha indicado, además de la unión a antígenos/epítomos, se sabe que una inmunoglobulina tiene "funciones efectoras" adicionales, actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de una inmunoglobulina, y varían con el isotipo de inmunoglobulina. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptores de células B); y activación de células B. Ejercer funciones efectoras de un anticuerpo generalmente implica reclutar células efectoras. Varias funciones efectoras de inmunoglobulinas están mediadas por receptores Fc (FcR), que se unen a la región Fc de un anticuerpo. Los FcR se definen por su especificidad por isotipos de inmunoglobulina; los receptores Fc para anticuerpos IgG se denominan FcγR, en el caso de IgE FcεR, en el caso de IgA FcαR y así sucesivamente. Cualquiera de estas funciones efectoras (o la pérdida de dichas funciones efectoras) tales como CDC o ADCC puede usarse para evaluar si una molécula de anticuerpo de la invención carece de la capacidad de unirse a Fc.

En este contexto, debe indicarse que la expresión "receptor Fc" o "FcR" define un receptor, generalmente una proteína, que es capaz de unirse a la región Fc de un anticuerpo. Los receptores Fc se encuentran en la superficie de ciertas células del sistema inmunitario de un organismo, por ejemplo células citolíticas naturales, macrófagos, neutrófilos y mastocitos. Los receptores de Fc *in vivo* se unen a inmunoglobulinas que están inmovilizadas en células infectadas o presentes en patógenos invasores. Su actividad estimula a las células fagocíticas o citotóxicas para que destruyan microbios o células infectadas por fagocitosis mediada por anticuerpos o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Algunos virus tales como flavivirus usan receptores Fc para ayudarlos a infectar a las células, por medio de un mecanismo conocido como potenciación de la infección dependiente de anticuerpos. Los FcR se han revisado en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas et al, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1997).

La expresión "sistema del complemento" se usa en la técnica para hacer referencia a varias proteínas pequeñas — denominadas factores del complemento — que se encuentran en la sangre, generalmente circulantes como precursores inactivos (pro-proteínas). La expresión se refiere a la capacidad de este sistema inalterable y no adaptable de "complementar" la capacidad de anticuerpos y células fagocíticas de eliminar patógenos tales como bacterias, así como complejos de antígeno-anticuerpo, de un organismo. Un ejemplo de factores del complemento es el complejo C1, que incluye C1q y dos serina proteasas, C1r y C1s. El complejo C1 es un componente de la vía CDC. C1q es una molécula hexavalente con un peso molecular de aproximadamente 460.000 y una estructura parecida a un ramo de tulipanes en el que seis "tallos" de colágeno están conectados a seis regiones de cabeza globulares. Para activar la cascada del complemento, C1q tiene que unirse al menos a dos moléculas de IgG1, IgG2 o IgG3.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretadas unidas a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas - tales como células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos - permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva un antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son necesarios para destruir la célula diana por este mecanismo. Las células primarias para mediar la ADCC, células NK, expresan únicamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen, pero sin limitación, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). En algunas realizaciones, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes et al., *PNAS USA* 95: 652-656 (1998).

Varias funciones efectoras de anticuerpo están mediadas por receptores Fc (FcR), que se unen a la región Fc de un anticuerpo. Los FcR se definen por su especificidad por isotipos de inmunoglobulina; los receptores Fc para anticuerpos IgG se denominan FcγR, en el caso de IgE FcεR, en el caso de IgA FcαR y así sucesivamente. Se han identificado tres subclases de FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16).

Volviendo ahora a los ácidos nucleicos de la invención, una molécula de ácido nucleico que codifica una o más cadenas de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser cualquier ácido nucleico en cualquier configuración posible, tal como monocatenario, bicatenario o una combinación de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN, moléculas de ARN, análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos o usando química de ácidos nucleicos, moléculas de ácido nucleico bloqueadas (LNA) y moléculas de proteína y ácido nucleico (PNA). El ADN o ARN puede ser de origen genómico o sintético y puede ser mono o bicatenario. Dicho ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ARNm, ARNc, ARN sintético, ADN genómico, ADNc, ADN sintético, un copolímero de ADN y ARN, oligonucleótidos, etc. Un ácido nucleico respectivo puede contener además análogos de nucleótidos no naturales y/o estar unido a una etiqueta de afinidad o un marcador.

En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena, tal como una cadena principal y/o una cadena más pequeña de un anticuerpo de acuerdo con la invención se incluye en un vector tal como un plásmido. Cuando se incluye una sustitución o delección en una cadena de anticuerpo, en comparación con un dominio o región natural de un anticuerpo, la secuencia codificante del dominio/región nativa respectiva, por ejemplo, incluida en la secuencia de una inmunoglobulina, puede usarse como punto de partida para la mutagénesis. Para la mutagénesis de posiciones de aminoácidos seleccionadas, el experto en la materia tiene a su disposición los diversos métodos convencionales establecidos para mutagénesis dirigida. Una técnica usada comúnmente es la introducción de mutaciones por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando mezclas de oligonucleótidos sintéticos, que llevan una composición de bases degeneradas en las posiciones de la secuencia deseada. Por ejemplo, el uso del codón NNK o NNS (donde N = adenina, guanina o citosina o timina; K = guanina o timina; S = adenina o citosina) permite la incorporación de los 20 aminoácidos más el codón de terminación ámbar durante la mutagénesis, mientras que el codón VVS limita el número de aminoácidos posiblemente incorporados a 12, ya que excluye la incorporación de los aminoácidos Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val en la posición seleccionada de la secuencia polipeptídica; el uso del codón NMS (donde M = adenina o citosina), por ejemplo, restringe el número de aminoácidos posibles a 11 en una posición de la secuencia seleccionada ya que excluye la incorporación de los aminoácidos Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val en una posición de la secuencia seleccionada. A este respecto, debe indicarse que en un ácido nucleico de una molécula de anticuerpo, también pueden incorporarse ciertos codones de otros aminoácidos (distintos de los 20 aminoácidos naturales habituales) tales como selenocisteína o pirrolisina. También es posible, como se describe por Wang, L., et al. (2001) *Science* 292, 498-500, o Wang, L., y Schultz, P.G. (2002) *Chem. Comm.* 1, 1-11, usar codones "artificiales", tales como UAG, que normalmente se reconocen como codones de terminación para insertar otros aminoácidos no habituales, por ejemplo, o-metil-L-tirosina o p-aminofenilalanina.

El uso de bloques de construcción de nucleótidos con especificidad de pares de bases reducida, como por ejemplo inosina, 8-oxo-2'-desoxiguanosina o 6(2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-3,4-dihidro-8H-pirimidin-2,1,2-oxazina-7-ona (Zaccolo et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 589-603), es otra opción para la introducción de mutaciones en un segmento

de secuencia elegido. Otra posibilidad es la denominada mutagénesis de tripletes. Este método usa mezclas de diferentes tripletes de nucleótidos, cada uno de los cuales codifica un aminoácido, para la incorporación en la secuencia codificante (Virnekäs B, et al., 1994 Nucleic Acids Res 22, 5600-5607).

5 Una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena, tal como una cadena principal y/o una cadena más pequeña de un anticuerpo de acuerdo con la invención, puede expresarse usando cualquier sistema de expresión adecuado, por ejemplo, en una célula hospedadora adecuada o en un sistema sin células. La molécula de anticuerpo obtenida se enriquece por medio de selección y/o aislamiento.

10 Como se ha explicado anteriormente, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención puede dirigirse contra cualquier epítipo/antígeno diana deseado. Dependiendo de los epítopos/antígenos seleccionados, el anticuerpo puede ser adecuado en el tratamiento o prevención de una enfermedad. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede usarse en un método para tratar y/o prevenir una situación médica tal como un trastorno o una enfermedad. En realizaciones en las que uno de los anticuerpos incorporados en una
15 molécula biespecífica es capaz de activar células inmunitarias de una manera dependiente de FcR, puede ser particularmente útil seleccionar una molécula de anticuerpo que tenga una parte correspondiente a Fc que muestre una unión reducida a receptores Fc. De esta manera se impide una activación inmunitaria indeseada mediada por la unión a FcR. En algunas realizaciones, la enfermedad a tratar o prevenir puede ser una enfermedad proliferativa. Los ejemplos de enfermedades proliferativas incluyen, pero sin limitación, malignidades hematopoyéticas, tales como leucemias mieloides y linfáticas agudas y crónicas, así como linfomas o tumores sólidos. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen, pero sin limitación, tumores del tracto gastrointestinal, huesos, pulmón, riñón, próstata, mama, cerebro, ovario, útero, testículos, tumores mesenquimáticos y piel, tales como melanoma.

25 La invención también proporciona una composición farmacéutica que incluye una molécula de anticuerpos de la invención y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención puede administrarse por cualquier vía parenteral o no parenteral (entérica) que sea terapéuticamente eficaz para fármacos proteicos. Los métodos de aplicación parenterales incluyen, por ejemplo, técnicas de infusión e inyección intracutánea, subcutánea, intramuscular,
30 intratraqueal, intranasal, intravítrea o intravenosa, por ejemplo, en forma de soluciones de inyección, soluciones de infusión o tinturas, así como una instalación de aerosol e inhalación, por ejemplo, en forma de mezclas de aerosol, pulverizaciones o polvos. Una visión general de la liberación de fármacos en el pulmón, por ejemplo, por inhalación de aerosoles (que también pueden usarse en la administración intranasal) o instilación traqueal se proporciona por J.S. Patton et al. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. Proc. Amer. Thoracic Soc. 2004 Vol. 1
35 páginas 338-344, por ejemplo). Son modos de administración no parenteral, por ejemplo, la vía oral, por ejemplo, en forma de píldoras, comprimidos, cápsulas, soluciones o suspensiones, o la vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios. Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden administrarse por vía sistémica o tópica en formulaciones que contienen excipientes o portadores, aditivos y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, cuando se desee.

40 En una realización de la presente invención, el producto farmacéutico se administra por vía parenteral a un mamífero y, en particular, a seres humanos. Los métodos de administración correspondientes incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, técnicas de inyección e infusión intracutáneas, subcutáneas, intramusculares, intratraqueales o intravenosas, por ejemplo, en forma de soluciones de inyección, soluciones de infusión o tinturas, así como
45 instalación e inhalación de aerosoles, por ejemplo, en forma de mezclas de aerosol, pulverizaciones o polvos. Una combinación de infusión y/o inyección intravenosa y subcutánea podría ser lo más conveniente en el caso de compuestos con una semivida en suero relativamente corta. La composición farmacéutica puede ser una solución acuosa, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.

50 A este respecto, debe indicarse que también pueden usarse tecnologías de administración transdérmica, por ejemplo, iontoforesis, sonoforesis o liberación con ayuda de microagujas, como se describe en Meidan VM y Michniak BB 2004 Am. J. Ther. 11 (4): 312-316, para la administración transdérmica de una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento. Son modos de administración no parenteral, por ejemplo, la administración oral, por ejemplo, en forma de píldoras, comprimidos, cápsulas, soluciones o suspensiones, o la administración rectal, por
55 ejemplo, en forma de supositorios. Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden administrarse por vía sistémica o tópica en formulaciones que contienen una diversidad de excipientes o portadores, aditivos y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales.

La dosificación de la molécula de anticuerpo aplicada puede variar dentro de amplios límites para conseguir el efecto preventivo o la respuesta terapéutica deseada. Por ejemplo, dependerá de la afinidad de la molécula de anticuerpo por una diana elegida así como de la semivida del complejo entre la molécula de anticuerpo y el ligando *in vivo*. Además, la dosificación óptima dependerá de la biodistribución de la molécula de anticuerpo o un conjugado de la misma, el modo de administración, la gravedad de la enfermedad/trastorno a tratar así como la situación médica del paciente. Por ejemplo, cuando se usa en una pomada para aplicaciones tópicas, puede usarse una alta
65 concentración de la molécula de anticuerpo. Sin embargo, si se desea, la molécula de anticuerpo también puede administrarse en una formulación de liberación sostenida, por ejemplo, dispersiones en liposomas o microesferas de

polímero basadas en hidrogel, tales como PolyActive™ u OctoDEX™ (véase Bos et al., Business Briefing: Pharmatech 2003: 1-6). Son otras formulaciones de liberación sostenida disponibles, por ejemplo, polímeros basados en PLGA (PR pharmaceuticals), hidrogeles basados en PLA-PEG (Medincell) y polímeros basados en PEA (Medivas).

Por consiguiente, las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden formularse en composiciones usando ingredientes farmacéuticamente aceptables así como métodos de preparación establecidos (Gennaro, A.L. y Gennaro, A.R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed., Lippincott Williams y Wilkins, Philadelphia, PA). Para preparar las composiciones farmacéuticas, pueden usarse excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente inertes. Para preparar por ejemplo, píldoras, polvos, cápsulas de gelatina o supositorios, pueden usarse, por ejemplo, lactosa, talco, ácido esteárico y sus sales, grasas, ceras, polioles sólidos o líquidos, y aceites naturales e hidrogenados. Los excipientes adecuados para la producción de soluciones, suspensiones, emulsiones, mezclas de aerosol o polvos para reconstitución en soluciones o mezclas de aerosol antes del uso incluyen agua, alcoholes, glicerol, polioles y mezclas adecuadas de los mismos, así como aceites vegetales.

La composición farmacéutica también puede contener aditivos tales como, por ejemplo, cargas, aglutinantes, agentes humectantes, deslizantes, estabilizantes, conservantes, emulsionantes y otros disolventes o solubilizantes o agentes para conseguir un efecto de depósito. Esto último supone que pueden incorporarse proteínas de fusión en sistemas de liberación lenta o sostenida o dirigida, tales como liposomas y microcápsulas.

Las formulaciones pueden esterilizarse por numerosos medios, incluyendo filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio estéril justo antes del uso.

En medicina existen numerosas aplicaciones posibles para la molécula de anticuerpo de la invención. Además de su uso en diagnósticos *in vitro* o en la liberación de fármacos, puede generarse una molécula de anticuerpo de la invención que se une, por ejemplo, a moléculas de la superficie celular específicas de tejido o de tumores.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplo I

Se generó una molécula bivalente atenuada en Fc biespecífica, también denominada del formato bsFc^{ko}-1/2, con especificidad de tumor X CD3, como se representa esquemáticamente en la **Figura 1E**. Se introdujeron modificaciones de aminoácidos en la región de bisagra y del dominio C_H2 como se muestra en la **Figura 1O**. Se generaron moléculas tetravalentes atenuadas en Fc biespecíficas, también denominadas del formato bsFc^{ko}-1, con especificidad de tumor X CD3, como se representa esquemáticamente en la **Figura 1G**. Se introdujeron modificaciones de aminoácidos en la región de bisagra y del dominio C_H2 como se muestra en la **Figura 1P**.

Se realizó la clonación y amplificación de plásmidos usando DH5α de *Escherichia coli* (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). La construcción de los vectores respectivos se representa en la Figura 2.

La cotransfección de vectores de expresión que codificaban cadenas principal y más pequeña, que también pueden denominarse cadenas pesada y ligera, de las especificidades indicadas se realizó en células de plasmocitoma Sp2/0, obtenidas de la Colección American de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Para la construcción de los vectores respectivos, se hace referencia a la Figura 2 (véase también el Ejemplo II mostrado más adelante). Las células se cultivaron en medio IMDM, complementado con suero fetal bovino al 10 % (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), estreptomycin y penicilina al 1 % (Lonza, Basel, Suiza). Los transfectantes estables se seleccionaron añadiendo 1 mg/ml de G418 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

Se purificaron anticuerpos biespecíficos a partir de sobrenadantes de cultivos de células transfectadas de forma estable mediante cromatografía de afinidad usando proteína A para el formato Fc^{ko}-1 y KappaSelect para el formato bsFc^{ko}-1/2 (los dos medios de cromatografía se obtuvieron de GE Healthcare, Munich, Alemania).

Ejemplo II

Se combinaron regiones de inmunoglobulina V con las regiones C constantes deseadas en un vector de expresión. El procedimiento de clonación indicado en el presente documento permite la introducción de regiones V de Ig completas y su expresión en células linfoides sin ninguna alteración de su secuencia de aminoácidos. Para este fin, se usó la secuencia de nucleótidos de un fragmento VDJ y VJ de un anticuerpo monoespecífico para diseñar pares de cebadores (C C'; D D'; Tabla 1). Los fragmentos de ADN reamplificados de los segmentos V se digirieron (VJ directamente y VDJ después de la reamplificación con el par de cebadores E E' Tabla 1) con nucleasas de restricción apropiadas (resumidas en la Tabla 1) y después se ligaron en los vectores de expresión. Como alternativa, los dominios V se sintetizaron como fragmentos de ADN en GeneArt, Regensburg, Alemania. Este método se usó para genes que codificaban las regiones V del anticuerpo dirigido a EGFR (clon C225). Los vectores

(Figura 2) contienen genes de región constante de cadena pesada humana y de cadena ligera humana. De esta manera, la inserción de los segmentos V amplificados y digeridos reconstituye la organización genómica original de los genes de Ig en los vectores sin alterar ningún aminoácido de las regiones V.

5 El vector original para la cadena pesada contiene la cadena pesada de Ig de isotipo $\gamma 1$ humana (Figura 2A). Se introdujeron sitios de restricción en las posiciones requeridas en intrones para intercambiar el fragmento AatII-Clal con el fragmento VDJ de la cadena pesada de anticuerpos monoclonales 4G8 (anti-Flt3), BV10 (anti-FLT3), 4G7 (anti-CD19), C225 (anti-EGFR) y 9.2.27 (anti-CSPG4) o cualquier otro anticuerpo monoclonal. La región relevante para la clonación del fragmento VDJ se muestra ampliada en la Figura 2B. El fragmento a intercambiar contiene partes del primer intrón con un sitio de restricción AatII, el segundo exón de la secuencia líder, la región VDJ y parte del intrón de cadena pesada con el sitio de restricción Clal. Para la sustitución de todos los exones de la región constante de la cadena pesada $\gamma 1$ humana, se introdujeron sitios de restricción en la posición requerida en el intrón de cadena pesada (MluI) y en la región poliA de la cadena pesada 5'-UTR (región pA; SpeI), como se muestra en la Figura 2A y 2C.

15 Además, con los vectores de expresión construidos, es posible intercambiar la región constante entera del isotipo Ig $\gamma 1$ humano (fragmento MluI-SpeI; véase la Figura 2A) contra regiones constantes de todos los demás isotipos de anticuerpo o contra partes Fc con función efectora optimizada o reducida. En el caso de anticuerpos optimizados para desencadenar ADCC, se introdujeron sustituciones de aminoácidos en el dominio CH2 de la región constante $\gamma 1$ humana como se muestra en las solicitudes de patente Internacionales WO2011/076922 y WO2011/089211. Para generar anticuerpos biespecíficos como se representa en las Figuras 1A-N, pueden insertarse fragmentos de ADN flanqueados por MluI y SpeI que contienen exones que codifican dominios constantes de tipo silvestre o modificados de la cadena pesada de Ig. El fragmento MluI-SpeI a intercambiar se muestra ampliado en la Figura 2C. Puede incluirse la adición de la segunda especificidad de antígeno de un anticuerpo biespecífico, fragmentos scFv en orientación VH-VL o VL-VH mediante los sitios de enzimas de restricción BspEI y SpeI, como también se muestra en la Figura 2A. La región relevante para la clonación de un fragmento scFv en orientación VL-VH se muestra ampliada en la Figura 2C. Se generaron fragmentos scFv con la especificidad por CD3 (clon humanizado UCHT1; orientación VL-VH), CD28 (clon 9.3; orientación VL-VH), TCR α/β (clon BMA031; orientación VH-VL) por PCR con oligonucleótidos F y F' indicados en la Tabla 2. Como alternativa, se sintetizaron como fragmentos de ADN en GeneArt, Regensburg, Alemania. Este método se usó para genes que codificaban los anticuerpos dirigidos a CD16 (clon 3G8; orientación VL-VH). El fragmento de ADN de los segmentos scFv en la orientación VH-VL y VL-VH respectivamente se digirió con las nucleasas de restricción apropiadas (resumido en la Tabla 2) y después se ligó al vector de expresión.

35 El vector original para la cadena ligera contiene la región VJ de la cadena ligera y la región C del gen κ humano (Figura 2D). Se introdujeron sitios de restricción en las localizaciones requeridas (XhoI y SpeI) para sustituir el fragmento XhoI-SpeI de cadena ligera con el fragmento VJ apropiado de la cadena ligera de anticuerpos monoclonales 4G8 (anti-FLT3), BV10 (anti-FLT3), 4G7 (anti-CD19), C225 (anti-EGFR) y 9.2.27 (anti-CSPG4) o cualquier otro anticuerpo monoclonal. La región adyacente al fragmento a intercambiar se muestra en la Figura 2E. Esta región contiene partes del segundo exón de la secuencia líder, un sitio de restricción adecuado (XhoI) para fusión en fase, la región VJ y partes del intrón de la cadena kappa con el sitio de restricción SpeI. Para reemplazar el dominio constante de la cadena ligera (CL), se introdujeron sitios de restricción en las localizaciones requeridas (PmlI y BsmBI). La región adyacente al fragmento a intercambiar se muestra ampliada en la Figura 2F. Esta región contiene partes del intrón de la cadena kappa, un sitio de restricción adecuado (PmlI), la región CL y partes de la región poliA (región pA) de la cadena kappa región 3'-UTR con el sitio de restricción (BsmBI).

Tabla 1: Oligonucleótidos usados para la amplificación de segmentos VDJ y VJ para la inserción en vectores de expresión

Oligonucleótidos usados para el segmento VDJ de la cadena pesada		
C	4G7-H-for	5'-ctc ttc aca ggt gtc ctc tct gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct g-3' (SEQ ID NO: 27)
C'	4G7-H-for	5'-ggg aga agg tag gac tca cct gag gag act gtg aga gtg gtg cct tgg ccc cag tag tc-3' (SEQ ID NO: 28)
C	9.2.27-H-for	5'-tct tca cag gtg tcc tct ccc agg tga agc tgc agc aat ctg gac ctg agcs' (SEQ ID NO: 29)
C'	9.2.27-H-rev	5'-aat ggg aga agg tag gac tca cct gag gag acg gtg acc gtg gtc cct tgg-3' (SEQ ID NO: 30)
C	4G8-H-for	5'-tct ctt cac agg tgt cct ctc tca ggt cca act gca gca gcc tgg ggc tga gc-3' (SEQ ID NO: 31)
C'	4G8-H-for	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac tgt gag agt ggt gcc ttg gcc cca g-3' (SEQ ID NO: 32)

Oligonucleótidos usados para el segmento VDJ de la cadena pesada		
C	BV10-H-for	5'-aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc cca ggt gca gct gaa gca gtc-3' (SEQ ID NO: 33)
C'	BV10-H-for	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc ttg acc c-3' (SEQ ID NO: 34)
E	universal for (AatII)	5'- aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc c-3' (SEQ ID NO: 35)
E'	universal rev (ClaI)	5'- tat cga ttg aga atg gga gaa ggt agg act cac-3' (SEQ ID NO: 36)
Oligonucleótidos usados para el segmento VJ de la cadena ligera		
D	4G7-L-for (XhoI)	5'- act cga gga gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct ata c-3' (SEQ ID NO: 37)
D'	4G7-L-rev (SpeI)	5'- aac tag tac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cca gca ccg aac gigs' (SEQ ID NO: 38)
D	9.2.27-L-for (XhoI)	5'- tct cga gga gac atc gag ctc act cag tct cca gct tct ttg-3' (SEQ ID NO: 39)
D'	9.2.27-L-rev (SpeI)	5'- aac tag tac tta cgt ttg atc tcc agc ttg gtg ccc cct cca aag g-3' (SEQ ID NO: 40)
D	4G8-L-for (XhoI)	5'- act cga gga gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg-3' (SEQ ID NO: 41)
D'	4G8-L-rev (SpeI)	5'- tac tag tac tta cgt ttt att tcc agc ttg gtc ccc cct cc-3' (SEQ ID NO: 42)
D	BV10-L-for (XhoI)	5'- act cga gga gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc c-3' (SEQ ID NO: 43)
D'	BV10-L-rev (SpeI)	5'- act agt act tac gtt tca gct cca gct tgg tcc cag cac cga acg tg-3' (SEQ ID NO: 44)

Los sitios de restricción se muestran en negrita y se indican por letras entre paréntesis.

Tabla 2: Oligonucleótidos usados para la amplificación de segmentos scFv para la inserción en vectores de expresión

Oligonucleótidos usados para el segmento scFv		
F	UCHT1 -for (BspEI)	5'- atc cgg aga tat cca gat gac cca gtc ccc gag ctc cct g-3' (SEQ ID NO: 45)
F'	UCHT1-rev (SpeI)	5'- tac tag tta tca cga gga gac ggt gac cag ggt tcc ttg acc cca-3' (SEQ ID NO: 46)
F	BMA031-for (BspEI)	5'- atc cgg aga agt gca gct gca gca gtc cgg ccc tga gct-3' (SEQ ID NO: 47)
F'	BMA031-rev (SpeI)	5'- tac tag tta tca ctt cag ttc cag ctt ggt gcc agc gcc gaa ggt-3' (SEQ ID NO: 48)
F	9.3-for (BspEI)	5'-atc cgg aga cat tgt gct gac cca gtc ccc tgc ctc cct gg-3' (SEQ ID NO: 49)
F'	9.3-rev (SpeI)	5'- tac tag tta tca aga gct cac agt cac tgt ggt gcc ctg gcc cca-3' (SEQ ID NO: 50)

5

Los sitios de restricción se muestran en negrita y se indican por letras entre paréntesis.

De esta manera, se obtuvieron moléculas de anticuerpo biespecíficas con FLT3xCD3 (4G8xUCHT1, BV10xUCHT1), FLT3xTCRα/β (4G8xBMA031, BV10xBMA031), FLT3xCD28 (4G8x9.3, BV10x9.3), FLT3xCD16 (4G8x3G8, BV10x3G8), CD19xCD3 (4G7xUCHT1), CD19xTCRα/β (4G7xBMA031), CD19xCD28 (4G7x9.3), CD19xCD16 (4G7x3G8), CSPG4xCD3 (9.2.27xUCHT1), CSPG4xTCRα/β (9.2.27xBMA031), CSPG4xCD28 (9.2.27x9.3), CSPG4xCD16 (9.2.27x3G8), EGFRxCD3 (C225xUCHT1), EGFRxTCRα/β (C225xBMA031), EGFRxCD28 (C225x9.3), EGFRxCD16 (C225x3G8) como bsFc^{ko}-1 tetravalentes y bsFc^{ko}-1/2 bivalentes. Las secuencias de las cadenas correspondientes se representan como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 26 y en la Figura 6.

15

La cotransfección de los vectores de expresión que codificaban la cadena pesada y ligera quimérica (IgG1/k) o cadenas pesadas modificadas en la línea celular de mieloma no productora de Ig Sp2/0 produjo transfectomas

estables que secretaban anticuerpos monoclonales biespecíficos que son capaces de unirse específicamente al antígeno deseado. La caracterización funcional de estas moléculas de anticuerpo se ilustra en los siguientes experimentos usando moléculas de anticuerpo biespecíficas FLT3xCD3, CD19×TCRα/β y CSPGxCD3.

5 Ejemplo III

Se determinó la activación de células T por los dos formatos de anticuerpo del Ejemplo I, el formato bsFc^{ko}-1/2 y el formato bsFc^{ko}-1, con y sin células REH positivas para FLT3/CD19. Los datos se muestran en la Figura 3. Las moléculas de anticuerpo biespecíficas usadas tenían el sitio de unión a FLT3 (primer sitio de unión) del clon 4G8 y un sitio de unión a CD3 (segundo sitio de unión) del clon UCHT1. La molécula de "formato bsFc^{ko}-1/2" estaba compuesta por las cadenas de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6 y la molécula de "formato bsFc^{ko}-1" estaba compuesta por las cadenas de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 26. La molécula de anticuerpo biespecífica que se une a CSPG4 y CD3 estaba en el "formato bsFc^{ko}-1/2" y estaba compuesta por las cadenas de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 18. Además, se usó una molécula de anticuerpo biespecífica en el "formato bsFc^{ko}-1/2" que se unía a CD19 y TCRα/β compuesta por las cadenas de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 15.

A) Se obtuvieron células mononucleares humanas (PBMC) a partir de sangre periférica de donantes sanos y se aislaron usando centrifugación en gradiente de densidad. Se transfirieron PBMC a placas de 96 pocillos (100.000/pocillo). Posteriormente, se añadieron células REH positivas para FLT3/CD19 irradiadas (50.000/pocillo) o medio y finalmente se añadieron anticuerpos a las concentraciones indicadas (Figura 3A). Después de 24 horas, las células se incubaron con ³H timidina (0,5 µCi/pocillo). Después de 24 horas más, las células se aplicaron en filtros de fibra de vidrio usando un recolector de células. Posteriormente se detectó la radiactividad por medio de un contador de centelleo.

B) Se incubó sangre entera heparinizada (50 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos con y sin células REH positivas para FLT3/CD19 (50.000/pocillo) y con anticuerpos a las concentraciones indicadas en la Figura 3B. Después de 24 horas, se determinó la concentración de TNF en el sobrenadante por ELISA.

Se cultivaron células REH (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Alemania) y PBMC en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 10 % (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), estreptomycin y penicilina al 1 % (Lonza, Basel, Suiza).

Ejemplo IV

Se determinó la lisis de células REH que expresaban FLT3/CD19 (Figura 4A) y células SKMel63 que expresaban CSPG (Figura 4B) por anticuerpos biespecíficos y células citotóxicas CD8+T activadas.

Se estimularon células mononucleares humanas (PBMC) usando el anticuerpo de CD3 monoespecífico UCHT1 (10 ng/ml) durante tres días. Posteriormente, se aislaron las células CD8+T activadas por selección positiva usando clasificación magnética de células. Las células se añadieron a células REH positivas para FLT3/CD19 marcadas con ⁵¹Cr (Figura 4A) o células SKMel63 positivas para CSPG4 (Figura 4B) y se incubaron con anticuerpos a las concentraciones indicadas. Después de 4 horas, se recogieron los sobrenadantes celulares en placas de centelleo y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo.

Se analizó el porcentaje de lisis específica usando las siguientes condiciones experimentales: cpm(exp)-cpm(bg)/cpm(100)-cpm(bg), donde cpm(bg) corresponde a la liberación de cromo sin anticuerpo y células efectoras, y cpm(100) corresponde a la liberación de cromo después de la incubación de las células diana con un detergente.

Las células SKMel63 se obtuvieron de Dr. B. Gückel, Klinik für Gynäkologie, University of Tübingen, Alemania.

Ejemplo V

Se comparó la agregación y la tasa de producción de anticuerpos FLT3 x CD3 (sitio de unión a FLT: clon 4G8, sitio de unión a CD3: clon UCHT1) que tenían especificidad idéntica entre tres formatos diferentes: formato monocaténario biespecífico (bs-scFv), Formato bsFc^{ko}-1/2 y Formato bsFc^{ko}-1. La molécula de anticuerpo del "formato bsFc^{ko}-1/2" estaba compuesta por las cadenas de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6 y la molécula de anticuerpo del "formato bsFc^{ko}-1" estaba compuesta por las cadenas de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 26.

Las moléculas monocaténarias biespecíficas se purificaron por cromatografía de afinidad usando proteína L.

Se realizó filtración en gel usando una columna superdex 200 PC3.2/30 y un SMARTSystem (GE-Healthcare, Munich, Alemania). Las proteínas convencionales usadas fueron catalasa (232 kDa; de hígado bovino), aldolasa (158 kDa; de músculo de conejo), albúmina (67 kDa; de suero bovino) y ribonucleasa A (13,7 kDa; de páncreas bovino). Los resultados se muestran en la Figura 5A. Es evidente por la Figura 5A que la formación de agregados es considerablemente más pronunciada si el anticuerpo se expresa como bs-scFv (tasa de agregación del 43 %) en lugar de como bsFc^{ko}-1/2 (sin agregación detectada) o bsFc^{ko}-1 (tasa de agregación del 2 %), es decir, las

moléculas de anticuerpo biespecíficas de la presente invención siguen siendo moléculas monoméricas esencialmente sin ninguna tendencia a la agregación.

Para la comparación de las tasas de producción, se introdujeron los genes que codificaban moléculas biespecíficas que contenían la especificidad por 4G8 (anti FLT3) y por UCHT1 (anti CD3) en los formatos representados en células Sp2/0 y los anticuerpos se purificaron usando cromatografía de afinidad. La cantidad de anticuerpo purificado a partir de los sobrenadantes de clones seleccionados para la producción máxima se representa en la Figura 5B. Las concentraciones de anticuerpo se determinaron por espectroscopía óptica suponiendo una densidad óptica a 280 nm de 1,4 para una concentración de anticuerpo de 1 mg/ml. Las tasas de producción para las moléculas de anticuerpo bsFcko-1/2 y bsFcko-1 fueron significativamente mayores que las correspondientes a la molécula bs-scFv respectiva.

Un experto en la materia apreciaría fácilmente que la presente invención está bien adaptada para conseguir los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes a la misma. Las composiciones, métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas y compuestos específicos descritos en el presente documento son actualmente representativos de ciertas realizaciones ejemplares y no deben considerarse limitaciones del alcance de la invención. La indicación o discusión de un documento publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe considerarse necesariamente una aceptación de que el documento forma parte del estado de la técnica o es del conocimiento común general.

La invención descrita de forma ilustrativa en el presente documento puede ponerse en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no desvelados de forma específica en el presente documento. De esta manera, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. deben considerarse en sentido amplio y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en el presente documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, sino que se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

La invención se ha descrito en el presente documento en sentido amplio y genérico. También forman parte de la invención cada una de las especies y agrupamientos subgenéricos más restringidos que están dentro de la divulgación genérica. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimine cualquier materia objeto del género, independientemente de si el material eliminado se menciona específicamente en el presente documento o no.

Dentro de las siguientes reivindicaciones se incluyen otras realizaciones. Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe de esta manera en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Lista de referencias

1. Davis, L., Vida, R. and Lipsky, P.E. Regulation of human T lymphocyte mitogenesis by antibodies to CD3, *J. Immunol.*, 137: 3758-3767, 1986.
2. Jung, G., Ledbetter, J.A. and Muller-Eberhard, H.J. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 4611-4615, 1987.
3. Jung, G. and Eberhard, H.J. An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol. Today*, 9: 257-260, 1988.
4. Staerz, U.D., Kanagawa, O. and Bevan, M.J. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells, *Nature*, 314: 628-631, 1985.
5. Perez, P., Hoffman, R.W., Shaw, S., Bluestone, J.A. and Segal, D.M. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody, *Nature*, 316: 354-356, 1985.
6. Jung, G., Honsik, C.J., Reisfeld, R.A. and Muller-Eberhard, H.J. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 4479-4483, 1986.
7. Jung, G. and Eberhard, H.J. An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol. Today*, 9: 257-260, 1988.
8. Jung, G., Freimann, U., Von, M.Z., Reisfeld, R.A. and Wilmanns, W. Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, *Eur. J. Immunol.*, 21: 2431-2435, 1991.

9. Rosenberg,S.A., Lotze,M.T., Yang,J.C., Aebersold,P.M., Linehan,W.M., Seipp,C.A. and White,D.E. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients, *Ann.Surg.*, 210: 474-484, 1989.
10. Tibben,J.G., Boerman,O.C., Massuger,L.F., Schijf,C.P., Claessens,R.A. and Corstens,F.H. Pharmacokinetics, biodistribution and biological effects of intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR F(ab')₂ in ovarian carcinoma patients, *Int.J.Cancer*, 66: 477-483, 1996.
11. Kroesen,B.J., Buter,J., Sleijfer,D.T., Janssen,R.A., van der Graaf,W.T., The,T.H., de,L.L. and Mulder,N.H. Phase I study of intravenously applied bispecific antibody in renal cell cancer patients receiving subcutaneous interleukin 2, *Br.J.Cancer*, 70: 652-661, 1994.
12. Jung,G. and Eberhard,H.J. An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol. Today*, 9: 257-260, 1988.
- 13 Jung,G., Freimann,U., Von,M.Z., Reisfeld,R.A. and Wilmanns,W. Target cell-induced T cell activation with biant trispecific antibody fragments, *Eur.J.Immunol.*, 21: 2431-2435, 1991.
- 14 Bargou,R., Leo,E., Zugmaier,G., Klinger,M., Goebeler,M., Knop,S., Noppeney,R., Viardot,A., Hess,G., Schuler, M., Einsele,H., Brandl,C., Wolf,A., Kirchinger,P., Klappers,P., Schmidt,M., Riethmuller,G., Reinhardt,C., Baeuerle, P.A. and Kufer,P. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science*, 321: 974-977, 2008.
15. Topp,M.S., Kufer,P., Gokbuget,N., Goebeler,M., Klinger,M., Neumann,S., Horst,H.A., Raff,T., Viardot,A., Schmid,M., Stelljes,M., Schaich,M., Degenhard,E., Kohne-Volland,R., Bruggemann,M., Ottmann,O., Pfeifer,H., Burmeister, T., Nagorsen,D., Schmidt,M., Lutterbuese,R., Reinhardt,C., Baeuerle,P.A., Kneba,M., Einsele,H., Riethmuller, G., Hoelzer,D., Zugmaier,G. and Bargou,R.C. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, *J.Clin.Oncol.*, 29: 2493-2498, 2011.
16. Brischwein,K., Parr,L., Pflanz,S., Volkland,J., Lumsden,J., Klinger,M., Locher,M., Hammond,S.A., Kiener,P., Kufer,P., Schlereth,B. and Baeuerle,P.A. Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class, *J.Immunother.*, 30: 798-807, 2007.
17. Bargou,R., Leo,E., Zugmaier,G., Klinger,M., Goebeler,M., Knop,S., Noppeney,R., Viardot,A., Hess,G., Schuler, M., Einsele,H., Brandl,C., Wolf,A., Kirchinger,P., Klappers,P., Schmidt,M., Riethmuller,G., Reinhardt,C., Baeuerle, P.A. and Kufer,P. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science*, 321: 974-977, 2008.
18. Topp,M.S., Kufer,P., Gokbuget,N., Goebeler,M., Klinger,M., Neumann,S., Horst,H.A., Raff,T., Viardot,A., Schmid,M., Stelljes,M., Schaich,M., Degenhard,E., Kohne-Volland,R., Bruggemann,M., Ottmann,O., Pfeifer,H., Burmeister, T., Nagorsen,D., Schmidt,M., Lutterbuese,R., Reinhardt,C., Baeuerle,P.A., Kneba,M., Einsele,H., Riethmuller, G., Hoelzer,D., Zugmaier,G. and Bargou,R.C. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, *J.Clin.Oncol.*, 29: 2493-2498, 2011.
19. Grosse-Hovest,L., Hartlapp,I., Marwan,W., Brem,G., Rammensee,H.G. and Jung,G. A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, *Eur.J.Immunol.*, 33: 1334-1340, 2003.
20. Grosse-Hovest,L., Muller,S., Minoia,R., Wolf,E., Zakhartchenko,V., Wenigerkind,H., Lassnig,C., Besenfelder,U., Muller,M., Lytton,S.D., Jung,G. and Brem,G. Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101: 6858-6863,2004.
21. Marvin,J.S. and Zhu,Z. Recombinant approaches to IgG-like bispecific antibodies, *Acta Pharmacol.Sin.*, 26:649-658, 2005.
22. Mabry,R., Lewis,K.E., Moore,M., McKernan,P.A., Bukowski,T.R., Bontadelli,K., Brender,T., Okada,S., Lum,K., West,J., Kuijper,J.L., Ardourel,D., Franke,S., Lockwood,L., Vu,T., Frank,A., Appleby,M.W., Wolf,A., Reardon,B., Hamacher,N.B., Stevens,B., Lewis,P., Lewis,K.B., Gilbertson,D.G., Lantry,M., Julien,S.H., Ostrander,C., Chan,C., Byrnes-Blake,K., Brody,J., Presnell,S., Meengs,B., Levin,S.D. and Snively,M. Engineering of stable bispecific antibodies targeting IL-17A and IL-23, *Protein Eng Des Sel*, 23: 115-127, 2010.
23. Marvin,J.S. and Zhu,Z. Recombinant approaches to IgG-like bispecific antibodies, *Acta Pharmacol.Sin.*, 26:649-658, 2005.

24. Mabry,R., Lewis,K.E., Moore,M., McKernan,P.A., Bukowski,T.R., Bontadelli,K., Brender,T., Okada,S., Lum,K., West,J., Kuijper,J.L., Ardourel,D., Franke,S., Lockwood,L., Vu,T., Frank,A., Appleby,M.W., Wolf,A., Reardon,B., Hamacher,N.B., Stevens,B., Lewis,P., Lewis,K.B., Gilbertson,D.G., Lantry,M., Julien,S.H., Ostrander,C., Chan,C., Byrnes-Blake,K., Brody,J., Presnell,S., Meengs,B., Levin,S.D. and Snavey,M. Engineering of stable bispecific antibodies targeting IL-17A and IL-23, Protein Eng Des Sel, 23: 115-127, 2010.
25. Dall'Aqua et al. "Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers" Biochemistry (1998) Volume: 37, Issue: 26, Pages: 9266-9273.
26. S.Miller Protein-Protein Recognition and the Association of Immunoglobulin Constant Domains. J.Mol.Biol. (1990) Volume 216 pp 965-973.
27. J. Deisenhofer, Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution. Biochemistry (1981) Volume 20 pp 2361-2370
- 28 Roopenian & Akilesh; FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nature Reviews Immunology (2007) Volume 7 pp:715-725.
29. Reiter Y., Brinkmann U., Kreitman R.J., Jung S-H., Lee B and Pastan I., Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions, Biochemistry 1994, 33, 6551-5459.
30. International Patent Application WO2011/076922
31. International Patent Application WO2011/089211
- LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Synimmune GbmH
- <120> Molécula de Anticuerpo Biespecifica
- <130> SYN14309PCT
- <150> US 61/577,327
- <151> 2011-12-19
- <160> 50
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia de cadena ligera, cadena ligera quimérica anti-FLT3 (clon 4G8)
- <400> 1

ES 2 628 075 T3

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro
1				5					10					15
Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
				20					25					30
Asn	Asn	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile
				65					70					75
Asn	Ser	Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Ser	Asn	Thr	Trp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
				95					100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg	Gly	Glu	Cys											

<210> 2
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de cadena ligera, cadena ligera química anti-FLT3 (clon BV10)
 <400> 2

ES 2 628 075 T3

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	1	5	10	15
Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	20	25	30	
Asn	Ser	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Met	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	35	40	45	
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	50	55	60	
Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	65	70	75	
Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	80	85	90	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Asp	His	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	95	100	105	
Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	110	115	120	
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	125	130	135	
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	140	145	150	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	155	160	165	
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	170	175	180	
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	185	190	195	
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	200	205	210	
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	215	220							

<210> 3

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cadena ligera, cadena ligera quimérica anti-CSPG4 (clon 9.2.27)

10 <400> 3

Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	
				20					25					30	
Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	
				35					40					45	
Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	
				50					55					60	
Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	
				65					70					75	
Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	
				80					85					90	
Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	
				95					100					105	
Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	
				110					115					120	
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	
				125					130					135	
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	
				140					145					150	
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	
				155					160					165	
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				170					175					180	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
				185					190					195	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	
				200					205					210	
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
				215											

<210> 4
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de cadena ligera, cadena ligera quimérica anti-CD19 (clon 4G7)

<400> 4

ES 2 628 075 T3

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	
1				5					10					15		
Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	
			20					25					30			
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	
		35					40					45				
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	
	50					55					60					
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	
65				70						75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His	
			85					90						95		
Leu	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	
			100					105					110			
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
		115					120					125				
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
	130					135					140					
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
			165						170					175		
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
			180					185					190			
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
		195					200					205				
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
	210					215										

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cadena ligera, cadena ligera quimérica anti-EGFR (clon C225)

<400> 5

ES 2 628 075 T3

Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro
1				5					10					15
Gly	Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly
				20					25					30
Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg
				35					40					45
Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser
				50					55					60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile
				65					70					75
Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
				95					100					105
Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg	Gly	Glu	Cys											

<210> 6
 <211> 589
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cadena pesada/cadena principal, FLT3 x CD3; cadena bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única CD3 C-terminal (clon UCHT1, VL-VH)] de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 6

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15
Ala	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Ser	Tyr	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Lys	Asp	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Arg	Ser
				65					70					75
Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	Met	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp
				80					85					90
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Thr	Thr	Pro	Phe
				95					100					105
Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
				110					115					120
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
				125					130					135
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				140					145					150
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
				155					160					165
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
				170					175					180
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
				185					190					195
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
				200					205					210
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
				215					220					225
Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
				230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His

				275					280					285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr
				290					295					300
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				305					310					315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser
				320					325					330
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly
				335					340					345
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
				350					355					360
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg
				365					370					375
Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				380					385					390
Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				395					400					405
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile
				410					415					420
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				425					430					435
Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				440					445					450
Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
				455					460					465
Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
				470					475					480
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser
				485					490					495
Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
				500					505					510
Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Lys	Gly	Val	Ser
				515					520					525
Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp
				530					535					540
Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala
				545					550					555
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly
				560					565					570
Asp	Ser	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				575					580					585
Thr	Val	Ser	Ser											

<210> 7

<211> 594

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> FLT3 x CD3; cadena bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon BV10) y cadena única CD3 C-terminal (clon UCHT1, VL-VH)] de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 7

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr
			20					25					30		

ES 2 628 075 T3

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val
 225 230 235 240
 Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

ES 2 628 075 T3

Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	290	295	300
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	325	330	335
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	340	345	350
Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	355	360	365
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Tyr	Leu	Asn	370	375	380
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	385	390	395
Thr	Ser	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	405	410	415
Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	420	425	430
Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	435	440	445
Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	450	455	460
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	465	470	475
Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	485	490	495
Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	500	505	510
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Lys	Gly	515	520	525
Val	Ser	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	530	535	540

ES 2 628 075 T3

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
545 550 555 560

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
565 570 575

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
580 585 590

Ser Ser

<210> 8

<211> 585

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> FLT3 x TCR alfa/beta; bsFcko-1/2 [cadena pesada anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única TCR alfa/beta C-terminal (clon BMA031; VH-VL)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

ES 2 628 075 T3

130	135	140															
Cys 145	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr 150	Phe	Pro	Glu	Pro	Val 155	Thr	Val	Ser	Trp	Asn 160		
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr 165	Ser	Gly	Val	His	Thr 170	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln 175		
Ser	Ser	Gly	Leu 180	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 185	Val	Val	Thr	Val	Pro 190	Ser	Ser		
Ser	Leu	Gly 195	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile 200	Cys	Asn	Val	Asn	His 205	Lys	Pro	Ser		
Asn 210	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys 215	Val	Glu	Pro	Lys	Ser 220	Cys	Asp	Lys	Thr		
His 225	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser 230	Pro	Ala	Pro	Pro	Val 235	Ala	Gly	Pro	Ser	Val 240		
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 245	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 250	Leu	Met	Ile	Ser	Arg 255	Thr		
Pro	Glu	Val	Thr 260	Cys	Val	Val	Val	Gly 265	Val	Ser	His	Glu	Asp 270	Pro	Glu		
Val	Lys	Phe 275	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 280	Gly	Val	Glu	Val	His 285	Asn	Ala	Lys		
Thr 290	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 295	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr 300	Arg	Val	Val	Ser		
Val 305	Leu	Thr	Val	Leu	His 310	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 315	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 320		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn 325	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser 330	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 335	Ile		
Ser	Lys	Ala	Lys 340	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly 345	Glu	Val	Gln	Leu	Gln 350	Gln	Ser		
Gly	Pro	Glu 355	Leu	Val	Lys	Pro	Gly 360	Ala	Ser	Val	Lys	Met 365	Ser	Cys	Lys		
Ala 370	Ser	Gly	Tyr	Lys	Phe	Thr 375	Ser	Tyr	Val	Met	His 380	Trp	Val	Lys	Gln		

ES 2 628 075 T3

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn
 385 390 395 400
 Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 405 410 415
 Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr
 420 425 430
 Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp
 435 440 445
 Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 465 470 475 480
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
 485 490 495
 Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 500 505 510
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp
 515 520 525
 Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 530 535 540
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
 545 550 555 560
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe
 565 570 575
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 580 585

<210> 9

<211> 590

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> FLT3 x TCR alfa/beta; bsFcko-1/2 [cadena pesada anti-FLT3 N-terminal (clon BV10) y cadena única TCR alfa/beta C-terminal (clon BMA031; VH-VL)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 9

ES 2 628 075 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	50	55	60	
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	65	70	75	80
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Lys	Gly	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asn	His	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	210	215	220	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	225	230	235	240

ES 2 628 075 T3

Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	260	265	270
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	290	295	300
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	325	330	335
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Glu	Val	340	345	350
Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	355	360	365
Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Lys	Phe	Thr	Ser	Tyr	Val	Met	370	375	380
His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	385	390	395
Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Val	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	405	410	415
Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	420	425	430
Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	His	Tyr	Cys	Ala	Arg	435	440	445
Gly	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Phe	Val	Tyr	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	450	455	460
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	465	470	475
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	485	490	495

ES 2 628 075 T3

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser
500 505 510

Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
515 520 525

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
530 535 540

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
545 550 555 560

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
565 570 575

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
580 585 590

<210> 10

<211> 592

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FLT3 x CD28; cadena bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 9.3; VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

ES 2 628 075 T3

Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro		
		115					120					125					
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly		
	130					135					140						
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn		
145					150					155					160		
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		
				165					170						175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser		
			180					185					190				
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser		
		195					200					205					
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr		
	210					215					220						
His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val		
225					230					235					240		
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
				245					250					255			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
			260					265					270				
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
		275					280					285					
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
	290					295					300						
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
305					310					315					320		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
				325					330					335			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser		
		340						345					350				
Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys		

ES 2 628 075 T3

355																
Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	Tyr	Val	Thr	Ser	Leu	Met	Gln	Trp	
370						375					380					
Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	Ala	Ala	
385					390					395					400	
Ser	Asn	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	
				405					410					415		
Gly	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Asp	Glu	Asp	Asp	Val	
			420					425					430			
Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	
		435					440					445				
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
450						455					460					
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	
465					470					475					480	
Pro	Gly	Leu	Val	Thr	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	
				485					490					495		
Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	
			500					505					510			
Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Gly	
		515					520					525				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	
530						535					540					
Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	
545					550					555					560	
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Lys	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	
				565					570					575		
Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
			580					585					590			

<210> 11
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> FLT3 x CD28; cadena bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon BV10) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 9,3, VL-VH)] de una hemimolécula de glicano-variente de ko

5 <400> 11

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

ES 2 628 075 T3

Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	
225					230					235					240	
Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
				245					250					255		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	
			260					265					270			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
		275					280					285				
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	
	290					295					300					
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
305					310					315					320	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	
				325					330					335		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	
			340					345					350			
Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	
		355					360					365				
Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	Tyr	Val	Thr	
	370					375					380					
Ser	Leu	Met	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	
385					390					395					400	
Leu	Ile	Phe	Ala	Ala	Ser	Asn	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	
				405					410					415		
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	
			420				425						430			
Asp	Glu	Asp	Asp	Val	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	
		435					440					445				
Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	
	450					455					460					
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Lys	
465					470					475					480	

ES 2 628 075 T3

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser Leu Ser
485 490 495

Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly Val His
500 505 510

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
515 520 525

Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Lys
530 535 540

Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
545 550 555 560

Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys
565 570 575

Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
580 585 590

Val Thr Val Ser Ser
595

<210> 12

<211> 589

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FLT3 x CD16; cadena bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única de CD16 C-terminal (clon 3G8; VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 12

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 628 075 T3

Met	His	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95
Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Thr	Thr	Pro	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	210	215	220
His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	225	230	235
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	245	250	255
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	260	265	270
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	290	295	300
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	305	310	315
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile			

ES 2 628 075 T3

				325						330						335
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	
			340					345					350			
Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	
		355					360					365				
Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	
	370					375					380					
Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Thr	
385					390					395					400	
Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	
				405					410					415		
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	
			420					425					430			
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	
		435					440					445				
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	450					455					460					
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	
465					470					475					480	
Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	
				485					490					495		
Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	
			500					505					510			
Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	
		515					520					525				
Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	
	530					535					540					
Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	
545					550					555					560	
Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Ile	Asn	Pro	Ala	Trp	Phe	
				565					570					575		
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				

580

585

5
 <210> 13
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> FLT3 x CD16; cadena bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon BV10) y cadena
 única de CD16 C-terminal (clon 3G8; VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de
 ko
 <400> 13

ES 2 628 075 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	50	55	60	
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	65	70	75	80
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Lys	Gly	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asn	His	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val				

ES 2 628 075 T3

195		200		205											
Asn 210	His 210	Lys 210	Pro 210	Ser 210	Asn 215	Thr 215	Lys 215	Val 215	Asp 215	Lys 220	Lys 220	Val 220	Glu 220	Pro 220	Lys 220
Ser 225	Cys 225	Asp 225	Lys 225	Thr 225	His 230	Thr 230	Ser 230	Pro 230	Pro 230	Ser 235	Pro 235	Ala 235	Pro 235	Pro 235	Val 240
Ala 245	Gly 245	Pro 245	Ser 245	Val 245	Phe 245	Leu 245	Phe 250	Pro 250	Pro 250	Lys 250	Pro 250	Lys 250	Asp 255	Thr 255	Leu 255
Met 260	Ile 260	Ser 260	Arg 260	Thr 260	Pro 260	Glu 260	Val 265	Thr 265	Cys 265	Val 265	Val 265	Val 265	Gly 270	Val 270	Ser 270
His 275	Glu 275	Asp 275	Pro 275	Glu 275	Val 275	Lys 275	Phe 280	Asn 280	Trp 280	Tyr 280	Val 280	Asp 285	Gly 285	Val 285	Glu 285
Val 290	His 290	Asn 290	Ala 290	Lys 290	Thr 290	Lys 295	Pro 295	Arg 295	Glu 295	Glu 295	Gln 300	Tyr 300	Gln 300	Ser 300	Thr 300
Tyr 305	Arg 305	Val 305	Val 305	Ser 305	Val 310	Leu 310	Thr 310	Val 310	Leu 315	His 315	Gln 315	Asp 315	Trp 315	Leu 315	Asn 320
Gly 325	Lys 325	Glu 325	Tyr 325	Lys 325	Cys 325	Lys 325	Val 325	Ser 330	Asn 330	Lys 330	Gln 330	Leu 330	Pro 335	Ser 335	Pro 335
Ile 340	Glu 340	Lys 340	Thr 340	Ile 340	Ser 340	Lys 340	Ala 345	Lys 345	Gly 345	Gln 345	Pro 345	Ser 350	Gly 350	Asp 350	Ile 350
Val 355	Leu 355	Thr 355	Gln 355	Ser 355	Pro 355	Ala 355	Ser 360	Leu 360	Ala 360	Val 360	Ser 365	Leu 365	Gly 365	Gln 365	Arg 365
Ala 370	Thr 370	Ile 370	Ser 370	Cys 370	Lys 370	Ala 375	Ser 375	Gln 375	Ser 375	Val 375	Asp 380	Phe 380	Asp 380	Gly 380	Asp 380
Ser 385	Phe 385	Met 385	Asn 385	Trp 385	Tyr 390	Gln 390	Gln 390	Lys 390	Pro 390	Gly 395	Gln 395	Pro 395	Pro 395	Lys 395	Leu 400
Leu 405	Ile 405	Tyr 405	Thr 405	Thr 405	Ser 405	Asn 405	Leu 410	Glu 410	Ser 410	Gly 410	Ile 410	Pro 410	Ala 415	Arg 415	Phe 415
Ser 420	Ala 420	Ser 420	Gly 420	Ser 420	Gly 420	Thr 420	Asp 425	Phe 425	Thr 425	Leu 425	Asn 425	Ile 430	His 430	Pro 430	Val 430
Glu 435	Glu 435	Glu 435	Asp 435	Thr 435	Ala 435	Thr 435	Tyr 440	Tyr 440	Cys 440	Gln 440	Gln 440	Ser 445	Asn 445	Glu 445	Asp 445

ES 2 628 075 T3

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu
465 470 475 480

Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
485 490 495

Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val
500 505 510

Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His
515 520 525

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg
530 535 540

Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile
545 550 555 560

Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile
565 570 575

Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
580 585 590

Ser Ser

<210> 14

<211> 592

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CD19 x CD3, bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CD19 N-terminal (clon 4G7) y cadena única anti-CD3 C-terminal (clon UCHT1, VL-VH)] de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 14

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ES 2 628 075 T3

Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	100	105	110	
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	115	120	125	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	130	135	140	
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155	160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190	
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	195	200	205	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	210	215	220	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	225	230	235	240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	260	265	270	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300	

ES 2 628 075 T3

Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315	320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	325	330	335	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	340	345	350	
Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	355	360	365	
Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	370	375	380	
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	385	390	395	400
Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	405	410	415	
Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	420	425	430	
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	435	440	445	
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	450	455	460	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	465	470	475	480
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	485	490	495	
Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	500	505	510	
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Lys	Gly	Val	Ser	515	520	525	
Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	530	535	540	
Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	545	550	555	560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp
565 570 575

Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 15

<211> 588

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD19 X TCR alfa/beta; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CD19 N-terminal (clon 4G7) y cadena única anti-TCR alfa/beta C-terminal (clon BMA031; VH-VL)]: que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 15

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

ES 2 628 075 T3

165								170				175			
Val	Leu	Gln	Ser 180	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser 185	Leu	Ser	Ser	Val	Val 190	Thr	Val
Pro	Ser	Ser 195	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln 200	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn 205	Val	Asn	His
Lys	Pro 210	Ser	Asn	Thr	Lys	Val 215	Asp	Lys	Lys	Val	Glu 220	Pro	Lys	Ser	Cys
Asp 225	Lys	Thr	His	Thr	Ser 230	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala 235	Pro	Pro	Val	Ala	Gly 240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu 245	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 250	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 255	Ile
Ser	Arg	Thr	Pro 260	Glu	Val	Thr	Cys	Val 265	Val	Val	Gly	Val	Ser 270	His	Glu
Asp	Pro	Glu 275	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 280	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 285	Glu	Val	His
Asn	Ala 290	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 295	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln 300	Ser	Thr	Tyr	Arg
Val 305	Val	Ser	Val	Leu	Thr 310	Val	Leu	His	Gln	Asp 315	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 325	Val	Ser	Asn	Lys	Gln 330	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile 335	Glu
Lys	Thr	Ile	Ser 340	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln 345	Pro	Ser	Gly	Glu	Val 350	Gln	Leu
Gln	Gln	Ser 355	Gly	Pro	Glu	Leu	Val 360	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser 365	Val	Lys	Met
Ser	Cys 370	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr 375	Lys	Phe	Thr	Ser	Tyr 380	Val	Met	His	Trp
Val 385	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly 390	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp 395	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn 400
Pro	Tyr	Asn	Asp	Val 405	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu 410	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys 415	Ala

ES 2 628 075 T3

Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
420 425 430

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser
435 440 445

Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
450 455 460

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
465 470 475 480

Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
485 490 495

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser
500 505 510

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
515 520 525

Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
530 535 540

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
545 550 555 560

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
565 570 575

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
580 585

<210> 16

<211> 595

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CD19 x CD28; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CD19 N-terminal (clon 4G7) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 9,3, VL-VH)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 16

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

ES 2 628 075 T3

Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
		35					40					45					
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe		
	50					55					60						
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85						90					95			
Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly		
			100					105					110				
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser		
		115					120					125					
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala		
	130					135					140						
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val		
145					150					155					160		
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala		
				165					170					175			
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val		
			180					185					190				
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His		
		195					200					205					
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		
	210					215					220						
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly		
225					230					235					240		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
				245					250					255			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu		
			260					265					270				
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
		275					280					285					

ES 2 628 075 T3

Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg		
290						295					300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305					310					315					320		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu		
				325					330					335			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	Glu	Leu		
			340					345					350				
Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr		
		355					360					365					
Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	Tyr	Val	Thr	Ser	Leu		
370						375					380						
Met	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
385					390					395					400		
Phe	Ala	Ala	Ser	Asn	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly		
				405					410					415			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Asp	Glu		
			420					425					430				
Asp	Asp	Val	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Pro	Tyr		
		435					440					445					
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly		
	450					455					460						
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Lys	Leu	Gln		
465					470					475					480		
Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Thr	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr		
				485					490					495			
Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val		
			500					505					510				
Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala		
		515					520					525					
Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Lys	Ser	Ile		

ES 2 628 075 T3

530

535

540

Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu
545 550 555 560

Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr
565 570 575

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
580 585 590

Val Ser Ser
595

<210> 17

<211> 592

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD19 x CD16; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CD19 N-terminal (clon 4G7) y cadena única CD16 C-terminal (clon 3G8, VL-VH)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 17

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

ES 2 628 075 T3

Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala		
130						135					140						
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val		
145					150					155					160		
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala		
				165					170					175			
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val		
			180					185					190				
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His		
		195					200					205					
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		
210						215					220						
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly		
225					230					235					240		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
			245					250						255			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu		
			260					265					270				
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
	275						280					285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg		
290						295					300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305					310					315					320		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu		
				325					330					335			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	Val	Leu		
			340					345					350				
Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr		
		355					360					365					
Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe		
370						375					380						

ES 2 628 075 T3

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
385 390 395 400

Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala
405 410 415

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu
420 425 430

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr
435 440 445

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu
465 470 475 480

Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
485 490 495

Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
500 505 510

Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp
515 520 525

Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr
530 535 540

Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser
545 550 555 560

Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro
565 570 575

Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 18

<211> 592

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CSPG4 x CD3, bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CSPG4 N-terminal (clon 9.2.27) y cadena única anti-CD3 C-terminal (clon UCHT1, VL-VH)], una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 18

ES 2 628 075 T3

Gln	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
1			5					10						15		
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Arg	Ser	
		20					25						30			
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	
	50					55					60					
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70				75						80	
Met	Gln	Val	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Gly	Asn	Thr	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Thr	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	
			100					105					110			
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
		115					120					125				
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
	130					135					140					
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
145				150					155						160	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
			165					170						175		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180					185					190			
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
		195					200					205				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
	210					215					220					
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	

ES 2 628 075 T3

				245					250					255			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu		
			260					265					270				
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
		275					280					285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg		
	290					295					300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305					310					315					320		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu		
				325					330					335			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	Gln	Met		
			340					345					350				
Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr		
		355					360					365					
Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr		
	370					375					380						
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser		
385					390					395					400		
Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly		
				405					410					415			
Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala		
			420					425					430				
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln		
		435					440					445					
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
	450					455					460						
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly		
465					470					475					480		
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly		
				485					490					495			

ES 2 628 075 T3

Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
500 505 510

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser
515 520 525

Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys
530 535 540

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
545 550 555 560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp
565 570 575

Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 19

<211> 588

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CSPG4 x TCR alfa/beta; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CSPG4 N-terminal (clon 9.2.27) y cadena única anti-TCR alfa/beta C-terminal (clon BMA031; VH-VL)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 19

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Thr Val Val Val Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

ES 2 628 075 T3

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Glu Val Gln Leu
 340 345 350

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
 355 360 365

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp
370 375 380

Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
385 390 395 400

Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala
405 410 415

Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
420 425 430

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser
435 440 445

Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
450 455 460

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
465 470 475 480

Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
485 490 495

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser
500 505 510

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
515 520 525

Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
530 535 540

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
545 550 555 560

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
565 570 575

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
580 585

<210> 20

<211> 595

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CSPG4 x CD28; cadena bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CSPG4 N-terminal (clon 9.2.27) y

ES 2 628 075 T3

cadena única de CD28 C-terminal (clon 9.3; VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 20

5

Gln	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Arg	Ser	20	25	30	
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Gln	Val	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Gly	Asn	Thr	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Thr	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	100	105	110	
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	115	120	125	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	130	135	140	
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155	160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190	
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	195	200	205	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	210	215	220	

ES 2 628 075 T3

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	225	230	235	240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	260	265	270	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315	320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	325	330	335	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	Glu	Leu	340	345	350	
Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	355	360	365	
Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	Tyr	Val	Thr	Ser	Leu	370	375	380	
Met	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	385	390	395	400
Phe	Ala	Ala	Ser	Asn	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	405	410	415	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Asp	Glu	420	425	430	
Asp	Asp	Val	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Pro	Tyr	435	440	445	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	450	455	460	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Lys	Leu	Gln	465	470	475	480

ES 2 628 075 T3

Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr
485 490 495

Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly Val His Trp Val
500 505 510

Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala
515 520 525

Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Lys Ser Ile
530 535 540

Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu
545 550 555 560

Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr
565 570 575

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
580 585 590

Val Ser Ser
595

<210> 21

<211> 592

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CSPG4 x CD16, bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CSPG4 N-terminal (clon 9.2.27) y cadena única de CD16 C-terminal (clon 3G8, VL-VH)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 21

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

ES 2 628 075 T3

65				70				75				80			
Met	Gln	Val	Ser	Ser 85	Leu	Thr	Ser	Val	Asp 90	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe 95	Cys
Ala	Arg	Gly	Asn 100	Thr	Val	Val	Val	Pro 105	Tyr	Thr	Met	Asp	Tyr 110	Trp	Gly
Gln	Gly	Thr 115	Thr	Val	Thr	Val	Ser 120	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys 125	Gly	Pro	Ser
Val	Phe 130	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser 135	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser 140	Gly	Gly	Thr	Ala
Ala 145	Leu	Gly	Cys	Leu	Val 150	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro 155	Glu	Pro	Val	Thr	Val 160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly 165	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly 170	Val	His	Thr	Phe	Pro 175	Ala
Val	Leu	Gln	Ser 180	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser 185	Leu	Ser	Ser	Val	Val 190	Thr	Val
Pro	Ser	Ser 195	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln 200	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn 205	Val	Asn	His
Lys	Pro 210	Ser	Asn	Thr	Lys 215	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu 220	Pro	Lys	Ser	Cys
Asp 225	Lys	Thr	His	Thr	Ser 230	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala 235	Pro	Pro	Val	Ala	Gly 240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu 245	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 250	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 255	Ile
Ser	Arg	Thr	Pro 260	Glu	Val	Thr	Cys 265	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser 270	His	Glu
Asp	Pro	Glu 275	Val	Lys	Phe	Asn 280	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 285	Glu	Val	His
Asn	Ala 290	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 295	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln 300	Ser	Thr	Tyr	Arg
Val 305	Val	Ser	Val	Leu	Thr 310	Val	Leu	His	Gln	Asp 315	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 320

ES 2 628 075 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Val Leu
 340 345 350
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 355 360 365
 Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Phe
 370 375 380
 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 385 390 395 400
 Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala
 405 410 415
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu
 420 425 430
 Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr
 435 440 445
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu
 465 470 475 480
 Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 485 490 495
 Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
 500 505 510
 Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp
 515 520 525
 Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr
 530 535 540
 Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser
 545 550 555 560
 Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro
 565 570 575

ES 2 628 075 T3

Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 22

<211> 590

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> EGFR x CD3; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-EGFR N-terminal (clon C225) y cadena única de CD3 C-terminal (clon UCHT1; VL-VH)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 22

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

ES 2 628 075 T3

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln
 340 345 350
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 355 360 365
 Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 370 375 380
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu
 385 390 395 400
 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 405 410 415
 Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 420 425 430
 Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr

ES 2 628 075 T3

435

440

445

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
465 470 475 480

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser
485 490 495

Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
500 505 510

Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr
515 520 525

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys
530 535 540

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
545 550 555 560

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr
565 570 575

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 23

<211> 586

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> EGFR x TCR alfa/beta; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-EGFR N-terminal (clon C225) y cadena única TCR alfa/beta C-terminal (clon BMA031; VH-VL)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 23

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

ES 2 628 075 T3

35					40					45						
Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	
50					55					60						
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	
65					70					75					80	
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
					85					90					95	
Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
					100					105					110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
					115					120					125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
					130					135					140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
145					150					155					160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
					180					185					190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
					195					200					205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
					210					215					220	
Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
					260					265					270	
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
					275					280					285	

ES 2 628 075 T3

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln
 340 345 350
 Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
 355 360 365
 Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys
 370 375 380
 Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr
 385 390 395 400
 Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
 405 410 415
 Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 420 425 430
 Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr
 435 440 445
 Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 450 455 460
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 465 470 475 480
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 485 490 495
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 500 505 510
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 515 520 525
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 530 535 540

ES 2 628 075 T3

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
545 550 555 560

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
565 570 575

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
580 585

<210> 24

<211> 593

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> EGFR x CD28; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-EGFR N-terminal (clon C225) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 9.3; VL-VH)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 24

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

ES 2 628 075 T3

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Gly Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gln Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Glu Leu Thr Gln
 340 345 350
 Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
 355 360 365
 Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln
 370 375 380
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala
 385 390 395 400
 Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

ES 2 628 075 T3

405 410 415
 Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Asp Glu Asp Asp
 420 425 430
 Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr Phe
 435 440 445
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser
 465 470 475 480
 Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr
 485 490 495
 Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln
 500 505 510
 Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly
 515 520 525
 Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Lys Ser Ile Ser Lys
 530 535 540
 Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala
 545 550 555 560
 Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr
 565 570 575
 Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 580 585 590

Ser

<210> 25

<211> 590

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> EGFR x CD16; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-EGFR N-terminal (clon C225) y cadena única de CD16 C-terminal (clon 3G8; VL-VH)], cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko

<400> 25

ES 2 628 075 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	50	55	60	
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	65	70	75	80
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	225	230	235	240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255	

ES 2 628 075 T3

Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	260	265	270
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	275	280	285
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	290	295	300
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	305	310	315
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	325	330	335
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	340	345	350
Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	355	360	365
Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn	370	375	380
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	385	390	395
Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Gly	405	410	415
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	420	425	430
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	435	440	445
Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	450	455	460
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	465	470	475
Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	485	490	495
Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	500	505	510

Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp
515 520 525

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
530 535 540

Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp
545 550 555 560

Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp
565 570 575

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 26

<211> 693

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de cadena pesada/cadena principal; FLT3 x CD3; bsFcko-1 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal y cadena única de CD3 C-terminal (clon UCHT1; VL-VH)]; que es una cadena de una molécula (completa) variante de ko que incluye un dominio CH3, no un glicomutante

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser
65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe
95 100 105

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115 120

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
125 130 135

15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

ES 2 628 075 T3

				140					145					150
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
				155					160					165
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
				170					175					180
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
				185					190					195
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
				200					205					210
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
				215					220					225
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
				230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				275					280					285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
				290					295					300
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				305					310					315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser
				320					325					330
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				335					340					345
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
				350					355					360
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
				365					370					375
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
				380					385					390
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				395					400					405
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				410					415					420
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
				425					430					435
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser	Gly	Asp
				440					445					450
Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly

ES 2 628 075 T3

	455	460	465
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg Ala	Ser Gln Asp Ile Arg	Asn
	470	475	480
Tyr Leu Asn Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ala Pro Lys	Leu
	485	490	495
Leu Ile Tyr Tyr	Thr Ser Arg Leu Glu	Ser Gly Val Pro Ser	Arg
	500	505	510
Phe Ser Gly Ser	Gly Ser Gly Thr Asp	Tyr Thr Leu Thr Ile	Ser
	515	520	525
Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Phe Ala Thr	Tyr Tyr Cys Gln Gln	Gly
	530	535	540
Asn Thr Leu Pro	Trp Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val Glu	Ile
	545	550	555
Lys Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly	Gly
	560	565	570
Ser Glu Val Gln	Leu Val Glu Ser Gly	Gly Gly Leu Val Gln	Pro
	575	580	585
Gly Gly Ser Leu	Arg Leu Ser Cys Ala	Ala Ser Gly Tyr Ser	Phe
	590	595	600
Thr Gly Tyr Thr	Met Asn Trp Val Arg	Gln Ala Pro Gly Lys	Gly
	605	610	615
Leu Glu Trp Val	Ala Leu Ile Asn Pro	Tyr Lys Gly Val Ser	Thr
	620	625	630
Tyr Asn Gln Lys	Phe Lys Asp Arg Phe	Thr Ile Ser Val Asp	Lys
	635	640	645
Ser Lys Asn Thr	Ala Tyr Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala	Glu
	650	655	660
Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala Arg	Ser Gly Tyr Tyr Gly	Asp
	665	670	675
Ser Asp Trp Tyr	Phe Asp Val Trp Gly	Gln Gly Thr Leu Val	Thr
	680	685	690
Val Ser Ser			

<210> 27
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc

<400> 27

ctcttcacag gtgtcctctc tgagggtccag ctgcagcagt ctggacctg 49

<210> 28

	<211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc <400> 28	
10	gggagaaggt aggactcacc tgaggagact gtgagagtgg tgccttggcc ccagtagtc	59
15	<210> 29 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc	
20	<400> 29	
	tcttcacagg tgtcctctcc caggtgaagc tgcagcaatc tggacctgag c	51
25	<210> 30 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc	
30	<400> 30	
35	aatgggagaa ggtaggactc acctgaggag acggtgaccg tggcccttg g	51
40	<210> 31 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc	
45	<400> 31	
	tctcttcaca ggtgtcctct ctcagggtcca actgcagcag cctggggctg agc	53
50	<210> 32 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc	
55	<400> 32	
	gagaaggtag gactcacctg aggagactgt gagagtgggtg ccttggcccc ag	52
60	<210> 33	

	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc		
	<400> 33		
10	agacgtccac tctgtctttc tcttcacagg tgtcctctcc caggtgcagc tgaagcagtc	60	
	<210> 34		
	<211> 49		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc		
20	<400> 34		
	gagaaggtag gactcacctg aggagacggt gactgagggt ccttgaccc	49	
25	<210> 35		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc		
	<400> 35		
35	agacgtccac tctgtctttc tcttcacagg tgtcctctcc	40	
	<210> 36		
	<211> 40		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido para el segmento VDJ hc		
45	<400> 36		
	agacgtccac tctgtctttc tcttcacagg tgtcctctcc	40	
	<210> 37		
	<211> 43		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223> oligonucleótido para el segmento VJ lc		
	<400> 37		
	actcgaggag atattgtgat gactcaggct gcaccctcta tac	43	
60	<210> 38		

	<211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> oligonucleótido para el segmento VJ Ic <400> 38	
10	aactagtact tacgtttcag ctccagcttg gtcccagcac cgaacgtg	48
15	<210> 39 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido para el segmento VJ Ic	
20	<400> 39 tctcgaggag acatcgagct cactcagtct ccagcttctt tg	42
25	<210> 40 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido para el segmento VJ Ic	
30	<400> 40 aactagtact tacgtttgat ctccagcttg gtgccccctc caaagg	46
35	<210> 41 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido para el segmento VJ Ic	
40	<400> 41 actcgaggag atattgtgct aactcagtct ccagccaccc tg	42
45	<210> 42 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> oligonucleótido para el segmento VJ Ic	
50	<400> 42 tactagtact tacgttttat ttccagcttg gtccccctc c	41
55	<210> 43 <211> 40	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> oligonucleótido para el segmento VJ Ic	
	<400> 43	
	actcgaggag acattgtgat gacacagtct ccacccctccc	40
10	<210> 44	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> oligonucleótido para el segmento VJ Ic	
	<400> 44	
20	actagtactt acgtttcagc tccagcttgg tcccagcacc gaacgtg	47
	<210> 45	
	<211> 40	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido para el segmento scFv	
30	<400> 45	
	atccggagat atccagatga cccagtcccc gagctccctg	40
35	<210> 46	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> oligonucleótido para el segmento scFv	
	<400> 46	
45	tactagttat cacgaggaga cggtgaccag gggttccttga cccca	45
	<210> 47	
	<211> 39	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido para el segmento scFv	
55	<400> 47	
	atccggagaa gtgcagctgc agcagtcagg ccctgagct	39
	<210> 48	
60	<211> 45	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> oligonucleótido para el segmento scFv
 <400> 48
 tactagttat cacttcagtt ccagcttggt gccagcgccg aaggt 45
 10
 <210> 49
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido para el segmento scFv
 <400> 49
 20
 atccggagac attgtgctga ccagtcgcc tgcctccctg g 41
 <210> 50
 <211> 45
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido para el segmento scFv
 30
 <400> 50
 tactagttat caagagctca cagtcactgt ggtgccctgg cccca 45

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo biespecífica recombinante que consiste en un fragmento Fab que comprende un primer sitio de unión para un primer antígeno, un fragmento Fv monocatenario que comprende un segundo sitio de unión para un segundo antígeno y un dominio CH2 de inmunoglobulina, donde el fragmento Fab comprende además la región de bisagra, donde el fragmento Fab y el fragmento Fv monocatenario están unidos a través del dominio CH2, donde al menos un resto de aminoácido del dominio CH2 que puede mediar la unión a receptores Fc está ausente o mutado, y donde además los restos de aminoácido de las posiciones de secuencia 226 y 229 (numeración de posiciones de secuencia de acuerdo con el índice EU) están ausentes o mutadas, donde dicho al menos un resto de aminoácido de la región de bisagra o el dominio CH2 que puede mediar la unión a receptores Fc está ausente o mutado, se selecciona del grupo que consiste en la posición de secuencia 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 297, 327 y 330 (numeración de posiciones de secuencia de acuerdo con el índice EU).
2. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1,
 - a) donde el primer sitio de unión o el segundo sitio de unión se une a un antígeno asociado a tumores; donde
 - (i) el antígeno asociado a tumores preferentemente está localizado en el sistema vascular de un tumor; y/o
 - (ii) el antígeno asociado a tumor es preferentemente un antígeno de superficie o un antígeno de la matriz extracelular; y/o
 - (iii) el antígeno asociado a tumores preferentemente se selecciona del grupo que consiste en CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CDw52, tirosina quinasa 3 de tipo Fms (FLT-3, CD135), C-Kit (CD117), CSF1R, (CD115), CD133, PDGFR- α (CD140a), PDGFR- β (CD140b), proteoglicano 4 de condroitín sulfato (CSPG4, proteoglicano de condroitín sulfato asociado a melanoma), Muc-1, EGFR, de2-7-EGFR, EGFRvIII, proteína de unión a Folato, Her2neu, Her3, PSMA, PSCA, PSA, TAG-72, HLA-DR, IGFR, CD133, IL3R, proteína activadora de fibroblasto (FAP), Carboanhidrasa IX (MN/CA IX), antígeno Carcinoembrionario (CEA), EpCAM, CDCP1, Derlin1, Tenascina, frizzled 1-10, los antígenos vasculares VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), Endogлина, CLEC14, Tem1-8 y Tie2; y/o
 - b) donde el primer sitio de unión o el segundo sitio de unión preferentemente se une a una molécula receptora específica de células T o de células NK (citolíticas naturales), donde la molécula receptora específica de células T o de células NK preferentemente es una de CD3, el receptor de células T (TCR), CD28, CD16, NKG2D, 0x40, 4-1BB, CD2, CD5 y CD95, donde el TCR es preferentemente TCR (alfa/beta) o TCR (gamma/delta).
3. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, donde
 - (i) el fragmento Fab está unido al dominio CH2 a través de los dominios CH1 y VH de cadena pesada del fragmento Fab o a través de los dominios de cadena ligera CL y VL del fragmento Fab, donde los dominios de cadena pesada del fragmento Fab o los dominios de cadena ligera del fragmento Fab están dispuestos preferentemente en el extremo N de la cadena polipeptídica, donde el dominio CH2 está unido preferentemente al fragmento scFv a través del dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) de fragmento scFv que comprende el segundo sitio de unión o a través del dominio variable de la cadena pesada (dominio VH) del fragmento scFv que comprende el segundo sitio de unión; o
 - (ii) el fragmento Fab que comprende el primer sitio de unión para el primer antígeno preferentemente consiste en el dominio VL fusionado al dominio CH1 y el dominio VH fusionado al dominio CL, donde el dominio CH1 del fragmento Fab preferentemente está fusionado al dominio CH2, y/o donde la cadena VL-CH1 del fragmento Fab preferentemente está dispuesta en el extremo N de la cadena polipeptídica.
4. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fragmento Fab está unido al dominio CH2 a través de los dominios CH1 y VH de cadena pesada del fragmento Fab.
5. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 4, en la que los dominios de cadena pesada del fragmento Fab están dispuestos en el extremo N de la cadena polipeptídica.
6. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 5, en la que el dominio CH2 está unido al fragmento scFv a través del dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) del fragmento scFv que comprende el segundo sitio de unión.
7. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 5, en la que el dominio CH2 está unido al fragmento scFv a través del dominio variable de la cadena pesada (dominio VH) del fragmento scFv que comprende el segundo sitio de unión.
8. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
 - a) en la que el fragmento Fab comprende un región de bisagra; y/o
 - b) en la que el primer sitio de unión se une a un antígeno de superficie asociado a tumores y el segundo sitio de unión se une a uno de CD3, el receptor de células T (TCR), CD28, CD16, NKG2D, 0x40, 4-1BB, CD2, CD5 y

CD95.

- 5 9. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, en la que una cisteína en una o las dos posiciones 226 y 229 que están ausentes o mutadas está reemplazada por un aminoácido diferente (numeración de posiciones de secuencia de acuerdo con el índice EU).
- 10 10. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una delección del aminoácido 228, una delección del aminoácido 229, una delección del aminoácido 230, una delección del aminoácido 231, una delección del aminoácido 232, una delección del aminoácido 233, una sustitución Glu233→Pro, una sustitución Leu234→Val, una delección del aminoácido 234, una sustitución Leu235→Ala, una delección del aminoácido 235, una delección del aminoácido 236, una delección del aminoácido 237, una delección del aminoácido 238, una sustitución Asp265→Gly, una sustitución Asn297→Gln, una sustitución Ala327→Gln, y una sustitución Ala330→Ser (numeración las posiciones de secuencia de acuerdo con el índice EU).
- 15 11. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fragmento Fab está unido al dominio CH2 a través de un dominio de cadena pesada del fragmento Fab o a través de un dominio de cadena ligera del fragmento Fab, donde los dominios de cadena pesada del fragmento Fab preferentemente están dispuestos en el extremo N de la cadena polipeptídica.
- 20 12. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 25 13. Una molécula de anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en el tratamiento de una enfermedad, donde la enfermedad es preferentemente una enfermedad proliferativa, donde la enfermedad proliferativa preferentemente se selecciona del grupo que consiste en malignidades hematopoyéticas tales como leucemias mieloides y linfáticas agudas y crónicas, así como linfomas, tumores sólidos tales como tumores del tracto gastrointestinal, pulmón, riñón, próstata, mama, cerebro, ovario, útero, tumores mesenquimáticos y melanoma.
- 30 14. Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico, o una célula hospedadora que comprende dicha molécula de ácido nucleico o dicho vector.
- 35 15. Un método para producir una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende expresar un ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, donde la molécula de anticuerpo preferentemente se expresa en una célula hospedadora o un sistema sin células.

40

Fig. 1 CONT.

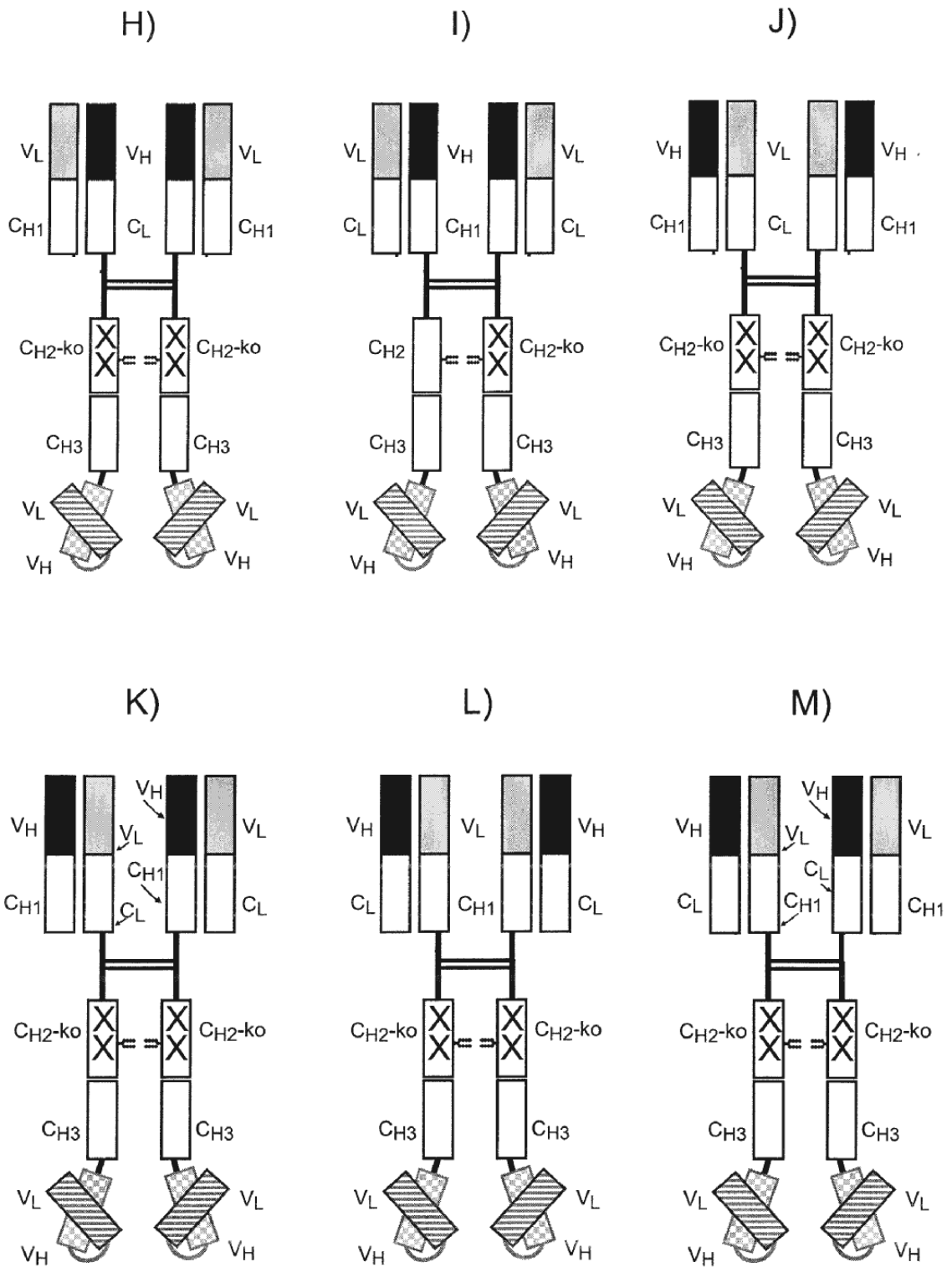
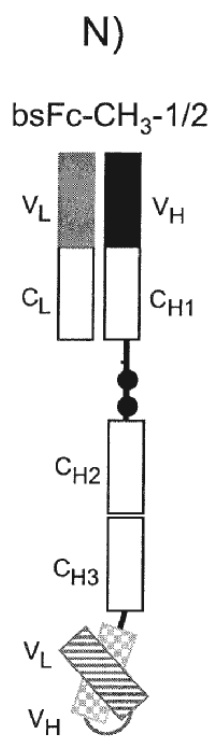


Fig. 1 CONT.



O)

Modificación para el formato bsFc- $\frac{1}{2}$ -*

			$CH_1 \Rightarrow$		Bisagra funcional										$\Leftarrow$		CH_2										$\Rightarrow$									
					superior					núcleo																			inferior							
					<i>bisagra genética</i>																															
	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	/....	D	N	A	A	A
Ig γ 1 (<i>wt</i>)			215					220						226			229				233	234	235	236	237	238	239			242		265	297	327	330	
** Posición																																				
bsFc- $\frac{1}{2}$														S		S																				
Δ_1														S		S		S		P	V	A	—									G		Q	S	
Glycan														S		S		S		P	V	A	—									G	Q	Q	S	
Δ_2														S		S		S		—	—	V	A	—								G	Q	Q	S	
Δ_3														S		S		S		—	—	V	A	—								G	Q	Q	S	
Δ_4														S		S		S		—	—	—	—	—								G	Q	Q	S	
Δ_5														S		S		S		—	—	—	—	—								G	Q	Q	S	

* También se aplica al formato bsFc^{ko}-CH₃- $\frac{1}{2}$ (Fig. 1N).

** La numeración posicional de aminoácidos está de acuerdo con el índice EU

Fig. 1 CONT.

P)

Modificación para el formato bsFc-1*

			Bisagra funcional																																				
			superior								inferior																												
$CH_1 \Rightarrow$			bisagra genética								núcleo								$\Leftarrow$								CH_2								$\Rightarrow$				
			K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	L	G	G	P	S	V	F	L	/....				D	N
Ig γ 1 (wt)		125						220							226			229					233	234	235	236	237	238	239	242								330	
**Posición																																						327	
bsFc-1																																							
Δ_1																					P	V	A	—															
Glycan																					P	V	A	—															
Δ_2																		—	—	—	—	—	V	A	—														
Δ_3																		—	—	—	—	P	V	A	—														
Δ_4																		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Δ_5																		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

* También se aplica al formato dímero bsFc- $\frac{1}{2}$. (Fig. 1F).

** La numeración posicional de aminoácidos está de acuerdo con el índice EU.

Fig. 2

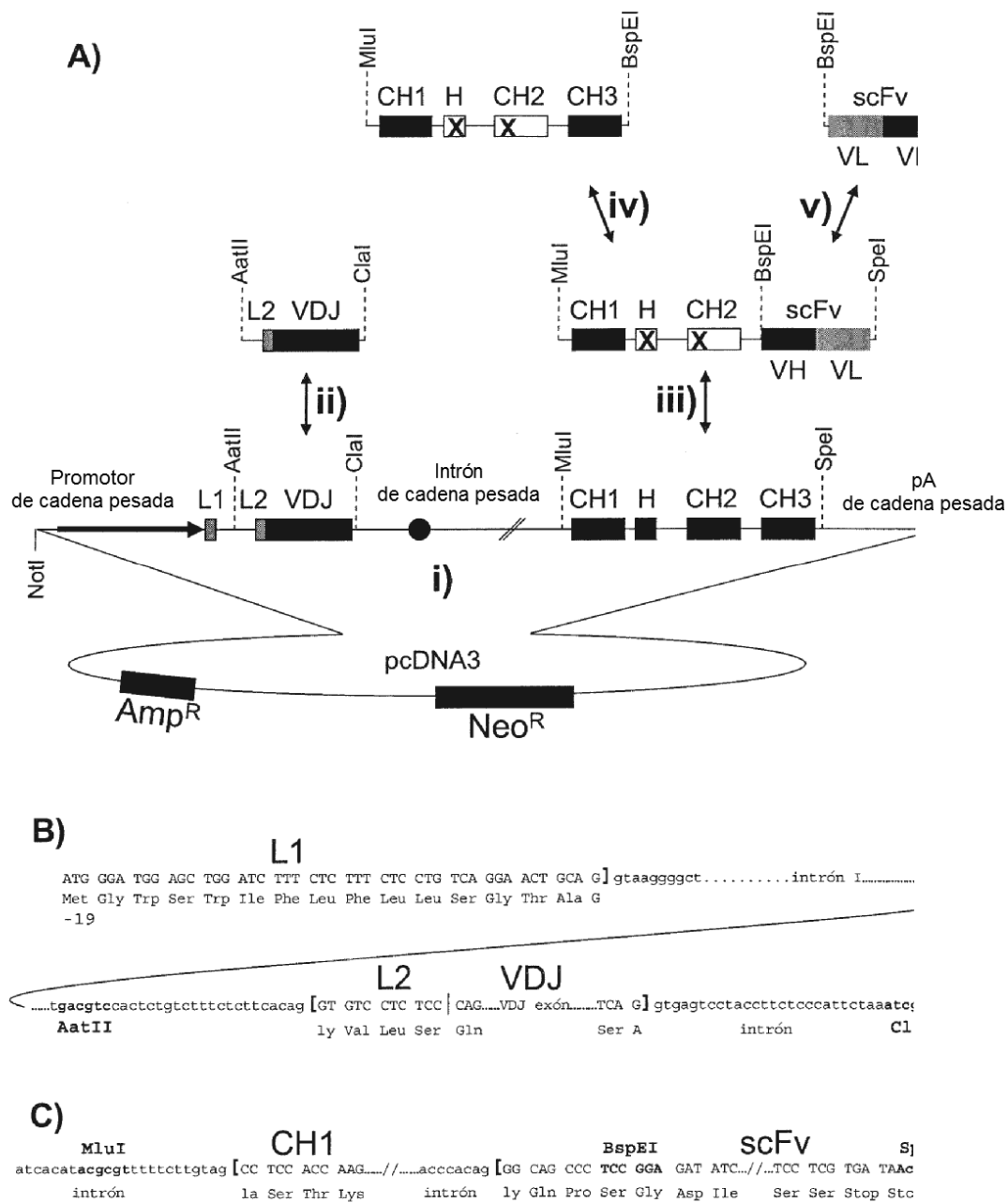


Fig. 2 CONT.

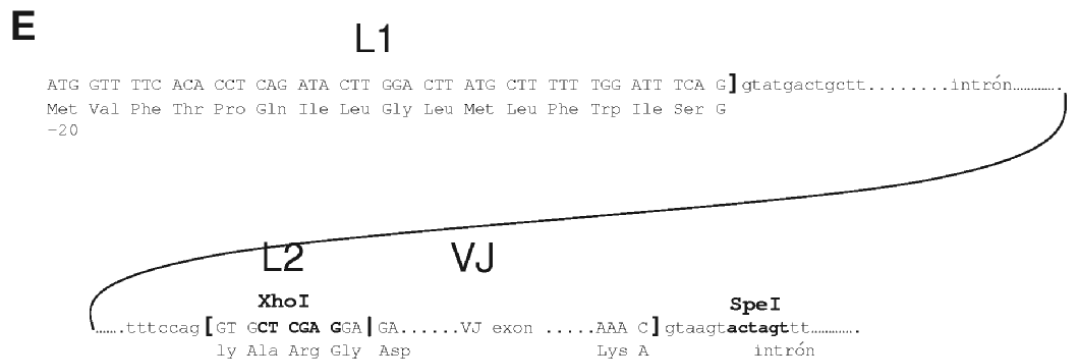
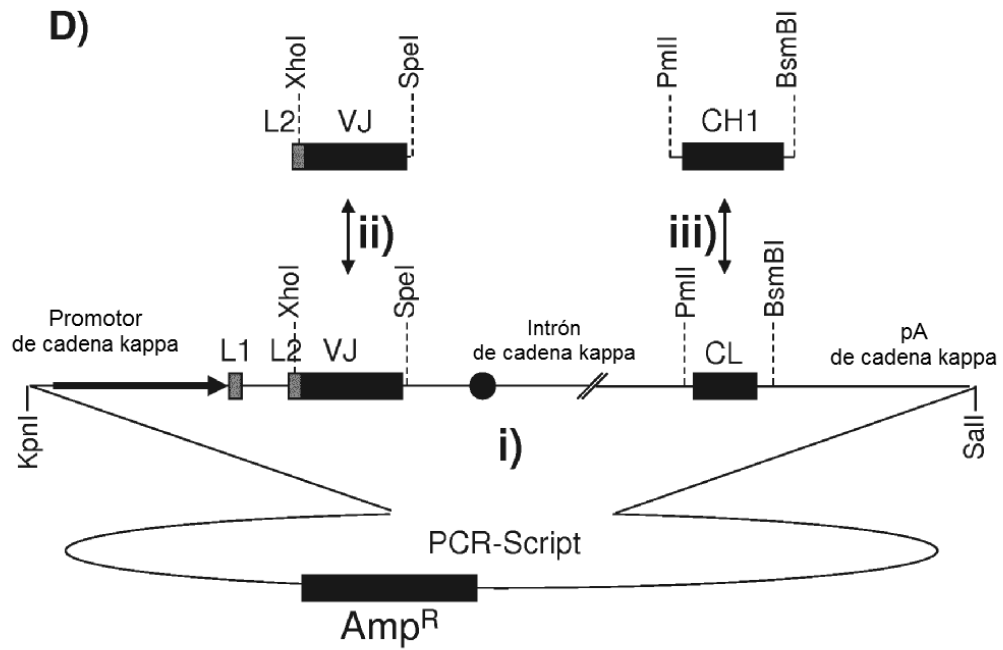
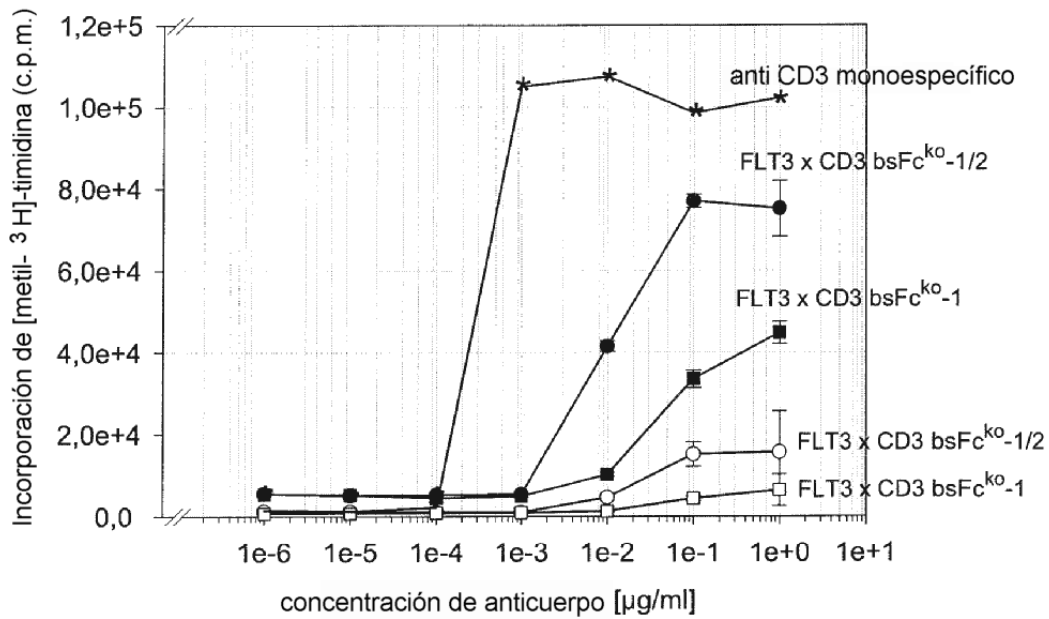


Fig. 3

Activación de células T restringida a células diana

A)



B)

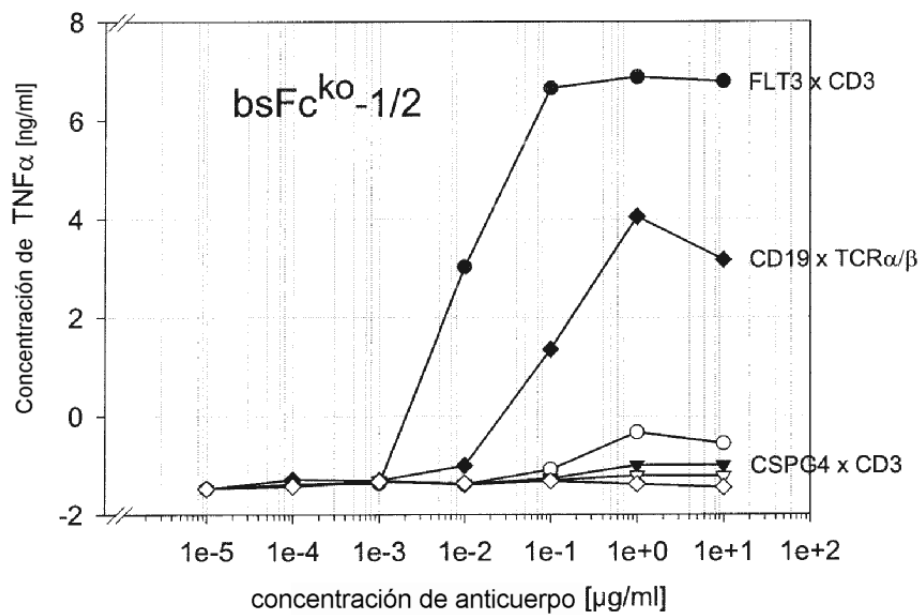


Fig. 4

Lisis específica de células tumorales

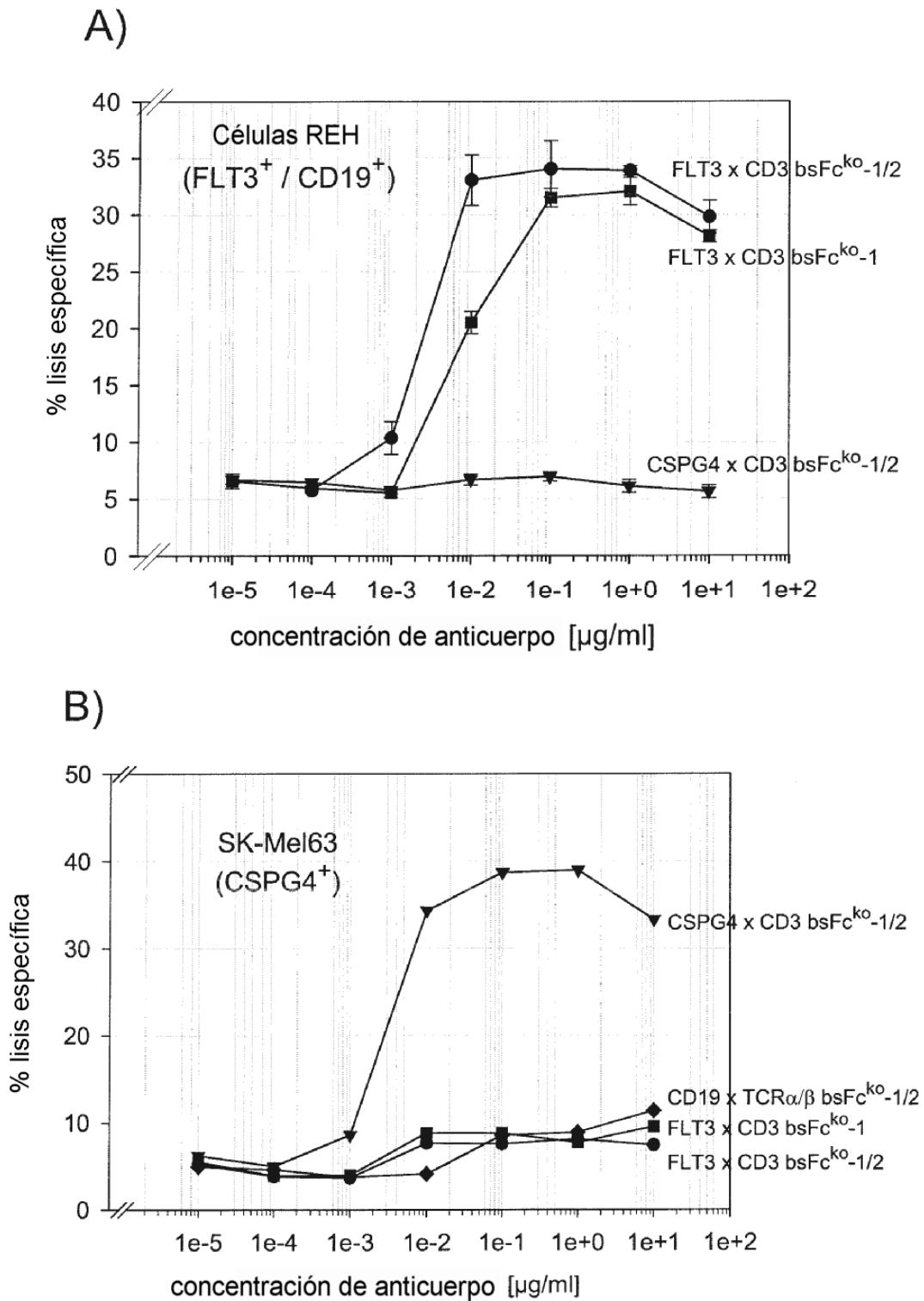
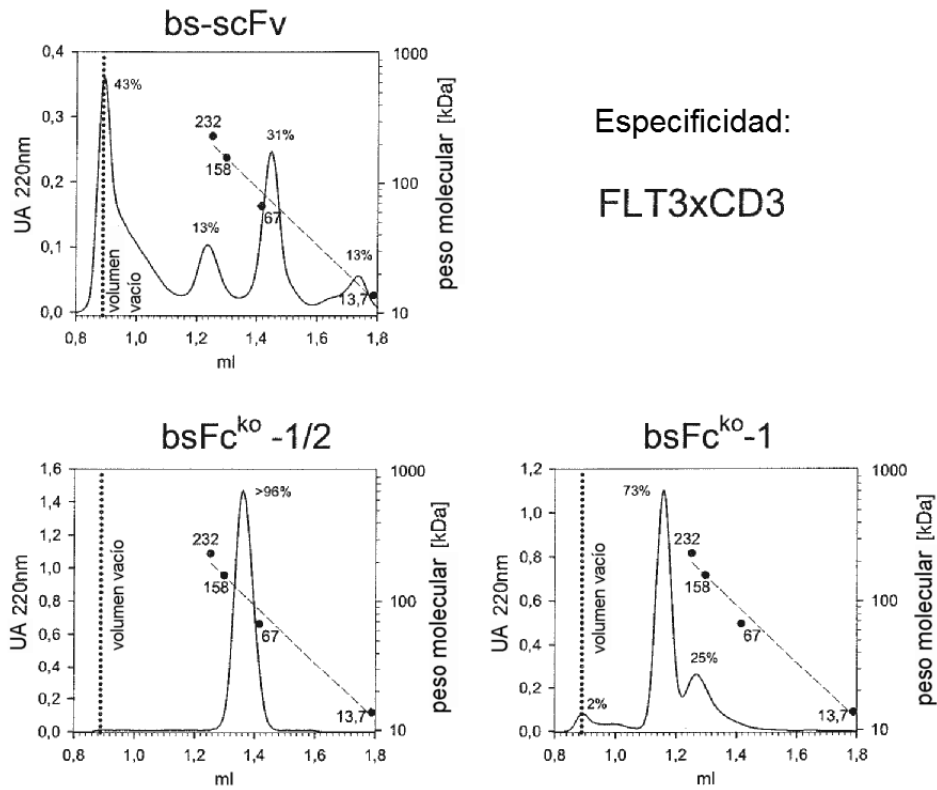


Fig. 5

A) Cromatografía de exclusión por tamaños



B) Tasas de producción

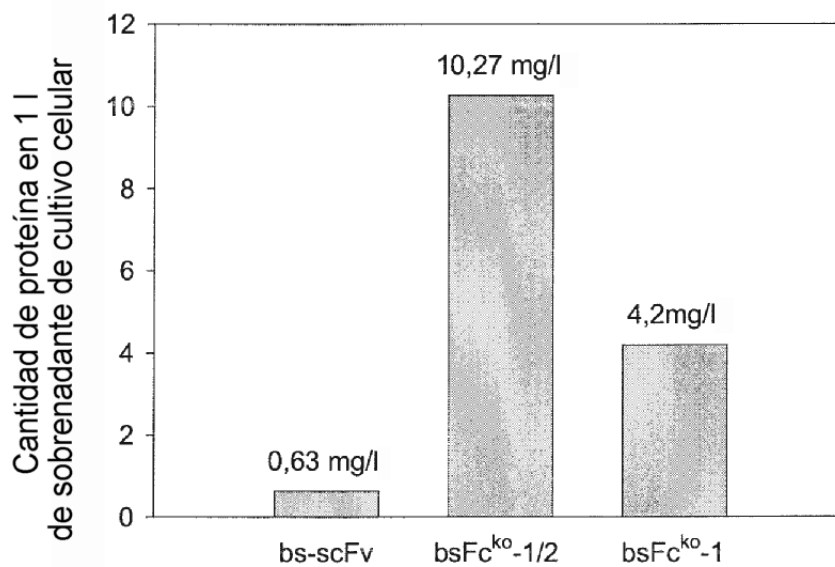


Fig. 6

A) secuencias de cadena ligera

1) cadena ligera quimérica anti-FLT3 (clon 4G8): (SEQ ID NO: 1)

**DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGS
GSGTDFTLINSVETEDFGVYFCQQSNTWPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC***

2) cadena ligera quimérica anti-FLT3 (clon BV10): (SEQ ID NO: 2)

**DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYMAWYQQKPGQPPLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC***

3) cadena ligera quimérica anti-CSPG4 (clon 9.2.27): (SEQ ID NO: 3)

**DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPLLIYLASNLESGVPA
RFGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC***

4) ligera quimérica anti-CD19 (clon 4G7) (SEQ ID NO: 4)

**DIVMTQAAPSIPVTPGESVVISCRSSKSLNSNNGNTLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLASGV
DRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC***

5) cadena ligera anti-EGFR (clon 0225) (SEQ ID NO: 5)

**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSG
SGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC***

Fig. 6 CONT.

B) secuencias de cadena pesada/cadena principal

1) FLT3 x CD3; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única de CD3 C-terminal (clon UCHT1; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 6)

QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRP
GHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTPFDFW
GQGTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE**
YKCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQ**
KPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFS**SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGT**
KVEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGYSTGYTMNWVRQAP**
GKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGD
SDWYFDVWGQGT**LVTVSS***

2) FLT3 x CD3; bsFcko-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon BV10) y cadena única de CD3 C-terminal (clon UCHT1; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 7)

QVQLKQSGPGLVQPSQSL**SITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVWSSGGSTDYNAA**
FISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYYANHYYAMDYWGQGT**SVTVSSAST**
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW**
LNGKEYKCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYL**
NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFS**SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPW**
TFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGYSTGYTMN**
WVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RSGYYGDSDWYFDVWGQGT**LVTVSS***

Fig. 6 CONT.

3) FLT3 x TCR α/β ; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única de TCR α/β C-terminal (clon BMA031; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 8)

QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRP**GHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ**
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPFD**FWGQGTTLVSSASTKGPSV**
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVWVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK**
EYKCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYVMH**
WVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVT**KYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVHYCAR**
GSYYDYDGFVYGQGT**LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPA****IMSASPG****EKVTMTCSAT**
SSVS**SYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAE****DAATYYCQ**
QWSSNPLTFGAGTKLELK*

4) FLT3 x TCR α/β ; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon BV10) y cadena única de TCR α/β C-terminal (clon BMA031; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 9)

QVQLKQSGPGLVQPSQSL**SITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWL****GVIWSGGSTDYNAA**
FISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYYANHY**YAMDYWGQGT****SVTVSSAST**
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVWVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW**
LNGKEYKCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTS**
YVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVT**KYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVH**
YCARGSYDYDGFVYGQGT**LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPA****IMSASPG****EKVTMT**
CSATSSVS**SYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAE****DAATY**
YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK*

Fig. 6 CONT.

5) FLT3 x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 79.3; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 10)

QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRP**GHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ**
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPDFW**GQGTTLTVSSASTKGPSV**
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTV
PSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE**
YKCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSGDIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTS****LMQ**
WYQQKPGQPPKLLIF**AASNVESGVPARFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYT**
FGGG**TKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGQVKLQQSGPGLVTPSQSL****SITCTVSGFSLSDYGVHW**
VRQSPGQGLEWL**GVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARD**
KGYSYYYSMDYWGGGTTVTVSS*

6) FLT3 x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon BV10) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 9.3; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 11)

QVQLKQSGPGLVQPSQSL**SITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWL****GVIWSGGSTDYNA**
FISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYYANHYYAMDYWGQGT**SVTVSSAST**
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VWTVPS**SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT**
LMISRTPEVTCVVVGVS**HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW**
LNGKEYKCKVSNKQLPSP**IEKTISKAKGQPSG**
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTS**LMQWYQQKPGQPPKLLIF****AASNVESGVPA**
RFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGG**TKLEIKRGGGGSGGGGSGGGG**
SQVKLQQSGPGLVTPSQSL**SITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWL****GVIWAGGGTNYNS**
ALMSRKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGGGTTVTVSS*

Fig. 6 CONT.

7) FLT3 x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única de CD16 C-terminal (clon 3G8; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 12)

QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPFDWGGQTTLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSFMN
WYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNEDPYTF
GGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLRTSGMGVGW
IRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQINP
AWFAYWGQGTLVTVSS*

8) FLT3 x CD 16; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon BV10) y cadena única de CD16 C-terminal (clon 3G8; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 13)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGSTDYNAA
FISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYYANHYYAMDYWGQGTSVTVSSAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDG
DSFMNWYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNE
DPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLRTSG
MGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYY
CAQINPAWFAYWGQGTLVTVSS*

Fig. 6 CONT.

9) CD19 x CD3, bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CD19 N-terminal (clon 4G7) y cadena única de anti-CD3 C-terminal (clon UCHT1; orientación VL-VH)]: que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 14)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTYNE
KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLN
WYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWT
FGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFTGYTMNW
VRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS
GYGDSDWYFDVWGQGTTLTVSS*

10) CD19 x TCRα/β; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CD19 N-terminal (clon 4G7) y cadena única de TCRα/β C-terminal (clon BMA031; orientación VL-VH)]: que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 15)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTYNE
KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSY
VMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVHY
CARGSYDYDGFVYGGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC
SATSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEDAATYY
CQQWSSNPLTFGAGTKLELK*

Fig. 6 CONT.

11) CD19 x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CD19 N-terminal (clon 4G7) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 9.3; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 16)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTYNE
KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSG
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFAASNVESGVPA
RFSGSGGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGG
SQVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWLGVWAGGGTNYNS
ALMSRKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTTLTVSS*

12) CD19 x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CD19 N-terminal (clon 4G7) y cadena única de CD16 C-terminal (clon 3G8; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 17)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTYNE
KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSG**DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVD****FDGD**
SFMNWYQQKPGQPPKLLIYT**TSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNED**
PYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPGILQPSQTL**SLTCSFSGFSLRTSGM**
GVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYC
AQINPAWFAYWGQGTTLTVSS*

Fig. 6 CONT.

13) CSPG4 x CD3, bsFc^{ko} -1/2 [cadena pesada quimérica anti-CSPG4 N-terminal (clon 9.2.27) y cadena única de anti-CD3 C-terminal (clon UCHT1; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 18)

QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSRSWMNWVKQRPQGLEWIGRIYPGDGDTNYN
GKFKGKATLTADKSSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVVPYTMDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIRNY
LNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNLTP
WTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTM
NWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARSGYYGDSDWYFDVWGQGLTVTVSS*

14) CSPG4 x TCRα/β; bsFc^{ko} -1/2 [cadena pesada quimérica anti-CSPG4 N-terminal (clon 9.2.27) y cadena única de TCRα/β C-terminal (clon BMA031; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 19)

QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSRSWMNWVKQRPQGLEWIGRIYPGDGDTNYN
GKFKGKATLTADKSSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVVPYTMDYWGQGTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFT
SYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAV
 HYCARGSYDYDGFVYGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTM
TCSATSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAT
 YYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK*

Fig. 6 CONT.

15) CSPG4 x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CSPG4 N-terminal (clon 9.2.27) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 9.3; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 20)

QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSRSWMNWVKQRPQGQLEWIGRIYPGDGDTNYN
GKFKGKATLTADKSSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVVPYTM**MDYWGQGTTVTVSSAS**
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVWVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSG
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFAA**SNVESGVPA**
RFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGG**TKLEIKRGGGGSGGGGSGGGG**
SQVKLQQSGPGLVTPSQSL**SITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWL****GVWAGGGTNYS**
ALMSRKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTTVTVSS*

16) CSPG4 x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-CSPG4 N-terminal (clon 9.2.27) y cadena única de CD16 C-terminal (clon 3G8; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 21)

QVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSRSWMNWVKQRPQGQLEWIGRIYPGDGDTNYN
GKFKGKATLTADKSSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVVPYTM**MDYWGQGTTVTVSSAS**
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVWVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSG**DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFD**
GDSFMN**WYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSN**
EDPYTFGGG**TKLEIKGGGGSGGGGSGGGG****SQVTLKESGPGILQPSQTL****SLTCSFSGFSLRTSG**
MGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYY
CAQINPAWFAYWGQGLTVTVSS*

Fig. 6 CONT.

17) EGFR x CD3; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-EGFR N-terminal (clon C225) y cadena única de CD3 C-terminal (clon UCHT1; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 22)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGT**LVTVSSASTKGPS**
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQ
QKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQ
GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQ
APGKGLEWVALINPYKGVSTYNQFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY
GDSDWYFDVWGQGT**LVTVSS***

18) EGFR x TCRα/β; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-EGFR N-terminal (clon C225) y cadena única de TCRα/β C-terminal (clon BMA031; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 23)

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGT**LVTVSSASTKGPS**
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYVMH
WVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVHYCAR
GSYYDYDGFVYGGGT**LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAT**
SSVSVMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQ
QWSSNPLTFGAGTKLELK*

Fig. 6 CONT.

19) EGFR x CD28; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-EGFR N-terminal (clon C225) y cadena única de CD28 C-terminal (clon 9.3; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 24)

**QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWSSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGK
EYCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSG
 DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQKPGQPPKLLIFAASNVESGVPA
 RFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGSGGGG
SQVKLQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWLGVWAGGGTNYNS
ALMSRKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDAVYYCARDKGYSYYSMDYWGQGLTVTVSS***

20) EGFR x CD16; bsFc^{ko}-1/2 [cadena pesada quimérica anti-EGFR N-terminal (clon C225) y cadena única de CD16 C-terminal (clon 3G8; orientación VL-VH)], que es una cadena de una hemimolécula de glicano-variante de ko (SEQ ID NO: 25)

**QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWSSGGNTDYNTP
FTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVGVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGK
EYCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPSGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSEFM
NWYQKPGQPPKLLIYTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNEDPYT
 FGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFGFSLRTSGMGVG
 WIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQIN
PAWFAYWGQGLTVTVSS***

Fig. 6 CONT.

21) FTL3 x CD3; bsFc^{ko}-1 [cadena pesada quimérica anti-FLT3 N-terminal (clon 4G8) y cadena única de CD3 C-terminal (clon UCHT1; orientación VL-VH)], que es una cadena de una molécula (completa) variante de ko que incluye un dominio CH3, no un glicomutante (SEQ ID NO: 26)

QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPDFWGGTTLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKQLPSPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSR
 FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSE
 VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQ
KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGGTTLTVSS*