

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 111**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 16/44	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2015 PCT/EP2015/078155**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087416**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2015 E 15804386 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3227332**

54 Título: **Anticuerpos multiespecíficos**

30 Prioridad:

03.12.2014 EP 14196046

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

02.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRINKMANN, ULRICH;
SCHAEFER, WOLFGANG y
MAYER, KLAUS**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 764 111 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

Anticuerpos multiespecíficos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos, procedimientos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y usos de los mismos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las proteínas genomanipuladas, tales como anticuerpos bi o multiespecíficos que se pueden unir a dos o más antígenos, son conocidas en la técnica. Dichas proteínas de unión multiespecífica se pueden generar usando técnicas de fusión celular, conjugación química o ADN recombinante.

15 Se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos multiespecíficos recombinantes en el pasado reciente, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos tetravalentes por fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios monocatenarios (véase, por ejemplo, Coloma, M.J., *et al.*, Nature Biotech. 15 (1997) 159-163; documento WO 2001/077342; y Morrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234).

20 Una desventaja en la generación de anticuerpos multiespecíficos es la formación de subproductos con emparejamientos incorrectos, que se tienen que separar de los anticuerpos multiespecíficos deseados por procedimientos de purificación complejos, y reducen el rendimiento de producción.

25 Un enfoque para superar el problema de los subproductos con emparejamientos incorrectos, que es conocido como "tecnología de botones en ojales", tiene como objetivo forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpo diferentes introduciendo mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfase de contacto. En una cadena se reemplazaron aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "ojal". A la inversa, se introdujeron aminoácidos con cadenas laterales grandes en el otro dominio CH3, para crear un "botón". Al coexpresar estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que tienen que ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se observaron rendimientos altos de formación de heterodímero ("botón-ojal") frente a la formación de homodímero ("ojal-ojal" o "botón-botón") (Ridgway, J.B., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y documento WO 96/027011). El porcentaje de heterodímero se podría incrementar adicionalmente remodelando las superficies de interacción de los dos dominios CH3 usando un enfoque de presentación en fagos y la introducción de un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35).

40 El documento WO 2010/115598 A1 divulga anticuerpos biespecíficos trivalentes basados en una molécula de IgG de longitud completa mono-específica, en los que en los respectivos extremos C de cada una de las cadenas pesadas se fusionan un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera para formar un tercer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno. Para promover la heterodimerización de las dos cadenas pesadas modificadas, se sugiere la modificación de los dominios CH3 de acuerdo con la tecnología de botones en ojales.

45 También se han desarrollado otros formatos de anticuerpos varios, en los que la estructura central del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) ya no está mantenida; tales como dímeros, trímeros o tetrámeros, minicuerpos y varios formatos monocatenarios (scFv, Bis-scFv), que se pueden unir a dos o más antígenos (Holliger, P., *et al.*, Nature Biotech. 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., y Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., *et al.*, J. Immunol. Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., *et al.*, Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297). Todos de dichos formatos usan enlazadores para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a otra proteína de unión (por ejemplo, scFv) o bien para fusionar, por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv (Fischer, N., y Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14).

50 El documento WO 2014/144357 A1 divulga anticuerpos multiespecíficos, es decir, TetBiAb que comprenden al menos tres sitios de unión a antígeno en los que los dos sitios de unión a antígeno adicionales se forman por un segundo par de fragmentos Fab unidos al extremo C de los fragmentos Fab del anticuerpo.

55 El documento WO 94/09131 divulga anticuerpos multiespecíficos, en los que una primera y una segunda región de unión formada por fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fab, se asocian entre sí por dominios de asociación que se pueden unir entre sí. De acuerdo con el documento WO 94/09131, un dominio de asociación (por ejemplo, un dominio VH y VL, respectivamente) se fusiona a cada uno de los fragmentos Fab, de modo que la primera y segunda región de unión se combinan para proporcionar una única proteína que incluye ambas especificidades de unión.

60 Los fragmentos de anticuerpo tienen tanto pros como contras como productos terapéuticos en comparación con los anticuerpos monoclonales de tamaño normal: Una ventaja es que son más pequeños y penetran en tejidos y tumores más rápidamente. Además, se ha sugerido que el pequeño tamaño de los fragmentos permite la unión a epítomos no accesibles para los anticuerpos monoclonales de tamaño normal. Como inconveniente, los fragmentos demuestran semividas en

circulación breves en seres humanos, probablemente debido al aclaramiento renal. La semivida más breve puede prevenir la acumulación suficiente de tratamiento en el sitio seleccionado. La producción de fragmentos de anticuerpo no es trivial, ya que es probable que los fragmentos formen agregados y puedan ser menos estables que los anticuerpos monoclonales de tamaño normal. Además, el emparejamiento no deseado de cadenas pesadas y ligeras no análogas da como resultado la formación de sitios de unión a antígeno inactivos y/u otros productos secundarios no deseados no funcionales, lo que es un problema principal en la producción a escala clínica y en la aplicación terapéutica de los fragmentos de anticuerpo.

Estas desventajas se superan con el formato de anticuerpo de la invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos tres sitios de unión a antígeno, en el que dos sitios de unión a antígeno se forman por un primer fragmento Fab y un segundo fragmento Fab de antígeno, en el que

a) un tercer sitio de unión a antígeno se forma por un dominio variable de la cadena pesada (VH₃) y un dominio variable de la cadena ligera (VL₃), en el que

- el extremo N del dominio VH₃ se conecta al extremo C del dominio constante de la cadena pesada (CH1) o del dominio constante de la cadena ligera (CL) del primer fragmento Fab por medio de un primer conector peptídico, y

- el extremo N del dominio VL₃ se conecta al extremo C del dominio constante de la cadena pesada (CH1) o del dominio constante de la cadena ligera (CL) del segundo fragmento Fab por medio de un segundo conector peptídico,

b) el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por

i) generación de una protuberancia en uno de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, y generación de una cavidad en el otro de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los dominios CH3 es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3; o

sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente, y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente;

ii) introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3, o

iii) ambas modificaciones de i) y ii);

c) el extremo C del dominio VH₃ del tercer sitio de unión a antígeno se conecta a uno de los dominios CH3, y el extremo C del dominio VL₃ del tercer sitio de unión a antígeno se conecta al otro de los dominios CH3, y

d) el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de los dominios constantes de la cadena pesada 2 (CH2).

Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico, en el que

i) los dominios CH3 se alteran por generación de una protuberancia en uno de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, y generación de una cavidad en el otro de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los dominios CH3 es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3; o

sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente, y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente;

ii) los dominios CH3 se alteran por introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3; y

en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat):

- VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;
- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o
- VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico, en el que

i) los dominios CH3 se alteran por generación de una protuberancia en uno de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, y generación de una cavidad en el otro de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los dominios CH3 es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3; o

sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente, y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente;

ii) los dominios CH3 se alteran por introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3; y

en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100.

Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico, en el que el primer y segundo conector peptídico son péptidos de al menos 15 aminoácidos. Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico, en el que el primer y segundo conector peptídico son péptidos de al menos 15 - 70 aminoácidos. Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico, en el que el primer y segundo conector peptídico son péptidos que consisten en residuos de glicina y serina.

Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico, en el que el extremo C del dominio VH₃ se conecta directamente a uno de los dominios CH3, y el extremo C del dominio VL₃ se conecta directamente al otro de los dominios CH3.

Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico trivalente. Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico biespecífico trivalente. Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico biespecífico trivalente, en el que el primer y el segundo fragmento Fab se unen específicamente a un primer antígeno, y en el que el tercer sitio de unión se une específicamente a un segundo antígeno, que es diferente del primer antígeno.

Un modo de realización de la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico trispecífico trivalente.

Otro aspecto de la invención es un complejo que comprende (i) un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el anticuerpo se une específicamente al menos a un hapteno y una proteína diana, y (ii) el hapteno, que está unido por el anticuerpo multiespecífico, en el que el hapteno se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la preparación del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de

- transformar una célula huésped con vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multiespecífico,
- cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo multiespecífico, y
- recuperar dicho anticuerpo multiespecífico de dicho cultivo de célula huésped.

Otro aspecto de la invención es un ácido nucleico que codifica el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención es una célula huésped que comprende el vector de expresión de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención.

5 Los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención por una parte muestran nuevas propiedades debido a su unión a diferentes antígenos, y por otra parte son adecuados para la producción y formulación farmacéutica debido a su estabilidad, baja agregación y propiedades farmacocinéticas y biológicas (por ejemplo, bajo aclaramiento renal debido a que tienen aproximadamente el mismo peso molecular que una IgG de longitud completa; semivida en suero media debido a que evita la unión a FcRn). Se evitan productos secundarios con emparejamientos incorrectos debido al uso de estrategias de heterodimerización asimétrica. Debido a la disposición distintiva de los al menos tres sitios de unión unos con respecto a otros, los anticuerpos de acuerdo con la invención son en particular adecuados para unirse a múltiples antígenos presentes en la superficie de una única célula o para unirse a diferentes epítomos en un antígeno. Ya que ningún dominio CH2 está presente en los anticuerpos de acuerdo con la invención, se anula la mediación de las funciones efectoras por los anticuerpos.

15 **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: diseño de anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención.

20 **Figura 1:** estructura de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención. El anticuerpo comprende dos fragmentos Fab como brazos de unión que forman un primer y segundo sitio de unión. Un tercer sitio de unión a antígeno formado por los dominios VH₃ y VL₃ que se fusiona al extremo N de los respectivos dominios CH3. Los conectores peptídicos enlazan el extremo N de los dominios VH₃ y VL₃ con el primer y segundo fragmento Fab, respectivamente. Se promueve la heterodimerización de las cadenas polipeptídicas incluyendo el dominio VH₃ o bien el VL₃ por alteración de los dominios CH3 al menos uno de los enfoques de la estabilización con disulfuro y genomanipulación de CH3 por la tecnología de botones en ojales (denominada en todas las figuras "genomanipulado por KiH") o por introducción de aminoácidos con carga opuesta en las correspondientes posiciones de la interfase CH3/CH3 (denominado en todas las figuras "genomanipulado (+/-)"). Además, se puede aplicar estabilización con disulfuro en la interfase VH₃/VL₃ (no indicado). En esta ilustración, los fragmentos Fab se unen al mismo epítomo. Sin embargo, se pueden generar anticuerpos trispecíficos de acuerdo con la invención usando dos fragmentos Fab que se unen a diferentes epítomos.

Figura 2: diseño de anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención que comprenden un primer fragmento Fab y un segundo fragmento Fab.

35 **Figura 2A:** estructura de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención (lado derecho) en comparación con una IgG de longitud completa (lado izquierdo). Un tercer sitio de unión a antígeno formado por los dominios VH₃ y VL₃, que reemplazan los dominios CH2 de una molécula de IgG de longitud completa. Se retiraron los disulfuros de bisagra para garantizar el acceso a antígeno conectando los fragmentos Fab con VH₃ y VL₃ por medio de conectores peptídicos que carecen de un enlace disulfuro intercatenario. Se promueve la heterodimerización de las cadenas polipeptídicas incluyendo el dominio VH₃ o bien el VL₃ por alteración de dominios CH3 al menos uno de los enfoques de la estabilización con disulfuro y genomanipulación de CH3 por la tecnología de botones en ojales o por introducción de aminoácidos con carga opuesta en las correspondientes posiciones de la interfase CH3/CH3. Además, se puede aplicar estabilización con disulfuro en la interfase VH₃/VL₃ (no indicado).

45 **Figura 2B:** estructura de los anticuerpos biespecíficos generados en el ejemplo 1. Se usaron los conectores peptídicos (Gly4Ser)₄ para fusionar el primer y segundo fragmento Fab con VH₃ o bien VL₃. Además, se promovió la heterodimerización de las diferentes cadenas polipeptídicas por modificaciones de botones en ojales y estabilización con disulfuro en la interfase CH3 así como estabilización con disulfuro del sitio de unión a VH₃/VL₃ como se explica en detalle en el ejemplo 1.

50 **Figura 3: anticuerpos multiespecíficos ejemplares de acuerdo con la invención.**

Figura 3A: anticuerpo trispecífico, en el que el segundo fragmento Fab incluye un entrecruzamiento de dominios de los dominios VH₂ y VL₂, dando como resultado una arquitectura de dominio VL₂-CH1 (cadena pesada), VH₂-CL (cadena ligera). El primer fragmento Fab no incluye un entrecruzamiento de dominios, permaneciendo así en la arquitectura de dominio natural de VH₁-CH1, VL₁-CL.

60 **Figura 3B:** anticuerpo trispecífico, en el que el segundo fragmento Fab incluye un entrecruzamiento de dominios de los dominios VH-CH1 y VL-CL, dando como resultado una arquitectura de dominio VL₂-CL (cadena pesada), VH₂-CH1 (cadena ligera). El primer fragmento Fab no incluye un entrecruzamiento de dominios, permaneciendo así en la arquitectura de dominio natural de VH₁-CH1, VL₁-CL.

65 **Figura 3C:** anticuerpo trispecífico, en el que el segundo fragmento Fab incluye un entrecruzamiento de dominios de los dominios CH1 y CL, dando como resultado una arquitectura de dominio VH₂-CL (cadena pesada), VL₂-CH1 (cadena ligera). El primer fragmento Fab no incluye un entrecruzamiento de dominios, permaneciendo así en la arquitectura de dominio natural de VH₁-CH1, VL₁-CL.

Figura 3D: anticuerpo trispecífico, en el que el segundo fragmento Fab incluye un entrecruzamiento de dominios de los dominios CH1 y CL, dando como resultado una arquitectura de dominio VH₂-CL (cadena pesada), VL₂-CH1 (cadena ligera), y el primer fragmento Fab incluye un entrecruzamiento de dominios, de los dominios VH₁ y VL₁, dando como resultado una arquitectura de dominio VL₂-CH1 (cadena pesada), VH₂-CL (cadena ligera).

Figura 3E: anticuerpo trispecífico, en el que el segundo fragmento Fab es un fragmento Fab monocatenario.

Figura 4: diseño de conexión flexible entre fragmentos Fab y el tercer sitio de unión que permite el acceso a antígeno.

Figura 4A: retirada de disulfuros de la región bisagra por conectores peptídicos suficientemente largos sin disulfuros intercatenarios que permiten acceso a antígeno para el tercer sitio de unión a antígeno. Para estabilizar el formato de anticuerpo generado, se requiere al menos un enfoque de heterodimerización además de la interacción VH₃/VL₃ natural (indicado: disulfuros en líneas gruesas, modificaciones de botones en ojales en la interfase CH3/CH3).

Figura 4B: Comparación de sitios de conexión de IgG1 naturales entre CH1, región bisagra y CH2 con los sitios de fusión de CH1, conector peptídico, dominio VH₃ del anticuerpo generado de acuerdo con el ejemplo 1.

Figura 5: diseño de interfase estabilizada entre dominios variables del tercer sitio de unión con sus respectivos dominios CH3.

Figura 5A: estabilización con disulfuro de ambos, el fragmento Fv que comprende VH₃ y VL₃ así como la interfase CH3/CH3 da lugar a residuos de cisteína introducidos artificialmente que se producen en estrecha proximidad (a) entre sí, y (b) con cisteínas que forman enlaces disulfuro intracatenarios naturales en los respectivos dominios variables o constantes. Debido a la estrecha proximidad de dichos residuos de cisteína se puede producir un emparejamiento incorrecto potencial a favor de la formación de enlaces disulfuro deseados lo que da lugar a un plegamiento incorrecto de la proteína y reducción del rendimiento (como se indica en la tabla).

Figura 5B: sitio de fusión ejemplar de VL₃ con CH3 como se usa en un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención descrito en el ejemplo 1, en el que el tercer sitio de unión se une específicamente a digoxigenina. Los residuos de cisteína introducidos adicionalmente se indican dentro de la secuencia de aminoácidos en negrita y subrayados (SEQ ID NO: 01). Los extremos N alternativos de los dominios CH3 aplicables para fusión con un dominio VH₃ o VL₃ se indican a continuación (SEQ ID NO: 02, SEQ ID NO: 03, SEQ ID NO: 04).

Figura 6: resultados de purificación de anticuerpos biespecíficos del ejemplo 1.

Figura 6A: (A) cromatograma representativo de Kappa-Select de un anticuerpo, en el que el tercer sitio de unión se une específicamente a digoxigenina (BsAb CD33-Dig(SS)-CD33). (B)-(D) cromatografía de exclusión por tamaño de las fracciones de unión de Kappa-Select de BsAb CD33-Dig(SS)-CD33, LeY-Dig(SS)-LeY y GPC3-Dig(SS)-GPC3. Las cajas sombreadas indican fracciones que contienen anticuerpo plegado apropiadamente. (E) SDS-PAGE de anticuerpos purificados sin (n.r.) y con (r.) reducción de muestra.

Figura 6B: (A)-(C) cromatografía de exclusión por tamaño de las fracciones de unión de Kappa-Select de BsAb Dig-CD33-Dig, Dig-LeY-Dig y Dig-GPC3-Dig. Las cajas sombreadas indican fracciones que contienen anticuerpo plegado apropiadamente. (D) SDS-PAGE de anticuerpos purificados sin (n.r.) y con (r.) reducción de muestra.

Figura 7: resultados de estudios de unión de anticuerpos biespecíficos del ejemplo 1. Unión a antígeno simultánea de los anticuerpos generados en el ejemplo 1 como se analiza por análisis FACS en células MCF7 que expresan LeY, células Molm13 que expresan CD33 y células HepG2 que expresan GPC3 usando Dig-Cy5 como carga para abordar la unión a hapteno.

Figura 8: resultados de estudios de unión de anticuerpos biespecíficos del ejemplo 6. Unión a antígeno simultánea de los BsAb BsAb LeY-Bio(SS)-LeY generados en el ejemplo 6 como se analiza por análisis FACS en células MCF7 que expresan LeY y negativas para CD33 usando Cy5 biotinilada como carga para abordar la unión a hapteno.

Figura 9: ilustración esquemática del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención complejo con una toxina como carga. Se indica un complejo formado entre un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención (se pueden formar complejos de anticuerpos con múltiples especificidades en consecuencia) con una carga. El tercer sitio de unión de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se une específicamente a un hapteno (por ejemplo digoxigenina, biotina) mientras que el primer y segundo sitio de unión se unen a moléculas diana (por ejemplo antígenos asociados a tumor, como LeY, CD33, GPC3). El complejo se forma poniendo en contacto una carga acoplada a hapteno (por ejemplo una toxina, como exotoxina de *Pseudomonas*, PE) con el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención. El complejo se puede usar para el suministro de carga dirigido a células que expresan la molécula diana.

Figura 10: inhibición de proliferación celular de MCF7 por un complejo de BsAb LeY-Dig(SS)-LeY con PE con

digoxigenina. Se indican los resultados de un ensayo de incorporación BrdU como se describe en detalle en el ejemplo 5. El eje Y indica la incorporación de BrdU en células en proliferación.

5 **Figura 11: inhibición de proliferación celular de MCF7 por un complejo de BsAb LeY-Bio(SS)-LeY con PE biotinilada.** Se indican los resultados de un ensayo de incorporación BrdU como se describe en detalle en el ejemplo 6. El eje Y indica la incorporación de BrdU en células en proliferación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

10 **1. Definiciones**

Los términos "un", "una" y "el/la" incluyen en general referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

15 El término "resto de unión a antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a un resto que se une específicamente a un antígeno diana. El término incluye anticuerpos así como otras moléculas naturales (por ejemplo receptores, ligandos) o sintéticas (por ejemplo DARPs) que se pueden unir específicamente a un antígeno diana. En un modo de realización preferente, el resto de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con la invención es un fragmento de anticuerpo.

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

25 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv, scFab); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

30 Como se usa en el presente documento, un "fragmento Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. Como tal, el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab de un anticuerpo de acuerdo con la invención se refieren a dos restos Fab distintos, comprendiendo cada uno un dominio VL y CL así como un dominio VH y CH1.

35 Un "fragmento Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una ligera, opcionalmente en asociación no covalente.

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

45 Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de aminoácidos única.

50 Un "anticuerpo recombinante" es un anticuerpo que se ha producido por una célula huésped genomanipulada de forma recombinante. Está opcionalmente aislado o purificado.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

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

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

5 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoacídicos de HVR no humanas y residuos aminoacídicos de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas de las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente las FR completas corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado
10 opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

15 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para la evaluación de la pureza de anticuerpo, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

20 "Especificidad" se refiere a un reconocimiento selectivo de un epítipo particular de un antígeno por el resto de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. El término "anticuerpo monoespecífico" como se usa en el presente documento indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión de los que cada uno se une al mismo epítipo del mismo antígeno. Los "anticuerpos multiespecíficos" se unen a dos o más epítipos diferentes (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más epítipos diferentes). Los epítipos pueden estar en los mismos o diferentes antígenos. Un ejemplo de un anticuerpo multiespecífico es un "anticuerpo biespecífico" que se une a dos
25 epítipos diferentes. Cuando un anticuerpo posee más de una especificidad, los epítipos reconocidos se pueden asociar con un único antígeno o con más de un antígeno.

30 Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo o resto de unión a antígeno. El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico que se puede unir de forma específica a un anticuerpo o resto de unión a antígeno. En determinados modos de realización, los determinantes de epítipos incluyen agrupaciones de moléculas con superficies químicamente activas tales como aminoácidos, cadenas laterales de glucanos, fosforilo o sulfonilo, y, en determinados modos de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas.
35

Como se usa en el presente documento, los términos "unión" y "unión específica" se refieren a la unión del anticuerpo o resto de unión a antígeno a un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) con antígeno natural purificado. En determinados modos de realización, se dice que un anticuerpo o resto de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno cuando preferencialmente reconoce su antígeno diana en una mezcla de complejos de proteínas y/o macromoléculas.
40

La afinidad de la unión de un anticuerpo a un antígeno se define por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). En un modo de realización, unión o que se une específicamente quiere decir una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} mol/l o menos, en un modo de realización de 10^{-8} M a 10^{-13} mol/l. Por tanto, un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se une específicamente a cada antígeno para el que es específico con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} mol/l o menos, por ejemplo, con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} a 10^{-13} mol/l, en un modo de realización con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-9} a 10^{-13} mol/l.
45

50 Los términos "sitio de unión" o "sitio de unión a antígeno" como se usa en el presente documento indican la(s) región/regiones de una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo) a la que realmente se une un ligando (por ejemplo, el antígeno o fragmento de antígeno de él) y que, preferencialmente, se deriva de un anticuerpo. En el caso de anticuerpos, el sitio de unión a antígeno incluye dominios variables de la cadena pesada de anticuerpo (VH) y/o dominios variables de la cadena ligera de anticuerpo (VL), o pares de VH/VL. El tercer sitio de unión a antígeno en el anticuerpo de acuerdo con la invención se forma por un par de VH/VL.
55

Los sitios de unión a antígeno derivados de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno deseado se pueden derivar a) de anticuerpos conocidos que se unen específicamente al antígeno o b) de nuevos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo obtenidos por procedimientos de inmunización *de novo* usando entre otros la proteína antigénica o ácido nucleico o bien fragmentos del mismo o por presentación en fagos.
60

65 Cuando se deriva de un anticuerpo, un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede contener seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que contribuyen en grados variables a la afinidad del sitio de unión para antígeno. Existen tres CDR de dominios variables de la cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR de dominios variables de la cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las CDR y regiones estructurales (FR) se determina por comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en la

que las regiones se han definido de acuerdo con la variabilidad entre las secuencias. También se incluyen dentro del alcance de la invención sitios de unión a antígeno funcionales compuestos de menos CDR (es decir, donde la especificidad de unión se determina por tres, cuatro o cinco CDR). Por ejemplo, menos de un conjunto completo de 6 CDR puede ser suficiente para la unión.

5

El término "valente" como se usa en el presente documento indica la presencia de un número especificado de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Un anticuerpo natural, por ejemplo, tiene dos sitios de unión y es bivalente. Como tal, el término "trivalente" indica la presencia de tres sitios de unión en una molécula de anticuerpo.

10

Los "dominios variables" o "región variable" como se usa en el presente documento indica cada uno del par de cadenas ligera y pesada que está implicado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. El dominio variable de una cadena ligera se abrevia como "VL" y el dominio variable de una cadena pesada se abrevia como "VH". De acuerdo con lo mencionado anteriormente, se hace referencia en el presente documento a los dominios variables del tercer sitio de unión usando "VH₃" y "VL₃", indicando el número tres el tercer sitio de unión.

15

Los dominios variables de cadenas ligeras y cadenas pesadas humanas tienen la misma estructura general. Cada dominio variable comprende cuatro regiones estructurales (FR), de las que sus secuencias están ampliamente conservadas. Las FR se conectan por tres "regiones hipervariables" (o "regiones determinantes de la complementariedad", CDR). Las CDR en cada cadena se separan por dichos aminoácidos de región estructural. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden en sentido de N a C terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las FR adoptan una conformación de lámina beta y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las FR y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena un "sitio de unión a antígeno". En especial, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión a antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

20

25

En anticuerpos naturales, los dominios VL y VH se disponen terminalmente en las cadenas ligeras y cadenas pesadas, respectivamente, lo que permite el acceso del antígeno, garantizando así la unión a antígeno. Dentro de un anticuerpo de acuerdo con la invención, los dominios VL₃ y VH₃ del tercer sitio de unión pueden estar dispuestos entre dos dominios constantes. Aunque está rodeada por dominios constantes, sorprendentemente se observó la unión específica del tercer sitio de unión.

30

El término "dominios constantes" o "región constante" como se usa dentro de la actual solicitud indica la suma de los dominios de un anticuerpo distintos de la región variable. La región constante no está implicada directamente en la unión de un antígeno, pero presenta diversas funciones efectoras.

35

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las "clases": IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estas se pueden dividir además en subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de la cadena ligera (CL) que se pueden encontrar en las cinco clases de anticuerpos se llaman κ (kappa) y λ (lambda).

40

Los "dominios constantes" como se usa en el presente documento son de origen humano, que es de una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región constante de la cadena ligera kappa o lambda. Dichas regiones y dominios constantes son bien conocidos en el estado de la técnica y, por ejemplo, se describen por Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

45

La "región bisagra" se define en general como una extensión de aproximadamente Glu216, o aproximadamente Cys226, a aproximadamente Pro230 de IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)). El anticuerpo de acuerdo con la invención está desprovisto de disulfuros de la región bisagra.

50

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Una cadena ligera natural típicamente contiene dos dominios de inmunoglobulina, normalmente un dominio variable (VL) que es importante para la unión a un antígeno y un dominio constante (CL).

55

Existen varios tipos diferentes de "cadenas pesadas" que definen la clase o isotipo de un anticuerpo. Una cadena pesada natural contiene una serie de dominios de inmunoglobulina, normalmente con un dominio variable (VH) que es importante para la unión a antígeno y varios dominios constantes (CH1, CH2, CH3, etc.).

60

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. A menos que se especifique de otro modo en el

65

presente documento, la numeración de residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD, 1991.

5 "Funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B. Debido a la estructura del anticuerpo de acuerdo con la invención, en particular atribuida a la falta de dominios CH2, se anulan las funciones efectoras mediadas por Fc por un anticuerpo de acuerdo con la invención.

10 "Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que las inmunoglobulinas (Ig) secretadas unidas sobre receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo linfocitos NK, neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en la ADCC, linfocitos NK, expresan solo Fc-gammaRIII, mientras que los monocitos expresan Fc-gammaRI, Fc-gammaRII y Fc-gammaRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337 o patente de EE. UU. n.º 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen PBMC y linfocitos NK. De forma alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se divulga en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

15 "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen a su antígeno análogo. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión a C1q incrementada o disminuida se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551 B1 y el documento WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

20 El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende de un residuo aminoacídico aproximadamente en la posición 231 a un residuo aminoacídico aproximadamente en la posición 340. El anticuerpo multiespecífico está desprovisto de un dominio CH2. Por "desprovisto de un dominio CH2" se quiere decir que los anticuerpos de acuerdo con la invención no comprenden un dominio CH2.

25 El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C terminales a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de un residuo aminoacídico aproximadamente en la posición 341 a un residuo aminoacídico aproximadamente en la posición 447 de una IgG). Dentro de un anticuerpo de acuerdo con la invención, un dominio CH3 respectivo está dispuesto en el extremo C del dominio VH₃ y VL₃ del tercer sitio de unión. Los "dominios CH3" en el presente documento son dominios CH3 variantes, en los que la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 natural se sometió a al menos una sustitución aminoacídica distinta (es decir, modificación de la secuencia de aminoácidos del dominio CH3) para promover la dimerización de los dos dominios CH3 enfrentados entre sí dentro del anticuerpo multiespecífico.

30 Se han descrito varios enfoques para modificaciones de CH3 para soportar la heterodimerización, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291, que se incluyen en el presente documento por referencia.

35 Típicamente, en los enfoques de heterodimerización conocidos en la técnica, el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se genomanipulan ambos de manera complementaria de modo que la cadena pesada que comprende un dominio CH3 genomanipulado ya no se puede homodimerizar con otra cadena pesada de la misma estructura. De este modo, la cadena pesada que comprende un dominio CH3 genomanipulado se fuerza a heterodimerizarse con la otra cadena pesada que comprende el dominio CH3, que se genomanipula de manera complementaria.

40 Un enfoque de heterodimerización conocido en la técnica es el denominado tecnología de "botones en ojal", que se describe en detalle proporcionando varios ejemplos, por ejemplo, en el documento WO 96/027011, Ridgway, J.B., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; Merchant, A.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681; y documento WO 98/ 050431, que se incluyen en el presente documento por referencia. En la tecnología de "botones en ojal", dentro de la interfase formada entre dos dominios CH3 en la estructura terciaria del anticuerpo, se genomanipulan aminoácidos particulares en cada dominio CH3 para producir una protuberancia ("botón") en uno de los dominios CH3 y una cavidad ("ojal") en el otro de los dominios CH3, respectivamente. En la estructura terciaria del anticuerpo multiespecífico, la protuberancia introducida en un dominio CH3 es posicionable en la cavidad introducida en el otro dominio CH3.

- Otras técnicas para modificar los dominios CH3 de las cadenas pesadas de un anticuerpo multiespecífico (aparte de la tecnología de "botones en ojales") para forzar la heterodimerización son conocidas en la técnica. Estas tecnologías, en especial las descritas en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 y WO 2013/096291 se contemplan en el presente documento como alternativas a la "tecnología de botón en ojal" en combinación con un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención. El anticuerpo multiespecífico que incluye una de estas modificaciones para soportar la heterodimerización se denomina además en el presente documento anticuerpo multiespecífico "con CH3 genomanipulado".
- De acuerdo con el enfoque descrito en el documento EP 1870459, la heterodimerización de dominios CH3 se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones aminoácidas específicas en la interfase de dominio CH3/CH3 entre ambas, la primera y la segunda cadena pesada (en el presente documento se denomina además "anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-)").
- En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO2013/157953 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con D. En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K y el aminoácido L en la posición 351 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con D.
- En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K y el aminoácido L en la posición 351 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con D. Adicionalmente, al menos una de las siguientes sustituciones está comprendida en el dominio CH3 de la otra cadena pesada: el aminoácido Y en la posición 349 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con E, el aminoácido Y en la posición 349 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con D y el aminoácido L en la posición 368 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con E. En un modo de realización, el aminoácido L en la posición 368 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con E.
- En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO2012/058768 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con Y y el aminoácido Y en la posición 407 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con A; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con A y el aminoácido K en la posición 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con F. En otro modo de realización, además de las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de la otra cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 411 (originalmente T), 399 (originalmente D), 400 (originalmente S), 405 (originalmente F), 390 (originalmente N) y 392 (originalmente K) se sustituye. Las sustituciones preferentes son:
- sustitución del aminoácido T en la posición 411 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) con un aminoácido seleccionado de N, R, Q, K, D, E y W;
 - sustitución del aminoácido D en la posición 399 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) con un aminoácido seleccionado de R, W, Y y K;
 - sustitución del aminoácido S en la posición 400 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) con un aminoácido seleccionado de E, D, R y K;
 - sustitución del aminoácido F en la posición 405 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) con un aminoácido seleccionado de I, M, T, S, V y W;
 - sustitución del aminoácido N en la posición 390 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) con un aminoácido seleccionado de R, K y D; y
 - sustitución del aminoácido K en la posición 392 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) con un aminoácido seleccionado de V, M, R, L, F y E.

En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención (genomanipulado de acuerdo con el documento WO2012/058768), en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con Y y el aminoácido Y en la posición 407 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con A; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con V y el aminoácido K en la posición 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con F. En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido Y en la posición 407 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con A; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con A y el aminoácido K en la posición 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con F. En dicho último modo de realización mencionado anteriormente, en el dominio CH3 de dicha otra cadena pesada, el aminoácido K en la posición 392 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con E, el aminoácido T en la posición 411 (numeración de acuerdo con EU el índice de Kabat) se sustituye con E, el aminoácido D en la posición 399 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con R y el aminoácido S en la posición 400 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con R.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2011/143545 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención, las modificaciones de aminoácidos en los dominios CH3 de ambas cadenas pesadas se introducen en las posiciones 368 y/o 409.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2011/090762 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. El documento WO 2011/090762 se refiere a modificaciones de aminoácidos de acuerdo con la tecnología de "botón en ojal". En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con W; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido Y en la posición 407 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con A. En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con Y; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido Y en la posición 407 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con T.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que es de isotipo IgG2, el enfoque descrito en el documento WO 2011/090762 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2009/089004 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K o N en la posición 392 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente con E o D, en un modo de realización preferente con D); y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 399, el aminoácido E o D en la posición 356 o el aminoácido E en la posición 357 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con un aminoácido cargado positivamente (en un modo de realización preferente K o R, en un modo de realización preferente con K, en un modo de realización preferente los aminoácidos en las posiciones 399 o 356 se sustituyen con K). En otro modo de realización, además de las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K o R en la posición 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente con E o D, en un modo de realización preferente con D). Aún en otro modo de realización, además de o de forma alternativa a las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K en la posición 439 y/o el aminoácido K en la posición 370 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye independientemente entre sí con un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente con E o D, en un modo de realización preferente con D).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2007/147901 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K en la posición 253 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con E, el aminoácido D en la posición 282 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K y el aminoácido K en la posición 322 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con D; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 239 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K, el aminoácido E en la posición 240 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K y el aminoácido K en la posición 292

(numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con D.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2007/110205 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico.

Además o de forma alternativa a la genomanipulación de los dominios CH3 por estrategias de heterodimerización identificadas anteriormente, la introducción de un puente disulfuro intercatenario adicional estabiliza los heterodimeros (Atwell, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35; Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681). Esto también se denomina en el presente documento "estabilización con disulfuro de los dominios CH3".

"Fusionado" y "conectado" con respecto a polipéptidos se refiere a componentes que se enlazan por enlaces peptídicos, directamente o bien por medio de uno o más enlazadores peptídicos ("conector peptídico"). El término "enlazador peptídico" o "conector peptídico" como se usa en el presente documento indica de manera intercambiable un péptido de una secuencia de aminoácidos, que es preferentemente de origen sintético. Típicamente, los conectores peptídicos se componen de residuos flexibles como glicina y serina de modo que los dominios proteicos adyacentes se mueven libremente entre sí. Por tanto, los conectores peptídicos típicos usados de acuerdo con la invención son enlazadores de glicina-serina, es decir, conectores peptídicos que consisten en un patrón de residuos de glicina y serina.

Se usa un primer y un segundo conector peptídico para fusionar el primer fragmento Fab con el dominio VH₃ y el segundo fragmento Fab con el dominio VL₃. Sin embargo, la conexión entre el dominio VH₃ y el dominio VL₃ con su respectivo dominio CH3 se realiza directamente, es decir, por conexión directa de dichos dominios, sin incluir enlazadores peptídicos. Por lo tanto, el término "conectado directamente" como se usa en el presente documento con respecto a la fusión/conexión de polipéptidos quiere decir que el sitio de conexión no incluye un enlazador peptídico, es decir, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión incluye únicamente las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos que se fusionaron entre sí y está desprovista de otros residuos aminoácidos de un enlazador peptídico. Esto se realiza para lograr que la estructura tridimensional de

(a) el sitio de fusión de VH₃ y CH3 imite estrechamente tanto el sitio de conexión natural de VH y CH1 como el sitio de conexión natural de CH2 y CH3 del anticuerpo original, del que se deriva el tercer sitio de unión; y

(b) el sitio de fusión de VL₃ y CH3 imite estrechamente tanto el sitio de conexión natural de VH y CH1 como el sitio de conexión natural de CH2 y CH3 del anticuerpo original, del que se deriva el tercer sitio de unión.

El término anticuerpos con un "entrecruzamiento de dominios" como se hace referencia en el presente documento quiere decir anticuerpos, en los que en el brazo de unión de anticuerpo (por ejemplo, dentro de la región Fab) que se desvía de la arquitectura de dominio natural de los anticuerpos, al menos un dominio de la cadena pesada se sustituyó con su correspondiente dominio de la cadena ligera y viceversa. Existen tres tipos generales de entrecruzamientos de dominios, (i) el entrecruzamiento del dominio CH1 y CL, que da lugar a cadenas ligeras de entrecruzamiento de una estructura VL-CH1 y cadenas pesadas de entrecruzamiento que incluyen una estructura VH-CL, (ii) el entrecruzamiento del dominio VH y VL, que da lugar a cadenas ligeras de entrecruzamiento de una estructura VH-CL y cadenas pesadas de entrecruzamiento que incluyen una estructura VL-CH1, y (iii) el entrecruzamiento de <VL-CL> y <VH-CH1> ("entrecruzamiento de Fab"), que da lugar a cadenas ligeras de entrecruzamiento de una estructura VH-CH1 y cadenas pesadas de entrecruzamiento que incluyen una estructura VL-CL (las estructuras de dominio se indican en sentido N terminal a C terminal). Dentro de los términos de la presente invención, "reemplazados entre sí" con respecto a las cadenas pesadas y ligeras correspondientes se refiere a las estrategias de entrecruzamiento de dominios mencionadas anteriormente. Como tal, cuando los dominios CH1 y CL se "reemplazan entre sí" se hace referencia al entrecruzamiento de dominios mencionado en el punto (i) y la arquitectura de dominio de cadena pesada y ligera resultante. En consecuencia, cuando VH1 y VL se "reemplazan entre sí", se hace referencia al entrecruzamiento de dominios mencionado en el punto (ii); y cuando los dominios CH1 y CL se "reemplazan entre sí" y los dominios VH1 y VL se "reemplazan entre sí", se hace referencia al entrecruzamiento de dominios mencionado en el punto (iii). Los anticuerpos biespecíficos que incluyen entrecruzamientos de dominios se divulgan, por ejemplo, en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254 y Schaefer, W. *et al*, PNAS, 108 (2011) 11187-1191. Cuando los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen un entrecruzamiento de dominios, el entrecruzamiento de dominios es "asimétrico", lo que indica que (a) solo uno del primer y el segundo fragmento Fab incluye un entrecruzamiento de dominios, o bien (b) el primer y el segundo fragmento Fab incluyen diferentes entrecruzamientos de dominios indicados en los puntos (i) a (iii) anteriores, pero no ambos del primer y el segundo fragmento Fab incluyen el mismo entrecruzamiento de dominios.

El término "estructura terciaria" de un anticuerpo como se usa en el presente documento se refiere a la forma geométrica del anticuerpo de acuerdo con la invención. La estructura terciaria comprende una cadena principal de cadena polipeptídica que comprende los dominios de anticuerpos, mientras que las cadenas laterales de aminoácidos interactúan y se unen de varias formas.

El término "aminoácido" como se usa en el presente documento indica una molécula orgánica que posee un resto amino situado en la posición α con respecto a un grupo carboxílico. Los ejemplos de aminoácidos incluyen: arginina, glicina,

ornitina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, isoleucina, leucina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, prolina. El aminoácido empleado es opcionalmente en cada caso la forma L. El término aminoácido "cargado positivamente" o "cargado negativamente" se refiere a la carga de cadena lateral de aminoácidos a pH 7,4. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

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

Tabla - Aminoácidos con propiedades específicas

Aminoácido	3 letras	1 letra	Polaridad de cadena lateral	Carga de cadena lateral (pH 7,4)
Alanina	Ala	A	apolar	neutra
Arginina	Arg	R	polar básica	positiva
Asparagina	Asn	N	polar	neutra
Ácido aspártico	Asp	D	polar ácida	negativa
Cisteína	Cys	C	apolar	neutra
Ácido glutámico	Glu	E	polar ácida	negativa
Glutamina	Gln	Q	polar	neutra
Glicina	Gly	G	apolar	neutra
Histidina	His	H	polar básica	positiva (10 %) neutra (90 %)
Isoleucina	Ile	I	apolar	neutra
Leucina	Leu	L	apolar	neutra
Lisina	Lys	K	polar básica	positiva
Metionina	Met	M	apolar	neutra
Fenilalanina	Phe	F	apolar	neutra
Prolina	Pro	P	apolar	neutra
Serina	Ser	S	polar	neutra
Treonina	Thr	T	polar	neutra
Triptófano	Trp	W	apolar	neutra
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutra
Valina	Val	V	apolar	neutro

Como se usa en el presente documento, las posiciones aminoacídicas de todas las regiones y dominios constantes de la cadena pesada y ligera se enumeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descrito en Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En particular, para dominios variables y para el dominio constante de la cadena ligera CL de isotipo kappa y lambda, se usa el sistema de numeración de Kabat (véanse las páginas 647-660) de Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y se denomina en el presente documento "numeración de acuerdo con Kabat"; para los dominios constantes de la cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y CH3) se usa el sistema de numeración de índice EU de Kabat (véanse las páginas 661-723) y se denomina en el presente documento "numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat".

Las sustituciones (o mutaciones) aminoacídicas dentro de las cadenas polipeptídicas del anticuerpo multiespecífico se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de anticuerpo, o por síntesis de nucleótidos. Dichas modificaciones se pueden realizar, sin embargo, solo en un intervalo muy limitado. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de anticuerpos mencionadas anteriormente tales como el isotipo IgG y la unión a antígeno, pero pueden mejorar además el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de proteínas o facilitar la purificación. En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones

aminoacídicas conservadoras.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen por medios recombinantes. Los procedimientos para la producción recombinante de anticuerpos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células huésped procariotas y eucariotas con el posterior aislamiento del anticuerpo y normalmente la purificación a una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos como se menciona anteriormente en una célula huésped, se insertan ácidos nucleicos que codifican las respectivas cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo en vectores de expresión por procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas apropiadas, como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras, o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de lisis). Los procedimientos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos producidos por células huésped pueden experimentar escisión postraduccional de uno o más, en particular uno o dos, aminoácidos del extremo C de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped por expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica una cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa, o puede incluir una variante escindida de la cadena pesada de longitud completa (también denominada en el presente documento una cadena pesada variante escindida). Este puede ser el caso cuando los dos aminoácidos C terminales finales de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Las composiciones de la invención, tales como las composiciones farmacéuticas o de diagnóstico descritas en el presente documento, comprenden una población de anticuerpos de la invención. La población de anticuerpos puede comprender anticuerpos que tienen una cadena pesada de longitud completa y anticuerpos que tienen una cadena pesada variante escindida.

El término "purificado", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos, que se retiran de su entorno natural o de una fuente de producción recombinante, o se aíslan o se separan de otro modo, y están al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 80 %, libres de otros componentes, por ejemplo, membranas y microsomas, con los que se asocian naturalmente. La purificación de anticuerpos (recuperando los anticuerpos del cultivo de células huésped) se realiza para eliminar componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otros bien conocidos en la técnica. Véase Ausubel, F., *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987). Los diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, con medios de afinidad para la purificación de dominios constantes de la cadena ligera de isotipo kappa o lambda, por ejemplo KappaSelect o LambdaSelect), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio de modo mixto), adsorción tiófila (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-sefariosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo, con material de afinidad de Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102).

"Polinucleótido" o "ácido nucleico" como se usa de manera intercambiable en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por la ADN o ARN polimerasa, o por una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Una secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender una modificación/modificaciones realizada(s) después de la síntesis, tales como conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), las que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, alfa ácidos nucleicos anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del/de los polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los glúcidos se puede reemplazar, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, proteger por grupos protectores estándar o activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o se puede conjugar con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos del grupo de caperuza orgánico de desde 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivatizar a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los glúcidos ribosa o desoxirribosa que en general son conocidos en la técnica,

incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-ácido-ribosa, análogos de glúcidos carbocíclicos, glúcidos α -anoméricos, glúcidos epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, glúcidos de piranosa, glúcidos de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos básicos, tales como metil-ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster se pueden reemplazar por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, modos de realización en los que fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

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

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones como se describe.

Un "vector de expresión" es un vector que puede dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que se enlaza de forma funcional. Cuando el vector de expresión se introduce en una célula huésped apropiada, se puede transcribir y traducir en un polipéptido. Cuando se transforman células huésped en procedimientos de acuerdo con la invención, se usan "vectores de expresión"; de este modo, el término "vector" en relación con la transformación de células huésped como se describe en el presente documento quiere decir "vector de expresión". Un "sistema de expresión" se refiere normalmente a una célula huésped adecuada compuesta de un vector de expresión que puede funcionar para proporcionar un producto de expresión deseado.

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el que un ácido nucleico se transcribe en ARNm y/o al proceso por el que el ARNm transcrito (también denominado un transcrito) se traduce posteriormente en un péptido, polipéptido o proteína. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan individual o conjuntamente productos génicos. Si un ácido nucleico se deriva de ADN genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el empalme del ARNm correspondiente.

El término "transformación" como se usa en el presente documento se refiere al proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una célula huésped. Si se usan células sin barreras de pared celular extraordinarias como células huésped, la transfección se lleva a cabo, por ejemplo, por el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio como se describe por Graham y Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff. Sin embargo, también se pueden usar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como por inyección nuclear o por fusión de protoplastos. Si se usan células procariotas o células que contienen construcciones de pared celular sustanciales, por ejemplo, un procedimiento de transfección es el tratamiento con calcio usando cloruro de calcio como se describe por Cohen, F.N., *et al.*, *PNAS* 69 (1972) 7110 y siguientes.

El término "célula huésped" como se usa en la presente solicitud indica cualquier tipo de sistema celular que se pueda genomanipular para generar los anticuerpos de acuerdo con la presente invención.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y dichas designaciones incluyen la progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica a la cribada en la célula transformada originalmente. Cuando se pretenden designaciones distintas, quedará claro en el contexto.

La expresión transitoria se describe, por ejemplo, por Durocher, Y., *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK 293) se describe por Schlaeger, E.J., y Christensen, K., en

Cytotechnology 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.J., en J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la composición. Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un anticuerpo de acuerdo con la invención por determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el anticuerpo con, o coadministrar el anticuerpo con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones tampón acuosas.

Una composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de los anticuerpos de acuerdo con la invención. Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, un anticuerpo, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. En particular, la "cantidad eficaz" indica una cantidad de un anticuerpo de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, (i) trata o previene la enfermedad, afección o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular, o (iii) previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular descrito en el presente documento. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo de las moléculas de anticuerpo usadas, estado de enfermedad que se está tratando, la gravedad o la enfermedad tratada, la edad y salud relativa del sujeto, la vía y forma de administración, el juicio del médico especialista o veterinario, y otros factores.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. En un modo de realización preferente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto por procedimientos de esterilización, *supra*, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede provocar por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, quieren decir modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden variar los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y anamnesis anterior del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición sea administrable por jeringuilla. Además de agua, en un modo de realización, el vehículo es una solución salina tamponada isotónica.

La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, glúcidos, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, 5 disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

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

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

El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, 20 isótopos radioactivos (por ejemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, 25 fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación.

2. Descripción detallada de los modos de realización de la invención

30 I. Anticuerpo multiespecífico

La invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos tres sitios de unión a antígeno, en el que dos sitios de unión a antígeno se forman por un primer fragmento Fab y un segundo fragmento Fab, en el que

35 a) un tercer sitio de unión a antígeno se forma por un dominio variable de la cadena pesada (VH₃) y un dominio variable de la cadena ligera (VL₃), en el que

- el extremo N del dominio VH₃ se conecta al extremo C del dominio constante de la cadena pesada (CH1) o del dominio constante de la cadena ligera (CL) del primer fragmento Fab por medio de un primer conector peptídico, y

40 - el extremo N del dominio VL₃ se conecta al extremo C del dominio constante de la cadena pesada (CH1) o del dominio constante de la cadena ligera (CL) del segundo fragmento Fab por medio de un segundo conector peptídico,

45 b) el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por

50 i) generación de una protuberancia en uno de los dominios de CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, y generación de una cavidad en el otro de los dominios de CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los dominios CH3 es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3 (que corresponde a soportar la heterodimerización por la tecnología de botones en ojales); o

55 sustitución de al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente; y sustitución de al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente (que corresponde a soportar la heterodimerización introduciendo aminoácidos de cargas opuestas dentro de los dominios CH3 correspondientes);

60 ii) introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3, o

iii) ambas modificaciones de i) y ii);

65 c) el extremo C del dominio VH₃ del tercer sitio de unión a antígeno se conecta a uno de los dominios CH3 mencionados en b), y el extremo C del dominio VL₃ del tercer sitio de unión a antígeno se conecta al otro de los dominios CH3 mencionados en b), y

d) el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de los dominios constantes de la cadena pesada 2 (CH2).

Un esquema de la estructura general de dicho anticuerpo multiespecífico se representa en la fig. 1. Los dos brazos de unión del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención formados por el primer y segundo fragmento Fab se pueden unir al mismo o diferentes antígenos. A diferencia de una molécula de IgG natural, dentro del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, los dominios CH2 se reemplazaron por un tercer sitio de unión, que en el presente documento se denomina VH₃/VL₃. Como el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de dominios CH2, se anula la función efectora mediada por Fc, que se desea para varias aplicaciones terapéuticas. Los anticuerpos multiespecíficos son en particular adecuados para unir diferentes epítomos en el mismo antígeno diana (por ejemplo, diferentes epítomos en la misma biomolécula) o diferentes biomoléculas en la misma célula.

Heterodimerización

En un modo de realización del anticuerpo multiespecífico, los dominios CH3 se alteran de acuerdo con la tecnología de botones en ojales. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización también se denomina en el presente documento "anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH)" (en el que la abreviatura "KiH" representa la "tecnología de botón en ojal"). Por lo tanto, de acuerdo con el presente modo de realización dentro de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH), los dominios CH3 se alteran para promover la heterodimerización por generación de una protuberancia en uno de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original; y generación de una cavidad en el otro de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los dominios CH3 es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3.

En otras palabras, el presente modo de realización se refiere a un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención que comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, en el que en la estructura terciaria del anticuerpo el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada forman una interfase que se encuentra entre los respectivos dominios CH3 del anticuerpo, en el que las respectivas secuencias de aminoácidos del dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada comprenden cada una un conjunto de aminoácidos que se encuentra dentro de dicha interfase en la estructura terciaria del anticuerpo,

- en el que del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada, al menos un residuo aminoacídico se sustituye con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase, en el que la protuberancia se encuentra en el dominio CH3 de una cadena pesada, y en el que la protuberancia es posicionable en una cavidad situada en el dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro de la interfase; y

- en el que del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada al menos un residuo aminoacídico se sustituye con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase, en el que la cavidad se encuentra en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, y en el que en la cavidad la protuberancia dentro de la interfase situada en el dominio CH3 de la cadena pesada es posicionable.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original se selecciona de R, F, Y y W.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original se selecciona de A, S, T y V.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original se selecciona de R, F, Y y W; y dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original se selecciona de A, S, T y V.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención, el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende una mutación T366W y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención, el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende las

mutaciones T366W y G407Y, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

5 En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KiH) de acuerdo con la invención, el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende las mutaciones T366W, R409D y K370E, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V, D399R y E357R (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

10 De forma alternativa a o en combinación con las modificaciones de acuerdo con la tecnología de botones en ojales como se define anteriormente, los dominios CH3 del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se alteran para promover la heterodimerización basada en otros enfoques de heterodimerización conocidos en la técnica, preferentemente los descritos en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 15 2013/157954 y WO 2013/096291.

En otro modo de realización del anticuerpo multiespecífico, de forma alternativa a o en combinación con las modificaciones de acuerdo con la tecnología de botones en ojales, los dominios CH3 se alteran por la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones aminoácidas específicas en la interfase de dominio CH3/CH3 (por ejemplo, como se describe en el documento EP 1870459). El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización también se denomina en el presente documento "anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-)" (en el que la abreviatura "+/-" representa los aminoácidos con carga opuesta que se introdujeron en los respectivos dominios CH3). Por lo tanto, de acuerdo con el presente modo de realización dentro de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-), los dominios CH3 se alteran para promover la heterodimerización sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente; y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente.

En otras palabras, el presente modo de realización se refiere a un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención que comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, en el que en la estructura terciaria del anticuerpo el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada forman una interfase que se encuentra entre los respectivos dominios CH3 del anticuerpo, en el que las respectivas secuencias de aminoácidos del dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada comprenden cada una un conjunto de aminoácidos que se encuentra dentro de dicha interfase en la estructura terciaria del anticuerpo, en el que del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada, un primer aminoácido se sustituye con un aminoácido cargado positivamente y del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, un segundo aminoácido se sustituye con un aminoácido cargado negativamente.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención, el aminoácido cargado positivamente se selecciona de K, R y H; y el aminoácido cargado negativamente se selecciona de E o D.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención, el aminoácido cargado positivamente se selecciona de K y R; y el aminoácido cargado negativamente se selecciona de E o D.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención, el aminoácido cargado positivamente es K; y el aminoácido cargado negativamente es E.

50 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido R en la posición 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con D y el aminoácido K en la posición 370 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con E; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 399 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K y el aminoácido E en la posición 357 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K.

En otro modo de realización del anticuerpo multiespecífico, los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización también se denomina en el presente documento "anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (S-S)" (en el que la abreviatura "S-S" representa la estabilización con disulfuro). Por lo tanto, de acuerdo con el presente modo de realización dentro de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (S-S), los dominios CH3 se alteran para promover la heterodimerización por introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3.

65 En otras palabras, el presente modo de realización se refiere a un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (S-S) de acuerdo con la invención que comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, en el que en la estructura terciaria del anticuerpo el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda

cadena pesada forman una interfase que se encuentra entre los respectivos dominios CH3 del anticuerpo, en el que las respectivas secuencias de aminoácidos del dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada comprenden cada una un conjunto de aminoácidos que se encuentra dentro de dicha interfase en la estructura terciaria del anticuerpo, del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada, un primer aminoácido se sustituye con cisteína; y del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, un segundo aminoácido se sustituye con cisteína, en el que el segundo aminoácido se orienta hacia el primer aminoácido dentro de la interfase; de modo que se puede formar un puente disulfuro entre el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada por medio de los residuos de cisteína introducidos.

En un modo de realización del anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (S-S), los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización del anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (S-S), los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación S354C en uno de los dominios CH3 y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Aún en otro modo de realización preferente del anticuerpo multiespecífico, los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro y se alteran de acuerdo con la tecnología de botones en ojales. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización también se denomina en el presente documento "anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS)" (en el que la abreviatura "K" representa la tecnología de botones en ojales y "SS" representa la estabilización con disulfuro). Por lo tanto, de acuerdo con el presente modo de realización, dentro de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS), los dominios CH3 se alteran para promover la heterodimerización por generación de una protuberancia en uno de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original; y generación de una cavidad en el otro de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los CH3 dominios es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3; y una introducción adicional de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3.

En otras palabras, el presente modo de realización se refiere a un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención que comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, en el que en la estructura terciaria del anticuerpo el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada forman una interfase que se encuentra entre los respectivos dominios CH3 del anticuerpo, en el que las respectivas secuencias de aminoácidos del dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada comprenden cada una un conjunto de aminoácidos que se encuentra dentro de dicha interfase en la estructura terciaria del anticuerpo,

- en el que del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada, al menos un residuo aminoacídico se sustituye con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase, en el que la protuberancia se encuentra en el dominio CH3 de una cadena pesada, y en el que la protuberancia es posicionable en una cavidad situada en el dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro de la interfase; y

- en el que del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada al menos un residuo aminoacídico se sustituye con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase, en el que la cavidad se encuentra en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, y en el que en la cavidad la protuberancia dentro de la interfase situada en el dominio CH3 de la cadena pesada es posicionable; y en el que

- del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada, un primer aminoácido se sustituye con cisteína; y del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, un segundo aminoácido se sustituye con cisteína, en el que el segundo aminoácido se orienta hacia el primer aminoácido dentro de la interfase; de modo que se puede formar un puente disulfuro entre el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada por medio de los residuos de cisteína introducidos.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención, la mutación E356C o S354C se introduce en el dominio CH3 de la cadena con "botón" y las mutaciones Y349C se introducen en el dominio CH3 de la cadena con "ojal".

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original se selecciona de R, F, Y y W.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico

original se selecciona de A, S, T y V.

5 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original se selecciona de R, F, Y y W; y dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original se selecciona de A, S, T y V.

10 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención, dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original se selecciona de R, F, Y y W; y dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original se selecciona de A, S, T y V, y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

15 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención, el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende una mutación T366W y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat), y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

25 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención, el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende las mutaciones T366W y G407Y, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat), y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

30 En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención, el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende las mutaciones T366W, R409D y R370E, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V, D399R y E357R (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat), los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

40 Aún en otro modo de realización preferente del anticuerpo multiespecífico, los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro y se alteran por la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones aminoacídicas específicas en la interfase de dominio CH3/CH3. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización también se denomina en el presente documento "anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-/SS)" (en el que la abreviatura "+/-" representa los aminoácidos con carga opuesta y "SS" representa la estabilización con disulfuro). Por lo tanto, de acuerdo con el presente modo de realización, dentro de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-/SS) los dominios CH3 se alteran para promover la heterodimerización sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente; y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente; y una introducción adicional de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3.

50 En otras palabras, el presente modo de realización se refiere a un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-/SS) de acuerdo con la invención que comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, en el que en la estructura terciaria del anticuerpo el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada forman una interfase que se encuentra entre los respectivos dominios CH3 del anticuerpo, en el que las secuencias de aminoácidos respectivas del dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada comprenden cada una un conjunto de aminoácidos que se encuentra dentro de dicha interfase en la estructura terciaria del anticuerpo,

60 - en el que del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada, un primer aminoácido se sustituye con un aminoácido cargado positivamente; y

- en el que del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, un segundo aminoácido se sustituye con un aminoácido cargado negativamente; y en el que

65 - del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de una cadena pesada, un primer aminoácido se sustituye con cisteína; y del conjunto de aminoácidos que se encuentra en la interfase en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, un segundo aminoácido se sustituye con cisteína, en el que el segundo aminoácido se orienta

hacia el primer aminoácido dentro de la interfase; de modo que se puede formar un puente disulfuro entre el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada por medio de los residuos de cisteína introducidos.

5 En un modo de realización de la invención, el tercer sitio de unión del anticuerpo multiespecífico se estabiliza con disulfuro. Por lo tanto, los dominios VH₃ y VL₃ se alteran por introducción de al menos un residuo de cisteína en el dominio VH₃ y un residuo de cisteína en el dominio VL₃ de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃. En un modo de realización de la invención, el tercer sitio de unión del anticuerpo multiespecífico se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con Kabat):

- 10 - VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;
- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o
- 15 - VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

En un modo de realización preferente, el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100.

20 En un modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión del anticuerpo multiespecífico se estabiliza con disulfuro y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro. Sin quedar vinculado a esta teoría, los al menos dos enlaces disulfuro formados por esta modificación en diferentes dominios del dominio Fc alterado del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención reemplazan las interacciones disulfuro de bisagra de la IgG natural y, de este modo soportan la heterodimerización mientras que permiten el acceso del antígeno al tercer sitio de unión. En un modo de realización, el

25 tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (S-S) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con a Kabat):

- 30 - VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;
- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o
- VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

35 En un modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (S-S) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44 y en el dominio VL₃ en la posición 100.

40 En otro modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (S-S) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44 y en el dominio VL₃ en la posición 100; y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

45 En otro modo de realización preferente de la invención, la heterodimerización se soporta por modificaciones de botones en ojales dentro de los dominios CH3 y, además, el tercer sitio de unión del anticuerpo multiespecífico y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro, respectivamente. En un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización, la heterodimerización de las cadenas pesadas modificadas con botones en ojales se soporta además por un

50 enlace disulfuro intercatenario artificial, que, en contraste con los enfoques de botones en ojales conocidos, no se encuentra dentro del CH3 dominio, sino en un dominio diferente (es decir, entre los dominios VH₃ y VL₃). Dentro del anticuerpo de acuerdo con el presente modo de realización, la heterodimerización del tercer módulo de unión (que comprende los polipéptidos VH₃-CH3 y VL₃-CH3) se promueve por cuatro interacciones distintas: (i) la interacción natural entre VH₃ y VL₃, (ii) la estabilización con disulfuro en la interfase VH₃/VL₃, (iii) la estabilización con disulfuro en la interfase CH3/CH3; y (iv) las modificaciones de botones en ojales en la interfase CH3/CH3. Por esto, se promueve la formación de

55 heterodímeros en lugar de la formación de homodímeros y se mejora la estabilidad del anticuerpo.

En un modo de realización, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con a Kabat):

- 60 - VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;
- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o
- 65 - VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

En un modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44 y en el dominio VL₃ en la posición 100.

5 En otro modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100; y el residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original se selecciona de R, F, Y y W; y el residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original se selecciona de A, S, T y V, y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

15 En otro modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100; y el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende una mutación T366W, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat), y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

25 En otro modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100; y el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende las mutaciones T366W y G407Y, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat), y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

35 En otro modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100; y el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende las mutaciones T366W, R409D y K370E, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V, D399K y E357K (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat), los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

40 En otro modo de realización preferente de la invención, la heterodimerización se soporta por la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones aminoacídicas específicas en la interfase de dominio CH3/CH3 y, además, el tercer sitio de unión del anticuerpo multiespecífico y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro, respectivamente. En un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización, la heterodimerización de las cadenas pesadas modificadas se soporta además por un enlace disulfuro intercatenario artificial, que no se encuentra dentro del dominio CH3, sino en un dominio diferente (es decir, entre los dominios VH₃ y VL₃). En un modo de realización, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-/SS) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con a Kabat):

- 50 - VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;
- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o
- 55 - VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

En un modo de realización preferente de la invención, el tercer sitio de unión de un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-/SS) de acuerdo con la invención se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44 y en el dominio VL₃ en la posición 100.

60 Conector peptídico

Dentro de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el extremo N terminal de los dominios VH₃ y VL₃ del tercer sitio de unión se fusionan a los fragmentos Fab respectivos por medio de un primer y segundo conector peptídico, respectivamente. En un modo de realización de la invención, no se forma un enlace disulfuro intercatenario entre el primer y el segundo conector peptídico. En un modo de realización de la invención, el primer y segundo conectores peptídicos

son idénticos entre sí.

5 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de una región bisagra. En otro modo de realización alternativo de la invención, el anticuerpo multiespecífico comprende una región bisagra natural, que no forma disulfuros intercatenarios. Un ejemplo es el péptido de región bisagra derivado de un anticuerpo de isotipo IgG4.

10 En un modo de realización preferente de la invención, el primer y segundo conector peptídico son péptidos de al menos 15 aminoácidos. En otro modo de realización de la invención, el primer y segundo conector peptídico son péptidos de 15 - 70 aminoácidos. En otro modo de realización de la invención, el primer y segundo conector peptídico son péptidos de 20-50 aminoácidos. En otro modo de realización de la invención, el primer y segundo conector peptídico son péptidos de 10-50 aminoácidos. Dependiendo, por ejemplo, del tipo de antígeno que se va a unir por el tercer sitio de unión, también pueden ser aplicables conectores peptídicos más cortos (o incluso más largos) en anticuerpos de acuerdo con la invención.

15 Aún en otro modo de realización de la invención, el primer y segundo conector peptídico son aproximadamente de la longitud de la región bisagra natural (que es para moléculas de anticuerpo natural de isotipo IgG1 de aproximadamente 15 aminoácidos, y para isotipo IgG3 de aproximadamente 62 aminoácidos). Por lo tanto, en un modo de realización, en el que el anticuerpo multiespecífico es de isotipo IgG1, los conectores peptídicos son péptidos de 10-20 aminoácidos, en un modo de realización preferente de 12-17 aminoácidos. En otro modo de realización, en el que el anticuerpo multiespecífico es de isotipo IgG3, los conectores peptídicos son péptidos de 55 - 70 aminoácidos, en un modo de realización preferente de 60 - 65 aminoácidos.

25 En un modo de realización de la invención, los primer y segundo conectores peptídicos son enlazadores de glicina-serina. En un modo de realización de la invención, los primer y segundo conectores peptídicos son péptidos que consisten en residuos de glicina y serina. En un modo de realización de la invención, los enlazadores de glicina-serina son de la estructura

$(GxS)_n$ o $(GxS)_nG_m$

30 con G = glicina, S = serina, x = 3 o 4, n = 2, 3, 4, 5 o 6, y m = 0, 1, 2 o 3.

35 En un modo de realización, de los enlazadores de glicina-serina definidos anteriormente, x = 3, n = 3, 4, 5 o 6, y m = 0, 1, 2 o 3; o x = 4, n = 2, 3, 4 o 5 y m = 0, 1, 2 o 3. En un modo de realización preferente, x = 4 y n = 2 o 3, y m = 0. Aún en otro modo de realización preferente, x = 4 y n = 2. En un modo de realización, dicho conector peptídico es $(G_4S)_2$.

40 En un modo de realización preferente de la invención, los primer y segundo conectores peptídicos son péptidos $(G_4S)_2$, y el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) como se define anteriormente, en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100; y en el que en el anticuerpo multiespecífico el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende las mutaciones T366W y G407Y, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat), y los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 (en un modo de realización, una mutación S354C) y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

45 En otro modo de realización preferente de la invención, los primer y segundo conectores peptídicos son péptidos $(G_4S)_2$, y el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (KSS) como se define anteriormente, en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100; y en el que en el anticuerpo multiespecífico el dominio CH3 de una cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "botón") comprende las mutaciones T366W, G407Y y S354C, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Sitio de fusión de los dominios VH₃ y VL₃ con respectivos dominios CH3

55 Dentro de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el respectivo extremo C de los dominios VH₃ y VL₃ del tercer sitio de unión se fusiona con los dominios CH3. La obtención de un pliegue proteico similar a una región Fc de IgG natural se puede lograr mejor, cuando los dominios variables VH₃ y VL₃ se conectan directamente a los respectivos dominios CH3 sin la ayuda de un conector peptídico. Además, incluso en el caso de que el tercer sitio de unión y la interfase CH3/CH3 se estabilicen ambos con disulfuro, la conexión directa de los dominios variables con el respectivo dominio CH3 previene ventajosamente el emparejamiento incorrecto de los residuos de cisteína, que se encuentran en estrecha proximidad, cuando se forman los enlaces disulfuro intercatenarios deseados.

60 Por lo tanto, en un modo de realización de la invención, el extremo C del dominio VH₃ se conecta directamente a uno de los dominios CH3, y el extremo C del dominio VL₃ se conecta directamente al otro de los dominios CH3. En un modo de realización preferente de la invención, el extremo C del dominio VH₃ se conecta directamente a uno de los dominios CH3,

y el extremo C del dominio VL₃ se conecta directamente al otro de los dominios CH₃, en los que los sitios de conexión están desprovistos de un péptido enlazador adicional.

5 Para proporcionar un sitio de fusión que imite de forma estrechamente estructural los sitios de transición naturales entre dominios variables y constantes de moléculas de anticuerpo natural, el extremo C de los dominios variables (VH₃ y VL₃, respectivamente) y/o el extremo N de los dominios CH₃ (que se conectan directamente a los respectivos dominios variables) pueden incluir mutaciones sustituyendo residuos aminoacídicos distintos.

10 Por lo tanto, en un modo de realización de la invención, el extremo N del dominio CH₃ se modifica sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original. En un modo de realización de la invención, el extremo C del dominio VH₃ se modifica sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original. En un modo de realización de la invención, el extremo C del dominio VL₃ se modifica sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original.

15 En un modo de realización preferente, el extremo N de cada uno de los dominios CH₃ incluye al menos una mutación aminoacídica, el extremo C del dominio VH₃ incluye al menos una mutación aminoacídica y el extremo C del dominio VL₃ incluye al menos una mutación aminoacídica.

20 En un modo de realización del mismo, las mutaciones aminoacídicas para mejorar la estructura terciaria del sitio de fusión para imitar los sitios de transición naturales entre dominios variables y constantes de moléculas de anticuerpo natural se realizan sustituyendo al menos un residuo aminoacídico situado en las posiciones 341 a 350 de los dominios CH₃ (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, se sustituye al menos un residuo aminoacídico situado en las posiciones 341 a 345 de los dominios CH₃ (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización de la invención, el extremo N del dominio CH₃ consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2. En un modo de realización de la invención, el extremo N del dominio CH₃ consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

30 En otro modo de realización, las mutaciones aminoacídicas para mejorar la estructura terciaria del sitio de fusión para imitar los sitios de transición naturales entre dominios variables y constantes de moléculas de anticuerpos naturales se realizan sustituyendo al menos un residuo aminoacídico de los diez residuos aminoacídicos C terminales del dominio VH₃, el dominio VL₃ o ambos, el dominio VH₃ y el dominio VL₃.

35 En un modo de realización preferente, el extremo N de cada uno de los dominios CH₃ incluye al menos una mutación aminoacídica situada en las posiciones 341 a 350 de los dominios CH₃ (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), y los diez residuos aminoacídicos C terminales del dominio VH₃ incluyen al menos una mutación aminoacídica, y los diez residuos aminoacídicos C terminales del dominio VL₃ incluyen al menos una mutación aminoacídica.

40 En otro modo de realización preferente, el extremo N de cada uno de los dominios CH₃ incluye al menos una mutación aminoacídica situada en las posiciones 341 a 345 de los dominios CH₃ (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), y los cinco residuos aminoacídicos C terminales del dominio VH₃ incluyen al menos una mutación aminoacídica, y los cinco residuos aminoacídicos C terminales del dominio VL₃ incluyen al menos una mutación aminoacídica.

Primer y segundo fragmentos Fab

45 El primer y segundo sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención son fragmentos Fab, por tanto, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención tiene una forma similar a IgG y presenta un peso molecular comparable al de una molécula de IgG natural. Similar a una molécula de IgG natural, dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende dos brazos de unión basados en fragmentos Fab. Los brazos de unión pueden ser de una estructura Fab natural o comprender otras modificaciones como es conocido en la técnica (por ejemplo, los fragmentos Fab pueden ser Fab monocatenarios, Fab estabilizados con disulfuro, Fab monocatenarios estabilizados con disulfuro o Fab con entrecruzamiento de dominios). Para garantizar la unión a antígeno del tercer sitio de unión, la región bisagra de un anticuerpo natural, que incluye naturalmente enlaces disulfuro estabilizadores, se reemplaza por conectores peptídicos desprovistos de enlaces disulfuro intercatenarios. Debido a la falta de estabilización que surge de la retirada de la interacción de disulfuros de bisagra natural, la región similar a Fc alterada del anticuerpo multiespecífico se estabiliza soportando la heterodimerización CH₃/CH₃ por modificaciones de botones en ojales o introducción de aminoácidos con carga opuesta y/o disulfuros intercatenarios adicionales. Además, se soporta de este modo el ensamblaje correcto de la molécula de anticuerpo deseada (por ejemplo, se evita el emparejamiento incorrecto como la formación de homodímeros de la cadena pesada).

60 En un modo de realización, el dominio constante de la cadena ligera del primer y/o el segundo fragmento Fab es de isotipo kappa. En un modo de realización, el dominio constante de la cadena ligera del primer y/o segundo fragmento Fab es de isotipo lambda. En un modo de realización, el dominio constante de la cadena ligera del primer fragmento Fab es de isotipo kappa y el dominio constante de la cadena ligera del segundo fragmento Fab es de isotipo lambda.

65 En un modo de realización de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se estabilizan con disulfuro. En un modo de realización, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se estabilizan con disulfuro por introducción de residuos

de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los correspondientes dominios VH y VL (numeración de acuerdo con Kabat):

- 5
- VH en la posición 44 y VL en la posición 100;
 - VH en la posición 105 y VL en la posición 43; o
 - VH en la posición 101 y VL en la posición 100.

10 En un modo de realización preferente de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se estabilizan con disulfuro, respectivamente, por introducción de residuos de cisteína en su dominio VH en la posición 44, y en su dominio VL en la posición 100.

15 En otro modo de realización de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se estabilizan con disulfuro. En un modo de realización, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se estabilizan con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los correspondientes dominios VH y VL (numeración de acuerdo con Kabat):

- 20
- VH en la posición 44 y VL en la posición 100;
 - VH en la posición 105 y VL en la posición 43; o
 - VH en la posición 101 y VL en la posición 100, y

25 y el enlace disulfuro natural entre las cadenas polipeptídicas del respectivo fragmento Fab se anula sustituyendo al menos uno de los residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro intercatenarios con otro residuo aminoacídico.

30 Aún en otro modo de realización de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se estabilizan con disulfuro, respectivamente, por introducción de residuos de cisteína en su dominio VH en la posición 44, y en su dominio VL en la posición 100; y el enlace disulfuro natural entre las cadenas polipeptídicas del respectivo fragmento Fab se anula sustituyendo al menos uno de los residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro intercatenarios con otro residuo aminoacídico. De acuerdo con el presente modo de realización, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se estabilizan solo por el

35 enlace disulfuro artificial entre VH en la posición 44 y VL en la posición 100.

40 En un modo de realización de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios (scFab), es decir, los dominios del fragmento Fab se disponen en una única cadena polipeptídica. El presente modo de realización es en particular útil, cuando el primer y segundo fragmento Fab se unen a diferentes epítomos (y, por lo tanto, el anticuerpo multiespecífico es al menos trispecífico). Por esto, la formación de producto secundario y el emparejamiento incorrecto de la cadena ligera (es decir, emparejamiento de una cadena ligera con la cadena pesada errónea formando de este modo sitios de unión no funcionales) durante la expresión recombinante se puede reducir y el rendimiento de la expresión se puede mejorar. En un modo de realización preferente, exactamente uno de los fragmentos Fab (es decir, el primer fragmento Fab o bien el

45 segundo fragmento Fab) es un fragmento Fab monocatenario (mientras que el otro fragmento Fab no es un fragmento Fab monocatenario sino que está formado por dos cadenas polipeptídicas).

50 Por lo tanto, en un modo de realización preferente de un anticuerpo multiespecífico que incluye al menos un fragmento Fab monocatenario, el anticuerpo multiespecífico es al menos trispecífico. En otro modo de realización preferente de un anticuerpo multiespecífico que incluye al menos un fragmento Fab monocatenario, el anticuerpo multiespecífico es trispecífico. Aún en otro modo de realización preferente de un anticuerpo multiespecífico que incluye al menos un fragmento Fab monocatenario, el anticuerpo multiespecífico es trivalente y trispecífico.

55 En un modo de realización de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios estabilizados con disulfuro (dsFab). En un modo de realización, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios, que se estabilizan con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los correspondientes dominios VH y VL (numeración de acuerdo con Kabat):

- 60
- VH en la posición 44 y VL en la posición 100;
 - VH en la posición 105 y VL en la posición 43; o
- 65 - VH en la posición 101 y VL en la posición 100.

5 En un modo de realización preferente de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios, que se estabilizan con disulfuro, respectivamente, por introducción de residuos de cisteína en su dominio VH en la posición 44, y en su dominio VL en la posición 100. En un modo de realización preferente, exactamente uno de los fragmentos Fab (es decir, el primer fragmento Fab o bien el segundo fragmento Fab) es un fragmento Fab monocatenario, que se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en su dominio VH en la posición 44, y en su dominio VL en la posición 100.

10 En otro modo de realización preferente, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios, que se estabilizan con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los correspondientes dominios VH y VL (numeración de acuerdo con Kabat):

- VH en la posición 44 y VL en la posición 100;
- 15 - VH en la posición 105 y VL en la posición 43; o
- VH en la posición 101 y VL en la posición 100; y

20 el enlace disulfuro natural entre las cadenas polipeptídicas del respectivo fragmento Fab monocatenario se anula sustituyendo al menos uno de los residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro intercatenarios con otro residuo aminoacídico. Aún en otro modo de realización preferente de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios, que se estabilizan con disulfuro, respectivamente, por introducción de residuos de cisteína en su dominio VH en la posición 44, y en su dominio VL en la posición 100, y el enlace disulfuro natural entre las cadenas polipeptídicas del respectivo fragmento Fab monocatenario se anula sustituyendo al menos uno de los residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro intercatenarios con otro residuo aminoacídico.

25 En un modo de realización de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se alteran por entrecruzamiento de dominios, de modo que:

- 30 a) solo los dominios CH1 y CL se reemplazan entre sí;
- b) solo los dominios VH y VL se reemplazan entre sí; o bien
- 35 c) los dominios CH1 y CL se reemplazan entre sí y los dominios VH y VL se reemplazan entre sí,

40 con la condición de que en caso de que ambos el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se alteren por entrecruzamiento de dominios, se alteren por diferentes entrecruzamientos de dominios. Esto quiere decir, por ejemplo, que en caso de que ambos fragmentos Fab comprendan un entrecruzamiento de dominios, cuando el primer fragmento Fab comprende el entrecruzamiento de dominios definido en a), es decir, los dominios CH1 y CL se reemplacen entre sí, entonces el segundo fragmento Fab comprende el entrecruzamiento de dominios definido en b) (es decir, reemplazo de los correspondientes dominios VH y VL) o bien el entrecruzamiento de dominios definido en c) (es decir, reemplazo de VH-CH1 por VL-CL), pero el segundo fragmento Fab no comprende el entrecruzamiento de dominios definido en a) (es decir, solo los dominios CH1 y CL se reemplazan entre sí). Por lo tanto, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización comprende un entrecruzamiento de dominios asimétrico con respecto al primer y segundo fragmento Fab, lo que quiere decir que debido al entrecruzamiento de dominios las cadenas ligeras del primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab ya no se componen de la misma arquitectura de dominio, sino que más bien se componen de una arquitectura de dominio diferente. De este modo, se evita el emparejamiento de la cadena ligera del primer fragmento Fab con la cadena pesada del segundo fragmento Fab (y viceversa). El presente modo de realización es en particular útil, cuando el primer y segundo fragmento Fab se unen a diferentes epítomos (y, por lo tanto, el anticuerpo multiespecífico es al menos trispecífico). Por el presente modo de realización, la formación de producto secundario y el emparejamiento incorrecto de la cadena ligera (es decir, el emparejamiento de una cadena ligera con la cadena pesada errónea que forma de este modo sitios de unión no funcionales) durante la expresión recombinante se puede reducir y el rendimiento de la expresión del anticuerpo se puede mejorar.

55 Por lo tanto, en un modo de realización preferente de un anticuerpo multiespecífico que incluye un entrecruzamiento de dominios en al menos uno de los fragmentos Fab, el anticuerpo multiespecífico es al menos trispecífico. En otro modo de realización preferente de un anticuerpo multiespecífico que incluye un entrecruzamiento de dominios en al menos uno de los fragmentos Fab, el anticuerpo multiespecífico es trispecífico. Aún en otro modo de realización preferente de un anticuerpo multiespecífico que incluye un entrecruzamiento de dominios en al menos uno de los fragmentos Fab, el anticuerpo multiespecífico es trivalente y trispecífico.

60 En un modo de realización de la invención, solo uno de los fragmentos Fab (es decir, el primer fragmento Fab o el segundo fragmento Fab pero no ambos fragmentos Fab) se altera por un entrecruzamiento de dominios de modo que solo los dominios CH1 y CL del fragmento Fab se reemplazan entre sí.

En un modo de realización de la invención, solo uno de los fragmentos Fab (es decir, el primer fragmento Fab o el segundo fragmento Fab pero no ambos fragmentos Fab) se altera por un entrecruzamiento de dominios de modo que solo los dominios VH y VL del fragmento Fab se reemplazan entre sí.

5 Como los fragmentos Fab se usan como brazos de unión del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el anticuerpo presenta una estructura similar a IgG, sin embargo, comprende un sitio de unión adicional que reemplaza la interfase CH2/CH2 original.

10 Se pueden fusionar otros sitios de unión a los extremos N o extremos C de las cadenas pesadas o cadenas ligeras del anticuerpo multiespecífico para proporcionar anticuerpos de mayor valencia. En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico es trivalente, asemejándose de este modo a la estructura tridimensional natural de una molécula de IgG.

Enlace a diferentes epítomos

15 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo multiespecífico comprende al menos un sitio de unión poliepitópica (es decir, que se puede unir a dos epítomos diferentes en una molécula biológica o dos epítomos diferentes de diferentes moléculas biológicas, por ejemplo, como se divulga en el documento WO 2008/027236 A2). Por esto, se pueden generar anticuerpos multiespecíficos de más de tres especificidades (por ejemplo, anticuerpos tetraespecíficos) en una estructura y peso molecular similares a las moléculas de IgG natural. En un modo de realización de la invención, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, comprenden un sitio de unión poliepitópica. En otro modo de realización de la invención, el tercer sitio de unión comprende un sitio de unión poliepitópica. Aún en otro modo de realización, el primer y el segundo fragmento Fab y el tercer sitio de unión del anticuerpo multiespecífico comprenden un sitio de unión poliepitópica.

25 El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se puede unir a diferentes epítomos. Esto se puede lograr combinando sitios de unión que se unen específicamente a un único antígeno o, además, incluyendo sitios de unión que son poliepitópicos y, por lo tanto, se unen específicamente a más de un epítomo (en un modo de realización preferente, dicho sitio de unión poliepitópica se une a dos epítomos diferentes). De este modo, se pueden producir anticuerpos multiespecíficos trivalentes que se pueden unir a un gran número de epítomos diferentes. Como el primer y segundo sitios de unión a antígeno son respectivos fragmentos Fab, el anticuerpo multiespecífico mantiene de forma ventajosa una forma y peso molecular similares a IgG. Los anticuerpos multiespecíficos son en particular adecuados para unir diferentes epítomos en el mismo antígeno diana (por ejemplo, diferentes epítomos en la misma biomolécula) o diferentes biomoléculas en la misma célula.

30 En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención incluye tres sitios de unión, uniéndose cada uno a un único epítomo. De este modo, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización puede ser biespecífico o trispecífico.

40 En otro modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención incluye al menos un sitio de unión poliepitópica (en un modo de realización preferente, dicho sitio de unión poliepitópica se une a dos epítomos diferentes). En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo trispecífico, en el que los primer y segundo fragmentos Fab de antígeno incluyen dos sitios de unión poliepitópicos idénticos (que se unen específicamente cada uno a dos epítomos diferentes) y el tercer sitio de unión se une específicamente a otro (tercer) epítomo. En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo trispecífico, en el que los primer y segundo fragmentos Fab se unen específicamente a un primer epítomo y el tercer sitio de unión es un sitio de unión poliepitópica que se une específicamente a un segundo y un tercer epítomo. De este modo, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización es al menos trispecífico. Cuando se combinan tres sitios de unión poliepitópicos diferentes que se unen cada uno a dos epítomos diferentes, en un modo de realización del anticuerpo multiespecífico, el anticuerpo puede ser hasta hexaespecífico.

50 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es biespecífico. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es trivalente y biespecífico. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es biespecífico y se une específicamente a dos antígenos diferentes en una célula o dos epítomos diferentes del mismo antígeno. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es trivalente y biespecífico, y se une específicamente a dos antígenos diferentes en una célula o dos epítomos diferentes del mismo antígeno.

55 En un modo de realización preferente de la invención, el anticuerpo es biespecífico, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen específicamente al mismo epítomo, y en el que el tercer sitio de unión se une específicamente a un epítomo diferente. En un modo de realización preferente de la invención, el anticuerpo es trivalente y biespecífico, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen específicamente al mismo epítomo, y en el que el tercer sitio de unión se une específicamente a un epítomo diferente.

60 Dentro de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con estos modos de realización que comprende un primer y segundo fragmento Fab, en un modo de realización, el primer y segundo fragmento Fab no comprenden un entrecruzamiento de dominios. Por lo tanto, en un modo de realización preferente, las cadenas ligeras del primer y segundo fragmento Fab se

componen de dominios VL y CL (en sentido de N terminal a C terminal).

5 En otro modo de realización de la invención, el anticuerpo es biespecífico, en el que el primer fragmento Fab y el tercer sitio de unión se unen específicamente al mismo epítipo, y en el que el segundo fragmento Fab se une específicamente a un epítipo diferente. En otro modo de realización de la invención, el anticuerpo es trivalente y biespecífico, en el que el primer fragmento Fab y el tercer sitio de unión se unen específicamente al mismo epítipo, y en el que el segundo fragmento Fab se une específicamente a un epítipo diferente.

10 Dentro de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con estos modos de realización que comprende un primer y segundo fragmento Fab, al menos uno de los fragmentos Fab comprende un entrecruzamiento de dominios o bien se proporciona en forma de un fragmento Fab monocatenario. En un modo de realización preferente, al menos uno de los fragmentos Fab comprende un entrecruzamiento de dominios como se define anteriormente (incluyendo opcionalmente otros modos de realización de entrecruzamiento de dominios tales como introducción de aminoácidos cargados en al menos uno de los fragmentos Fab). De este modo, se evita el emparejamiento incorrecto de la cadena y se mejora el rendimiento de la expresión del anticuerpo multiespecífico.

15 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es trispecífico. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es trivalente y trispecífico.

20 En un modo de realización preferente de un anticuerpo trispecífico de acuerdo con la invención, cada sitio de unión se une a un único epítipo, en el que el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab y el tercer sitio de unión se unen específicamente a un epítipo diferente, respectivamente.

25 En otro modo de realización de un anticuerpo trispecífico de acuerdo con la invención, el primer y segundo fragmento Fab se unen al mismo epítipo y el tercer sitio de unión se une a dos epítipos diferentes (y por lo tanto es poliepítipo).

30 Aún en otro modo de realización de un anticuerpo trispecífico de acuerdo con la invención, el primer y segundo fragmento Fab se basan en los mismos sitios de unión poliepítipos (uniéndose cada uno a dos epítipos diferentes), y el tercer sitio de unión se une a un único epítipo que es diferente de los epítipos unidos por el primer y segundo fragmento Fab.

35 En todos los modos de realización, en los que el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende un primer fragmento Fab y un segundo fragmento Fab, en el que dicho primer fragmento Fab y dicho segundo fragmento Fab se basan en diferentes sitios de unión y, por lo tanto, se unen específicamente a diferentes epítipos, los fragmentos Fab se diseñan específicamente para evitar el emparejamiento incorrecto de la cadena ligera entre las cadenas ligeras y las cadenas pesadas del primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab, respectivamente, usando fragmentos Fab monocatenarios (que se pueden estabilizar además con disulfuro) o bien usando estrategias de entrecruzamiento de dominios para lograr una arquitectura de dominio diferente en las cadenas ligeras del primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab, suprimiendo de este modo el emparejamiento incorrecto de la cadena ligera.

40 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen específicamente a diferentes epítipos, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, se alteran por un entrecruzamiento de dominios, de modo que:

45 a) solo los dominios CH1 y CL se reemplazan entre sí;

b) solo los dominios VH y VL se reemplazan entre sí; o bien

50 c) los dominios CH1 y CL se reemplazan entre sí y los dominios VH y VL se reemplazan entre sí,

con la condición de que en caso de que ambos el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se alteren por entrecruzamiento de dominios, se alteren por diferentes entrecruzamientos de dominios.

55 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen específicamente a diferentes epítipos, solo uno de los fragmentos Fab (es decir, el primer fragmento Fab o el segundo fragmento Fab pero no ambos fragmentos Fab) se altera por un entrecruzamiento de dominios de modo que solo los dominios CH1 y CL del fragmento Fab se reemplazan entre sí.

60 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen específicamente a diferentes epítipos, solo uno de los fragmentos Fab (es decir, el primer fragmento Fab o el segundo fragmento Fab pero no ambos fragmentos Fab) se altera por un entrecruzamiento de dominios de modo que solo los dominios VH y VL del fragmento Fab se reemplazan entre sí.

65 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen a diferentes epítipos, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios (scFab).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen a diferentes epítomos, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios estabilizados con disulfuro (dsFab).
 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen a diferentes epítomos, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios, que se estabilizan con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los correspondientes dominios VH y VL (numeración de acuerdo con Kabat):

- VH en la posición 44 y VL en la posición 100;
- VH en la posición 105 y VL en la posición 43; o
- VH en la posición 101 y VL en la posición 100.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen a diferentes epítomos, el primer fragmento Fab, el segundo fragmento Fab o ambos, el primer y el segundo fragmento Fab, son fragmentos Fab monocatenarios, que se estabilizan con disulfuro, respectivamente, por introducción de residuos de cisteína en su dominio VH en la posición 44, y en su dominio VL en la posición 100. En un modo de realización preferente, exactamente uno de los fragmentos Fab (es decir, el primer fragmento Fab o bien el segundo fragmento Fab) es un fragmento Fab monocatenario, que se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en su dominio VH en la posición 44, y en su dominio VL en la posición 100.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se unen a diferentes epítomos, el primer fragmento Fab es un fragmento Fab monocatenario (en un modo de realización, un fragmento Fab monocatenario estabilizado con disulfuro) y el segundo fragmento Fab comprende un entrecruzamiento de dominios como se define anteriormente.

Isotipos de anticuerpos

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo multiespecífico comprende regiones constantes de inmunoglobulina de una o más clases de inmunoglobulina. Las clases de inmunoglobulina incluyen los isotipos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y, en el caso de IgG e IgA, sus subtipos. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo multiespecífico tiene una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG.

En un modo de realización, los dominios constantes de un anticuerpo de acuerdo con la invención son de subclase IgG1 o IgG4 humana. En un modo de realización, el dominio CH3 se deriva de un anticuerpo IgG1 humano. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de un dominio CH4.

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano.

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo aislado.

En un modo de realización, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 como se especifica en el presente documento, comprende un dipéptido de glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, comprende un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Complejo que incluye anticuerpo y agente acoplado a hapteno para suministro de carga dirigido

Otro objetivo de la invención es un complejo que comprende (i) un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el anticuerpo se une específicamente al menos a un hapteno y una proteína diana (incluyendo de este modo al menos un sitio de unión que se une específicamente al hapteno y al menos un sitio de unión que se une específicamente a la proteína diana), y (ii) el hapteno, que está unido por el anticuerpo multiespecífico, en el que el hapteno se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico. Dentro del complejo, el hapteno está unido al sitio de unión del anticuerpo, que se une específicamente al hapteno. De este modo, el hapteno conjugado con el agente terapéutico o de diagnóstico se acopla de forma no covalente al anticuerpo. Dentro del complejo, el anticuerpo mantiene su especificidad y afinidad de unión, mientras que el agente terapéutico o de diagnóstico acoplado al hapteno también mantiene su actividad. Los complejos de un anticuerpo biespecífico de unión a hapteno con agente terapéutico o de diagnóstico haptenilado en general son conocidos en la técnica, por ejemplo, a partir del documento WO 2011/1003557 A1. Los complejos de acuerdo con la invención se pueden diseñar y aplicar como se describe en el documento WO 2011/1003557 A1, del que su contenido se incorpora por completo en el presente documento por referencia.

5 En un modo de realización, el anticuerpo presente en el complejo de acuerdo con la invención es biespecífico. En un modo de realización, el hapteno se selecciona de digoxigenina, biotina, teofilina, fluoresceína, DOTA y DOTAM. En un modo de realización, la proteína diana es un antígeno de la superficie celular o un antígeno intracelular. En un modo de realización, la proteína diana es un antígeno asociado a tumor intracelular o uno de la superficie celular. En un modo de realización, la proteína diana es un antígeno asociado a tumor de la superficie celular. En un modo de realización, la proteína diana es Lewis Y. En un modo de realización, la proteína diana es CD33. En un modo de realización, la proteína diana es glipicano 3.

10 En un modo de realización de la invención, dicho anticuerpo multiespecífico se usa como un vehículo de suministro de carga para el agente terapéutico o de diagnóstico. El agente terapéutico o de diagnóstico se conjuga con el hapteno y por tanto se acopla por el sitio de unión a hapteno del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención para formar el complejo de acuerdo con la invención. Este complejo está definido y es estable y suministra específicamente la carga a una célula o tejido diana. Dado que el agente terapéutico o de diagnóstico haptenilado se acopla de manera no covalente al anticuerpo multiespecífico, la carga se une de manera estable a su vehículo de suministro durante la circulación, pero también se libera eficazmente después de la internalización. La conjugación con el hapteno no afecta a la actividad de la mayoría de los agentes terapéuticos o de diagnóstico. Por tanto, el anticuerpo multiespecífico no contiene una carga acoplada covalentemente inusual y, por lo tanto, presenta un bajo riesgo de inmunogenicidad. Por lo tanto, este sencillo procedimiento de conjugación se puede usar para una gran variedad de moléculas de carga en combinación con solo un único anticuerpo multiespecífico; siendo las moléculas de carga, por ejemplo, péptidos, proteínas, moléculas pequeñas, reactivos de formación de imágenes y ácidos nucleicos. Los complejos de un agente de diagnóstico o terapéutico haptenilado con el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención que contienen al menos un sitio de unión de hapteno pueden conferir un comportamiento biofísico benigno y una mejora en los parámetros FC al agente de diagnóstico o terapéutico, por ejemplo, a proteínas, péptidos o moléculas pequeñas de diagnóstico o terapéuticos. Además, dichos complejos pueden dirigir la carga de suministro a las células que presentan el antígeno de proteína diana que se reconoce por el al menos un sitio de unión adicional del anticuerpo multiespecífico.

30 En un modo de realización, el agente terapéutico o de diagnóstico acoplado al hapteno se selecciona del grupo que consiste en un péptido, una proteína, una molécula pequeña, una molécula pequeña marcada radioactivamente, un ácido nucleico y un agente de formación de imágenes.

35 En un modo de realización, el agente terapéutico o de diagnóstico es un péptido. Tras la unión de un péptido haptenilado a un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el péptido mantiene su actividad biológica completa. Los ejemplos no limitantes de péptidos son melitina, Fam5B, INF7, FallV1 y FallV2. Un aspecto de la invención es el uso de los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención para el suministro de péptidos derivados de toxinas a células tumorales que expresan el antígeno diana.

40 En un modo de realización, el agente terapéutico o de diagnóstico es una proteína. Tras la unión de una proteína haptenilada a un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, la proteína mantiene su actividad biológica completa.

45 En un modo de realización, el agente terapéutico o de diagnóstico es una molécula pequeña. En un modo de realización, la molécula pequeña es una toxina o es una molécula pequeña derivada de una toxina. En un modo de realización, la molécula pequeña es la exotoxina *Pseudomonas*.

50 En un modo de realización, el agente terapéutico o de diagnóstico es una molécula pequeña marcada radioactivamente. El radioisótopo haptenilado o el radioisótopo unido a la molécula pequeña haptenilada presenta penetración tisular eficaz, aclaramiento rápido y se mantiene solo en células cubiertas por el complejo de acuerdo con la invención que expresa el antígeno de proteína diana. Esto permite la dirección específica y evita la liberación inespecífica sistémica de radioisótopos terapéuticos. Un aspecto de la invención es el uso de los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención para el suministro de un radioisótopo haptenilado o un radioisótopo unido a una molécula pequeña haptenilada a un tejido enfermo. En un modo de realización, dicho tejido enfermo es un tumor y la proteína diana es un antígeno asociado a tumor.

55 En un modo de realización, el agente terapéutico o de diagnóstico es un ácido nucleico. En un modo de realización, el ácido nucleico es ARN bicatenario (ARNds). Se ha demostrado que las moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) bloquean la expresión génica en un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia de ARN (ARNi). Por lo tanto, un aspecto de la invención es el de los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención para el tratamiento génico dirigido del suministro de ARNds dirigido.

60 En un modo de realización, el agente terapéutico o de diagnóstico es un agente de formación de imágenes. En un modo de realización, el agente de formación de imágenes es un fluoróforo. El agente de formación de imágenes mantiene sus propiedades a pesar de estar haptenilado y complejado con el anticuerpo de acuerdo con la invención. El agente de formación de imágenes haptenilado presenta penetración tisular eficaz, aclaramiento rápido y se mantiene solo en células cubiertas por el complejo de acuerdo con la invención que expresan el antígeno de proteína diana. Esto permite una formación de imágenes con resolución temporal eficaz y la evaluación de la vascularización tumoral o cambios dentro de

la vascularización tumoral. Un aspecto de la invención es el uso de los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención para la formación de imágenes de un tejido enfermo. Otro aspecto de la invención es el uso de los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención de formación de imágenes *in vitro*, por ejemplo, para análisis FACS. En un modo de realización, dicho tejido enfermo es un tumor y la proteína diana es un antígeno asociado a tumor.

5 Otro aspecto es un procedimiento para la preparación de un complejo de acuerdo con la invención, incluyendo el procedimiento las etapas de

10 - proporcionar un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a un hapteno y una proteína diana,

- proporcionar un hapteno, que está unido específicamente por el anticuerpo multiespecífico, en el que el hapteno se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico, y

15 - poner en contacto el anticuerpo multiespecífico con el hapteno, que se conjuga con el agente terapéutico o de diagnóstico.

Otro aspecto de la invención es el uso del complejo de acuerdo con la invención como medicamento. Otro aspecto de la invención es el uso del complejo de acuerdo con la invención para propósitos de diagnóstico.

20 Otro aspecto de la invención es el uso del complejo de acuerdo con la invención para el suministro de un agente terapéutico o de diagnóstico a una célula o tejido diana. Otro aspecto de la invención es el uso del complejo de acuerdo con la invención para tratamiento del cáncer dirigido. Otro aspecto de la invención es el uso del complejo de acuerdo con la invención para radioterapia dirigida.

25 Otro aspecto de la invención es el uso del complejo de acuerdo con la invención para la formación de imágenes de células o tejidos.

30 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende un complejo de acuerdo con la invención que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que se une específicamente a un hapteno y una proteína diana, y un hapteno que se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico. En un modo de realización, dicha composición es una composición de diagnóstico. En otro modo de realización, la composición es una composición farmacéutica.

35 II. Procedimiento recombinante

El anticuerpo multiespecífico se prepara por procedimientos recombinantes. Por tanto, la invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de

40 - transformar una célula huésped con vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multiespecífico,

- cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo multiespecífico, y

45 - recuperar dicho anticuerpo multiespecífico de dicho cultivo de célula huésped.

En un modo de realización de la invención, el procedimiento incluye la etapa de purificación del anticuerpo multiespecífico por medio de cromatografía de afinidad. En un modo de realización de la invención, el procedimiento incluye la etapa de purificación del anticuerpo multiespecífico por medio de cromatografía de afinidad en una columna específica de cadena ligera kappa o cadena ligera lambda.

50 Otro objetivo de la invención es un anticuerpo multiespecífico producido por un procedimiento de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la invención es un ácido nucleico que codifica el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención. En un modo de realización, el ácido nucleico de acuerdo con la invención es un ácido nucleico aislado.

55 En un modo de realización, el ácido nucleico de acuerdo con la invención es un ácido nucleico aislado.

Otro objetivo de la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Otro objetivo de la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención, en el que el vector de expresión puede expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped.

60 Otro objetivo de la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la invención es una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Otro objetivo de la invención es una célula huésped que comprende un vector de expresión de acuerdo con la invención. En un modo de realización, la célula huésped es una célula HEK293 o una célula CHO.

65 Otro objetivo de la invención es una célula huésped que comprende un vector de expresión de acuerdo con la invención.

III. Composición farmacéutica

Otro objetivo de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención. Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En un modo de realización, una composición (en un modo de realización preferente, una composición farmacéutica) que comprende una población de anticuerpos de la invención comprende un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, con un dipéptido de glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, una composición que comprende una población de anticuerpos de la invención comprende un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, con un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

15 En un modo de realización, una composición de este tipo comprende una población de anticuerpos compuesta de anticuerpos que comprenden una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento; anticuerpos que comprenden una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, con un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y anticuerpos que comprenden una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, con un dipéptido de glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

20 Otro objetivo de la invención es una composición farmacéutica que comprende un complejo de acuerdo con la invención que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que se une específicamente a un hapteno y una proteína diana, y un hapteno que se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico. Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un complejo de acuerdo con la invención que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que se une específicamente a un hapteno y una proteína diana, y un hapteno que se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Otro objetivo de la invención es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención acoplado a un agente citotóxico.

30 Otro objetivo de la invención es una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención acoplado a un agente citotóxico. Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención acoplado a un agente citotóxico en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Otro objetivo de la invención es el uso de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención para la fabricación de una composición farmacéutica. Otro objetivo de la invención es un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, incluyendo formular el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Otro objetivo de la invención es el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. Otro objetivo de la invención es el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer. Otro objetivo de la invención es el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades musculares (por ejemplo, distrofia muscular), esclerosis múltiple, nefropatías crónicas, enfermedades óseas (por ejemplo, degeneración ósea en mieloma múltiple), lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica y/o lesión vascular.

45 Otro objetivo de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso como medicamento. Otro objetivo de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del cáncer. Otro objetivo de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades musculares (por ejemplo, distrofia muscular), esclerosis múltiple, nefropatías crónicas, enfermedades óseas (por ejemplo, degeneración ósea en mieloma múltiple), lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica y/o lesión vascular.

50 Otro objetivo de la invención es un complejo de acuerdo con la invención que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que se une específicamente a un hapteno y una proteína diana, y un hapteno que se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico para su uso como medicamento. Otro objetivo de la invención es un complejo de acuerdo con la invención que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que se une

específicamente a un hapteno y una proteína diana, y un hapteno que se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico para su uso en el tratamiento del cáncer. Otro objetivo de la invención es un complejo de acuerdo con la invención que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que se une específicamente a un hapteno y una proteína diana, y un hapteno que se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades musculares (por ejemplo, distrofia muscular), esclerosis múltiple, nefropatías crónicas, enfermedades óseas (por ejemplo, degeneración ósea en mieloma múltiple), lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica y/o lesión vascular.

Otro objetivo de la invención es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención acoplado a un agente citotóxico para su uso como medicamento. Otro objetivo de la invención es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención acoplado a un agente citotóxico para su uso en el tratamiento del cáncer. Otro objetivo de la invención es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención acoplado a un agente citotóxico para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades musculares (por ejemplo, distrofia muscular), esclerosis múltiple, nefropatías crónicas, enfermedades óseas (por ejemplo, degeneración ósea en mieloma múltiple), lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica y/o lesión vascular.

Otro objetivo de la invención es el uso de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento. Otro objetivo de la invención es el uso de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Otro objetivo de la invención es el uso de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades musculares (por ejemplo, distrofia muscular), esclerosis múltiple, nefropatías crónicas, enfermedades óseas (por ejemplo, degeneración ósea en mieloma múltiple), lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica y/o lesión vascular.

3. Modos de realización específicos de la invención

A continuación, se enumeran modos de realización específicos de la invención.

1. Un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos tres sitios de unión a antígeno, en el que dos sitios de unión a antígeno se forman por un primer fragmento Fab y un segundo fragmento Fab, en el que

a) un tercer sitio de unión a antígeno se forma por un dominio variable de la cadena pesada (VH₃) y un dominio variable de la cadena ligera (VL₃), en el que

- el extremo N del dominio VH₃ se conecta al extremo C del dominio constante de la cadena pesada (CH1) o del dominio constante de la cadena ligera (CL) del primer fragmento Fab por medio de un primer conector peptídico, y

- el extremo N del dominio VL₃ se conecta al extremo C del dominio constante de la cadena pesada (CH1) o del dominio constante de la cadena ligera (CL) del segundo fragmento Fab por medio de un segundo conector peptídico,

b) el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por

i) generación de una protuberancia en uno de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, y generación de una cavidad en el otro de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los dominios CH3 es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3; o

sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente, y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente;

ii) introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3, o

iii) ambas modificaciones de i) y ii);

c) el extremo C del dominio VH₃ del tercer sitio de unión a antígeno se conecta a uno de los dominios CH3, y el extremo C del dominio VL₃ del tercer sitio de unión a antígeno se conecta al otro de los dominios CH3, y

d) el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de los dominios constantes de la cadena pesada 2 (CH2).

- 5 2. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 1, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por generación de una protuberancia en uno de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, y generación de una cavidad en el otro de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los dominios CH3 es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3.
- 10 3. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 2, en el que dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original se selecciona de R, F, Y y W.
- 15 4. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 2 o 3, en el que dicho residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original se selecciona de A, S, T y V.
- 20 5. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 2 a 4, en el que el dominio CH3 de una cadena pesada comprende una mutación T366W, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada (la cadena pesada que comprende el "ojal") comprende las mutaciones T366S, L368A y 407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 25 6. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 2 a 5, en el que el dominio CH3 de una cadena pesada comprende las mutaciones T366W y G407Y, y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 30 7. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 1, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente, y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente.
- 35 8. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 2 a 6, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente, y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente.
- 40 9. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 7 u 8, en el que dicho aminoácido cargado positivamente se selecciona de K, R y H.
- 45 10. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 7 a 9, en el que dicho aminoácido cargado negativamente se selecciona de E o D.
- 50 11. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 7 a 10, en el que en el dominio CH3 de una cadena pesada el aminoácido R en la posición 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con D y el aminoácido K en la posición 370 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con E; y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 399 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K y el aminoácido E en la posición 357 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituye con K.
- 55 12. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 2, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3.
- 60 13. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 3 a 6, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3.
- 65 14. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 7, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3.
15. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 8, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización

por introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3.

5 16. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 9 o 10, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3.

10 17. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 12 a 16, en el que los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación E356C o una S354C en uno de los dominios CH3 y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

15 18. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 12 a 16, en el que los dominios CH3 se estabilizan con disulfuro por una mutación S354C en uno de los dominios CH3 y una mutación Y349C en el otro dominio CH3 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

20 19. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 1, en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con Kabat):

- VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;

- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o

25 - VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

20. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 2, en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con Kabat):

30 - VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;

- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o

35 - VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

21. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 7 u 8, en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con Kabat):

40 - VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;

- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o

45 - VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

22. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con Kabat):

50 - VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;

- VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o

55 - VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.

23. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 19 a 22, en el que el tercer sitio de unión se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en el dominio VH₃ en la posición 44, y en el dominio VL₃ en la posición 100.

60 24. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que no se forma un enlace disulfuro intercatenario entre el primer y el segundo conector peptídico.

65 25. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que los primer y segundo conectores peptídicos son idénticos entre sí.

ES 2 764 111 T3

26. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el primer y segundo conector peptídico son péptidos de al menos 15 aminoácidos.
- 5 27. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el primer y segundo conector peptídico son péptidos de 15 - 70 aminoácidos.
28. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 25, en el que el primer y segundo conector peptídico son péptidos de 10 - 20 aminoácidos.
- 10 29. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 27, en el que el primer y segundo conector peptídico son péptidos de 55 - 70 aminoácidos.
30. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que los conectores peptídicos son enlazadores de glicina-serina.
- 15 31. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 30, en el que los enlazadores de glicina-serina son de la estructura
- 20 (GxS)_n o (GxS)_nG_m
- con G = glicina, S = serina, x = 3 o 4, n = 2, 3, 4, 5 o 6, y m = 0, 1, 2 o 3.
32. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que los dominios variables VH₃ y VL₃ se conectan directamente a los respectivos dominios CH3 sin la ayuda de un conector peptídico.
- 25 33. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el extremo C del dominio VH₃ se conecta directamente a uno de los dominios CH3, y el extremo C del dominio VL₃ se conecta directamente al otro de los dominios CH3, en los que los sitios de conexión están desprovistos de un péptido enlazador adicional.
- 30 34. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el extremo N del dominio CH3 se modifica sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original.
- 35 35. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 34, en el que se sustituye al menos un residuo aminoacídico situado en las posiciones 341 a 350 de los dominios CH3 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 40 36. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 34 o 35, en el que el extremo N del dominio CH3 consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
37. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el extremo C del dominio VH₃ se modifica sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original.
- 45 38. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el extremo C del dominio VL₃ se modifica sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original.
39. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el extremo N de cada uno de los dominios CH3 incluye al menos una mutación aminoacídica, el extremo C del dominio VH₃ incluye al menos una mutación aminoacídica y el extremo C del dominio VL₃ incluye al menos una mutación aminoacídica.
- 50 40. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el dominio constante de la cadena ligera del primer y/o el segundo fragmento Fab es de isotipo kappa.
- 55 41. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el dominio constante de la cadena ligera del primer y/o el segundo fragmento Fab es de isotipo lambda.
42. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el dominio constante de la cadena ligera del primer fragmento Fab es de isotipo kappa y el dominio constante de la cadena ligera del segundo fragmento Fab es de isotipo lambda.
- 60 43. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que al menos un fragmento Fab se estabiliza con disulfuro.
44. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que los fragmentos Fab se estabilizan con disulfuro.
- 65

- 5 45. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que los fragmentos Fab se estabilizan con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los correspondientes dominios VH y VL (numeración de acuerdo con Kabat):
- VH en la posición 44 y VL en la posición 100;
 - VH en la posición 105 y VL en la posición 43; o
 - 10 - VH en la posición 101 y VL en la posición 100.
- 15 46. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 43 a 45, en el que el enlace disulfuro natural entre las cadenas polipeptídicas del respectivo fragmento Fab se anula sustituyendo al menos uno de los residuos de cisteína que forman el enlace disulfuro intercatenario con otro residuo aminoacídico.
- 15 47. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que al menos un fragmento Fab es un fragmento Fab monocatenario.
- 20 48. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que al menos un fragmento Fab se altera por un entrecruzamiento de dominios, de modo que:
- a) solo los dominios CH1 y CL se reemplazan entre sí;
 - 25 b) solo los dominios VH y VL se reemplazan entre sí; o bien
 - c) los dominios CH1 y CL se reemplazan entre sí y los dominios VH y VL se reemplazan entre sí,
- 30 con la condición de que en caso de que ambos el primer fragmento Fab y el segundo fragmento Fab se alteren por entrecruzamiento de dominios, se alteren por diferentes entrecruzamientos de dominios.
- 30 49. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo es trivalente.
- 35 50. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo comprende al menos un sitio de unión poliepitópica.
- 40 51. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo es trivalente.
- 40 52. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo comprende tres sitios de unión, uniéndose cada uno a un único epítopo.
- 45 53. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo es biespecífico o trispecífico.
- 45 54. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo comprende al menos un sitio de unión que se une específicamente a un hapteno.
- 50 55. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo comprende exactamente un sitio de unión que se une específicamente a un hapteno.
- 50 56. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo comprende al menos un sitio de unión que se une específicamente a una proteína diana.
- 55 57. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 61, en el que la proteína diana es un antígeno asociado a tumor intracelular o uno de la superficie celular.
- 55 58. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que el anticuerpo comprende al menos un sitio de unión que se une específicamente a un hapteno y al menos un sitio de unión que se une específicamente a una proteína diana.
- 60 59. Un complejo que comprende
- (i) el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 58, en el que el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a un hapteno y una proteína diana, y
- 65

- (ii) el hapteno, que está unido específicamente por el anticuerpo multiespecífico, en el que el hapteno se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico.
- 5 60. El complejo de acuerdo con el modo de realización 59, en el que el hapteno se selecciona de digoxigenina, biotina, teofilina, fluoresceína, DOTA y DOTAM.
61. El complejo de acuerdo con el modo de realización 59 o 60, en el que la proteína diana es un antígeno de la superficie celular o un antígeno intracelular.
- 10 62. El complejo de acuerdo con el modo de realización 61, en el que la proteína diana es un antígeno asociado a tumor intracelular o uno de la superficie celular.
- 15 63. El complejo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 59 a 62, en el que el agente terapéutico o de diagnóstico acoplado al hapteno se selecciona del grupo que consiste en un péptido, una proteína, una molécula pequeña, una molécula pequeña marcada radioactivamente, un ácido nucleico y un agente de formación de imágenes.
- 20 64. Un procedimiento para la preparación del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 58, que comprende las etapas de
- transformar una célula huésped con vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multiespecífico,
 - cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo multiespecífico, y
 - 25 - recuperar dicho anticuerpo multiespecífico de dicho cultivo de célula huésped.
65. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 64, que incluye además la etapa de purificación del anticuerpo multiespecífico por medio de cromatografía de afinidad en una columna específica de cadena ligera kappa o cadena ligera lambda.
- 30 66. Un anticuerpo multiespecífico producido por el procedimiento de acuerdo con el modo de realización 64 o 65.
67. Un procedimiento para la preparación de un complejo, incluyendo las etapas de
- 35 - proporcionar un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con los modos de realización 58, en el que el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a un hapteno y una proteína diana,
- proporcionar un hapteno, que está unido específicamente por el anticuerpo multiespecífico, en el que el hapteno se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico, y
- 40 - poner en contacto el anticuerpo multiespecífico con el hapteno, que se conjuga con el agente terapéutico o de diagnóstico.
- 45 68. Un complejo producido por el procedimiento de acuerdo con el modo de realización 67.
69. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 58.
- 50 70. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el modo de realización 68.
71. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con el modo de realización 69.
72. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de acuerdo con el modo de realización 70.
- 55 73. Una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 58.
74. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 58.
- 60 75. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 58 en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
76. Una composición que comprende el complejo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 59 a 63.
- 65 77. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende el complejo de acuerdo con uno cualquiera de los

modos de realización 59 a 63.

- 5 78. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 59 a 63 en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
79. Una composición de diagnóstico que comprende el complejo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 59 a 63.
- 10 80. Un inmunoc conjugado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 58 acoplado a un agente citotóxico.
81. El inmunoc conjugado de acuerdo con el modo de realización 80, en el que el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a un antígeno asociado a tumor de la superficie celular o un antígeno asociado a tumor intracelular.
- 15 82. Una composición que comprende el inmunoc conjugado de acuerdo con el modo de realización 80 u 81.
83. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende el inmunoc conjugado de acuerdo con el modo de realización 80 u 81.
- 20 84. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoc conjugado de acuerdo con el modo de realización 80 u 81 en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
85. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 57, o un complejo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 59 a 63, o un inmunoc conjugado de acuerdo con el modo de realización 81, en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 86. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 58 para su uso como medicamento.
- 30 87. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 57 para su uso como medicamento.
88. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 57 para su uso como en el tratamiento del cáncer.
89. El complejo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 59 a 63 para su uso como medicamento.
- 35 90. El complejo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 59 a 63 para su uso en el tratamiento del cáncer.
91. El inmunoc conjugado de acuerdo con el modo de realización 80 u 81 para su uso como medicamento.
- 40 92. El inmunoc conjugado de acuerdo con el modo de realización 81 para su uso como medicamento.
93. El inmunoc conjugado de acuerdo con el modo de realización 80 u 81 para el tratamiento del cáncer.
- 45 94. Uso del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 58 para propósitos de diagnóstico.
95. Uso de acuerdo con el modo de realización 94 para formación de imágenes.

50 **DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS**

SEQ ID NO:1	sitio de fusión ejemplar de <anti-DIG> sitio de fusión VL ₃ -CH3 de un anticuerpo de acuerdo con el ejemplo 1
SEQ ID NO:2	extremo N de dominios CH3 (alternativa 1)
SEQ ID NO:3	extremo N de dominios CH3 (alternativa 2)
SEQ ID NO:4	extremo N de dominios CH3 (alternativa 3)
SEQ ID NO:5	polipéptido de cadena ligera con sitio de unión a digoxigenina
SEQ ID NO:6	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Dig-LeY-Dig
SEQ ID NO:7	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Dig-LeY-Dig
SEQ ID NO:8	polipéptido de la cadena ligera con sitio de unión a Lewis Y
SEQ ID NO:9	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb LeY-Dig(SS)-LeY
SEQ ID NO:10	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb LeY-Dig(SS)-LeY

SEQ ID NO:11	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Dig-CD33-Dig
SEQ ID NO:12	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Dig-CD33-Dig
SEQ ID NO:13	polipéptido de cadena ligera con sitio de unión a CD33
SEQ ID NO:14	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb CD33-Dig(SS)-CD33
SEQ ID NO:15	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb CD33-Dig(SS)-CD33
SEQ ID NO:16	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Dig-GPC3-Dig
SEQ ID NO:17	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Dig-GPC3-Dig
SEQ ID NO:18	polipéptido de la cadena ligera con sitio de unión a glipicano 3
SEQ ID NO:19	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3
SEQ ID NO:20	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3
SEQ ID NO:21	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb LeY-Bio(SS)-LeY
SEQ ID NO:22	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb LeY-Bio(SS)-LeY
SEQ ID NO:23	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb CD33-Bio(SS)-CD33
SEQ ID NO:24	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb CD33-Bio(SS)-CD33
SEQ ID NO: 25	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb GPC3-Bio(SS)-GPC3
SEQ ID NO: 26	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb GPC3-Bio(SS)-GPC3
SEQ ID NO:27	polipéptido de cadena ligera con sitio de unión a biotina
SEQ ID NO:28	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Bio-LeY(SS)-Bio
SEQ ID NO:29	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Bio-LeY(SS)-Bio
SEQ ID NO:30	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Bio-CD33(SS)-Bio
SEQ ID NO:31	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Bio-CD33(SS)-Bio
SEQ ID NO:32	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Bio-GPC3(SS)-Bio
SEQ ID NO:33	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Bio-GPC3(SS)-Bio
SEQ ID NO:34	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Dig-LeY(SS)-Dig
SEQ ID NO:35	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Dig-LeY(SS)-Dig
SEQ ID NO:36	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Dig-CD33(SS)-Dig
SEQ ID NO:37	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Dig-CD33(SS)-Dig
SEQ ID NO:38	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 de BsAb Dig-GPC3(SS)-Dig
SEQ ID NO:39	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 de BsAb Dig-GPC3(SS)-Dig

EJEMPLOS

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1:

10 **Producción y expresión de anticuerpos biespecíficos trivalentes de acuerdo con la invención que se unen específicamente a digoxigenina (Dig) y uno de los antígenos de la superficie celular Lewis-Y (LeY), CD33 y glipicano3 (GPC3)**

15 Se diseñaron anticuerpos biespecíficos que comprenden tres sitios de unión a antígeno en una estructura similar a IgG que se compone de dos brazos Fab regulares como primer y segundo restos de unión, que se fusionaron por medio de enlazadores peptídicos de glicina-serina flexibles a un tercer módulo de unión de tamaño Fab aproximadamente. Este tercer módulo de unión reemplaza la región Fc de IgG original de un anticuerpo de longitud completa y se compone de un dominio variable de la cadena pesada VH₃ fusionado a un primer dominio CH3, y un dominio variable de la cadena ligera VL₃ fusionado a un segundo dominio CH3 (fig. 2A). La arquitectura de dominio de los anticuerpos biespecíficos se indica en las figuras 2A y 2B (que ilustran anticuerpos con y sin un enlace disulfuro adicional presente dentro del tercer sitio de unión).

20 Las secuencias de aminoácidos del tercer módulo de unión, en particular el sitio de fusión de los dominios CH3 con VH₃ o bien VL₃, se diseñaron de manera que no posee tensión ni perturbación estérica en la estructura similar a IgG global, y mantiene propiedades similares a IgG.

25 Los fragmentos Fab se fusionan al tercer módulo de unión por medio de conectores peptídicos que se diseñan para reemplazar la región bisagra original de una IgG de longitud completa (fig. 4). Los conectores peptídicos no contienen

puentes disulfuro intercatenarios, lo que facilita el acceso de antígeno al tercer sitio de unión. Sin embargo, la pérdida de puentes disulfuro de bisagra también desestabiliza el derivado de anticuerpo ya que retira la conexión intercatenaria covalente. Para compensar la pérdida de disulfuros de bisagra y recuperar estabilidad, se aplicaron estrategias de heterodimerización para promover la heterodimerización de los dominios del tercer módulo de unión (véase la fig. 2A).

Las moléculas de anticuerpos biespecíficos generados en este ejemplo comprenden dominios CH3 estabilizados con disulfuro con una modificación de "botón" (protuberancia) o bien de "ojal" (cavidad) (fig. 2A y 2B). Dentro de estos ejemplos, se proporcionaron anticuerpos con y sin estabilización con disulfuro en los dominios VH₃ y VL₃ (véase la tabla 2).

Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la tabla 1 se generaron por técnicas de biología molecular clásicas y se expresaron de forma transitoria en células en suspensión HEK293.

En resumen, los anticuerpos se produjeron por cotransfección de vectores de expresión que codifican las cadenas ligeras de los anticuerpos deseados con vectores de expresión que codifican las dos correspondientes "cadenas pesadas" (es decir, los polipéptidos de las estructuras de dominio VH-CH1-enlazador-VH₃-CH3 y VH-CH1-enlazador-VL₃-CH3, respectivamente). Los casetes de expresión, propiedades de plásmido y las condiciones para la expresión transitoria fueron los mismos como se describe por Metz *et al.* Protein Engineering Design and Selection 09/2012; 25(10):571-8 y en el documento WO 2012025525 A1, ambos documentos se incluyen en el presente documento por referencia. Los componentes polipeptídicos de los anticuerpos se expresaron por transcripción controlada por promotor CMV en células en suspensión HEK293 que se cultivaron a 37 °C en un entorno de CO₂ al 8 % humidificado. 7 días después de la transfección, se filtraron de forma estéril los sobrenadantes de cultivo que contenían los anticuerpos biespecíficos secretados.

Tabla 1: Arquitectura de dominio de los anticuerpos biespecíficos indicados

nombre de molécula	fragmentos Fab derivados de	3.º sitio de unión derivado de
BsAb Dig-LeY-Dig	<Dig>	<LeY>
BsAb LeY-Dig(SS)-LeY	<LeY>	<Dig>
BsAb Dig-CD33-Dig	<Dig>	<CD33>
BsAb CD33-Dig(SS)-CD33	<CD33>	<Dig>
BsAb Dig-GPC3-Dig	<Dig>	<GPC3>
BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3	<GPC3>	<Dig>

Los anticuerpos biespecíficos incluyeron las características indicadas en la tabla 2. Todas las construcciones comprendieron dominios constantes de la cadena ligera de isotipo kappa. Además, en todas las construcciones, las sustituciones de "botones" se introdujeron en el dominio CH3 fusionado a VH₃ y las sustituciones de "ojales" se introdujeron en el dominio CH3 fusionado a VL₃. Sin embargo, con el mismo efecto, el "botón" se puede introducir en el dominio CH3 fusionado a VL₃ y el "ojal" se puede introducir en el dominio CH3 fusionado a VH₃.

Tabla 2: Características de los anticuerpos biespecíficos indicados

nombre de molécula	1.º y 2.º conector peptídico	enlace S-S entre VH ₃ y VL ₃	sustituciones de botones en ojales en la interfase CH3/CH3	S-S entre CH3 y CH3
BsAb Dig-LeY-Dig	(Gly ₄ Ser) ₄	-	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb LeY-Dig(SS)-LeY	(Gly ₄ Ser) ₄	VH ₃ Cys44 VL ₃ Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb Dig-CD33-Dig	(Gly ₄ Ser) ₄	-	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb CD33-Dig(SS)-CD33	(Gly ₄ Ser) ₄	VH ₃ Cys44 VL ₃ Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb Dig-GPC3-Dig	(Gly ₄ Ser) ₄	-	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3	(Gly ₄ Ser) ₄	VH ₃ Cys44 VL ₃ Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos biespecíficos sometidos a prueba se indican en la tabla 3.

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de cadenas polipeptídicas de anticuerpos biespecíficos indicados

nombre de molécula	cadenas ligeras SEQ ID NO:	polipéptido VH-CH1- enlazador-VH ₃ -CH3 SEQ ID NO:	polipéptido VH-CH1- enlazador-VL ₃ -CH3 SEQ ID NO:
BsAb Dig-LeY-Dig	5	6	7
BsAb LeY-Dig(SS)-LeY	8	9	10
BsAb Dig-CD33-Dig	5	11	12
BsAb CD33-Dig(SS)-CD33	13	14	15
BsAb Dig-GPC3-Dig	5	16	17
BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3	18	19	20

Ejemplo 2:

5

Purificación y caracterización de anticuerpos biespecíficos trivalentes de acuerdo con la invención

Los anticuerpos biespecíficos expresados anteriormente en el ejemplo 1 se purificaron del sobrenadante por cromatografía de afinidad por medio de una columna HiTrap KappaSelect (GE Healthcare), ya que debido a la falta de dominios CH2 los anticuerpos biespecíficos no se unen a la proteína A. En una segunda etapa de purificación, se obtuvieron anticuerpos biespecíficos homogéneos aplicando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, Superdex200 HiLoad 26/60, GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, a pH 6,0 en un Aekta Avant (GE Healthcare) como se describe previamente para anticuerpos biespecíficos derivados de IgG (S. Metz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 8194-8199).

15

Los resultados ejemplares de estas etapas de purificación para anticuerpos biespecíficos con diferentes especificidades como se indica en la tabla 1 se muestran en la fig. 6. Los análisis de SDS PAGE que demuestran la identidad y pureza de los anticuerpos multiespecíficos generados también se muestran en la fig. 6.

20

Los anticuerpos biespecíficos se pudieron generar por el procedimiento de producción y purificación descrito con rendimientos de entre 3-20 mg/l, como se indica en detalle en la tabla 4.

Tabla 4: Rendimiento de los anticuerpos biespecíficos indicados

nombre de molécula	Rendimiento [mg/l]
BsAb Dig-LeY-Dig	5,7
BsAb LeY-Dig(SS)-LeY	3,0
BsAb Dig-CD33-Dig	6,9
BsAb CD33-Dig(SS)-CD33	20,3
BsAb Dig-GPC3-Dig	8,3
BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3	3,5

25

Ejemplo 3:

Diseño del patrón de disulfuro de complejo para promover la heterodimerización

30

Dentro de los anticuerpos biespecíficos generados en el ejemplo 1, la heterodimerización del tercer módulo de unión se promueve por cuatro interacciones distintas: (i) la interacción entre VH₃ y VL₃, (ii) la estabilización con disulfuro en la interfase VH₃/VL₃, (iii) la estabilización con disulfuro en la interfase CH3/CH3; y (iv) las modificaciones de botones en ojales en la interfase CH3/CH3 (que se pueden reemplazar de forma alternativa por otras estrategias de heterodimerización comparables conocidas por soportar la interacción de dominios CH3, como por ejemplo, la introducción de aminoácidos con carga opuesta dentro de la interfase CH3/CH3). Por esto, se promueve la formación de heterodímeros en lugar de la formación de homodímeros.

35

Como las estabilizaciones de disulfuro del VH₃/VL₃ así como de la interfase CH3/CH3 requirieron la introducción de disulfuros adicionales en estrecha proximidad, fue necesario evitar la formación de disulfuros con emparejamiento incorrecto durante el procedimiento de producción dando lugar a moléculas mal plegadas y no funcionales (fig. 5A).

40

Como es bien conocido, la IgG de longitud completa natural posee un enlace disulfuro intracatenario dentro de cada uno de sus dominios, así como enlaces disulfuro intercatenarios para conectar las cadenas pesadas por medio de las regiones bisagra del anticuerpo. Las cisteínas de la región bisagra no interfieren con el plegamiento de los dominios de anticuerpo individuales y no interactúan en la formación de disulfuro intradominio.

45

Sin embargo, dentro de los anticuerpos de acuerdo con la invención que comprenden estabilizaciones con disulfuro dentro de la interfase VH₃/VL₃, así como en la interfase CH3/CH3, se introducen cisteínas adicionales no emparejadas, que para garantizar el plegamiento correcto no se deben emparejar con cisteínas que forman enlaces disulfuro intracatenarios sino que en su lugar deben formar enlaces interdominios separados definidos. Dentro de los anticuerpos de acuerdo con la invención, los dominios variables se conectan directamente a sus respectivos dominios CH3 (es decir, por la formación de enlaces peptídicos entre aminoácidos de un dominio variable con un aminoácido de un dominio CH3, sin incluir un enlazador peptídico). Se esperaba que una composición de secuencia de este tipo y la estrecha proximidad de residuos de cisteína (incluyendo los residuos de cisteína naturales y los introducidos adicionalmente) favorecería en gran medida la formación de disulfuros con emparejamiento incorrecto (fig. 5A).

Por lo tanto, se creó un sitio de fusión entre los dominios variables (VH₃ y VL₃) y sus respectivos dominios CH3 (fig. 5B, C), lo que permite la correcta formación del enlace disulfuro y evita el emparejamiento incorrecto del disulfuro. En cada cadena polipeptídica del tercer módulo de unión, los residuos de cisteína necesarios para la estabilización de disulfuro adicional están en estrecha proximidad a los residuos de cisteína requeridos para la formación de enlaces disulfuro intracatenarios, pero sorprendentemente no obstante no interfieren con los disulfuros intracatenarios y se emparejan con el correspondiente residuo de cisteína correcto en la otra cadena polipeptídica.

Las fig. 5B y C representan sitios de fusión que incluyen un patrón de cisteína de complejo de este tipo en el tercer módulo de unión, lo que permite el plegamiento de proteína correcto.

Otro objetivo del diseño del sitio de fusión entre los dominios variables y los dominios CH3 fue imitar estrechamente los sitios de transición naturales presentes en el anticuerpo original entre (i) los dominios VH y CH1, así como los dominios CH2 y CH3 para el sitio de fusión entre VH₃ y CH3; y (ii) los dominios VL y CL así como los dominios CH2 y CH3 para el sitio de fusión entre VL₃ y CH3. Por lo tanto, los residuos aminoacídicos distintos en el extremo C de los dominios variables y el extremo N de los dominios CH3 se pueden sustituir con otro residuo aminoacídico para proporcionar un sitio de fusión de una estructura terciaria de una homología distinta al sitio de transición natural entre regiones variables y constantes. Las secuencias de aminoácidos alternativas ejemplares del extremo N de los dominios CH3 se indican en la fig. 5B.

Ejemplo 4:

Estudios de unión de anticuerpos biespecíficos trivalentes de acuerdo con la invención

La unión a antígeno simultánea de los anticuerpos generados en el ejemplo 1 se analizó por análisis FACS en células MCF7 que expresan LeY, células Molm13 que expresan CD33 y células HepG2 que expresan GPC3 usando Dig-Cy5 como carga para abordar la unión a hapteno. Los resultados se muestran en la fig. 7.

Se observó unión a hapteno y unión a la superficie celular simultáneas para todos los anticuerpos biespecíficos con el sitio de unión específica a Dig en el tercer módulo de unión y los sitios de unión a antígeno específicos para el respectivo marcador de superficie celular dentro de los fragmentos Fab. También se observó unión a hapteno y unión a la superficie celular simultáneas para los anticuerpos con los sitios de unión específica a Dig en los fragmentos Fab y los sitios de unión a antígeno específicos para el respectivo marcador de superficie celular en el tercer módulo de unión.

Los datos indican que el tercer sitio de unión es fácilmente accesible para antígenos pequeños, por ejemplo, haptenos (como digoxigenina). El tercer sitio de unión también es accesible para unir antígenos más grandes tales como proteínas, por ejemplo, proteínas de la superficie celular. Para esos antígenos, la eficacia de unión puede depender de la accesibilidad del epítipo y el impedimento estérico potencial. Como se demostró, los antígenos de la superficie celular CD33, GPC3 o LeY son accesibles al tercer sitio de unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Debido a estas características, los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden aplicar para abordar o reticular simultáneamente dos dianas, por ejemplo, para formación de imágenes o para suministro de carga dirigido.

Ejemplo 5:

Aplicación de anticuerpos biespecíficos trivalentes de acuerdo con la invención para suministro de carga dirigido

Los anticuerpos de acuerdo con la invención (BsAb LeY-Dig(SS)-LeY) proporcionados en el ejemplo 1 y 2 se complejaron con un derivado de exotoxina de *Pseudomonas* (PE) truncada digoxigenilada como carga tóxica. Una ilustración esquemática de dicho complejo se indica en la fig. 9. Para evaluar si los complejos que incluyen los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden dirigir a células cancerosas induciendo de este modo la muerte celular, se pusieron en contacto células de una línea celular de cáncer de mama MCF7 que expresa LeY *in vitro* con los complejos. Se evaluó la inducción de la muerte celular por un ensayo BrdU comercial (ELISA de proliferación celular, BrdU (quimioluminiscencia), n.º cat. 11 669 915 001, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los siguientes controles se analizaron en paralelo:

- estaurosporina (control positivo),
- sin aditivos (medio solo, control negativo)

5 - PE libre,

- PE digoxigenilada libre (PE-Dig),

10

- anticuerpo libre BsAb LeY-Dig(SS)-LeY que no se complejó con PE-Dig,

- anticuerpo libre BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3 (que no se une a células de cáncer de mama MCF7),

15

- complejo de BsAb CD33-Dig(SS)-CD33 (proporcionado en los ejemplos 1 y 2) con PE digoxigenilada (control negativo para evaluar la actividad inespecífica de un complejo que incluye un anticuerpo de acuerdo con la invención y una toxina como CD33 no se une a células de cáncer de mama MCF7; demostrado en la fig. 7).

El siguiente ejemplo comparativo se analizó en paralelo:

20

Como los complejos de anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a digoxigenina y un antígeno diana con moléculas pequeñas acopladas a digoxigenina son conocidos en la técnica (divulgados en el documento WO 2011/1003557 A1, arquitectura de dominio como se indica en la fig. 17a), se usó dicho complejo de anticuerpo como ejemplo comparativo. En resumen, el anticuerpo biespecífico estaba compuesto de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a LeY con un fragmento Fv que se une específicamente a Dig fusionada al extremo C de cada cadena pesada (denominado "BsAb LeY-Dig(2+2)"). Los dominios variables de este anticuerpo fueron los mismos que el anticuerpo BsAb LeY-Dig(SS)-LeY de acuerdo con la invención.

25

Los resultados (fig. 10) demuestran que solo el complejo del anticuerpo BsAb LeY-Dig(SS)-LeY de acuerdo con la invención y la PE digoxigenilada se pueden dirigir eficazmente a células de cáncer de mama MCF7 en concentraciones nanomolares bajas, lo que indica la dirección específica a las células cancerosas. Por el contrario, los complejos que abordan el antígeno CD33 que no está presente en células de cáncer de mama MCF7 apenas muestran toxicidad. Además, la toxina sin dirigir a vehículos o anticuerpos de control sin una carga tóxica no mostró actividad notable.

30

Ejemplo 6:

35

Producción y análisis de anticuerpos biespecíficos trivalentes de acuerdo con la invención que se unen específicamente a biotina (Bio) y uno de los antígenos de la superficie celular Lewis-Y (LeY), CD33 y glipicano3 (GPC3)

40

Los anticuerpos biespecíficos que comprenden tres sitios de unión a antígeno con la misma arquitectura de dominio que se une específicamente a biotina y LeY, o biotina y CD33, o biotina y GPC3 se diseñaron como se describe para los anticuerpos de acuerdo con el ejemplo 1.

La arquitectura de dominio de los anticuerpos biespecíficos se indica en las figuras 2A y 2B, lo que indica que se usaron fragmentos Fab como primer y segundo sitio de unión a antígeno.

45

Tabla 5: Arquitectura de dominio de los anticuerpos biespecíficos indicados

nombre de molécula	fragmentos Fab derivados de	3.º sitio de unión derivado de
BsAb LeY-Bio(SS)-LeY	<LeY>	<Bio>
BsAb CD33-Bio(SS)-CD33	<CD33>	<Bio>
BsAb GPC3-Bio(SS)-GPC3	<GPC3>	<Bio>

50

Los anticuerpos biespecíficos incluyeron las características indicadas en las tablas 5 y 6. Todas las construcciones comprendieron dominios constantes de la cadena ligera de isotipo kappa. Además, en todas las construcciones, las sustituciones de "botones" se introdujeron en el dominio CH3 fusionado a VH₃ y las sustituciones de "ojales" se introdujeron en el dominio CH3 fusionado a VL₃.

Tabla 6: Características de los anticuerpos biespecíficos indicados

55

nombre de molécula	1.º y 2.º conector peptídico	enlace S-S entre VH ₃ y VL ₃	sustituciones de botones en ojales en la interfase CH3/CH3	S-S entre CH3 y CH3
BsAb LeY-Bio(SS)-LeY	(Gly ₄ Ser) ₄	VH ₃ Cys44 VL ₃ Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb CD33-Bio(SS)-CD33	(Gly ₄ Ser) ₄	VH ₃ Cys44 VL ₃ Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb GPC3-Bio(SS)-GPC3	(Gly ₄ Ser) ₄	VH ₃ Cys44 VL ₃ Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos biespecíficos sometidos a prueba se indican en la tabla 7.

5 **Tabla 7: Secuencias de aminoácidos de cadenas polipeptídicas de anticuerpos biespecíficos indicados**

nombre de molécula	cadena ligeras SEQ ID NO:	polipéptido VH-CH1-enlazador-VH ₃ -CH3 SEQ ID NO:	polipéptido VH-CH1-enlazador-VL ₃ -CH3 SEQ ID NO:
BsAb LeY-Bio(SS)-LeY	8	21	22
BsAb CD33-Bio(SS)-CD33	13	23	24
BsAb GPC3-Bio(SS)-GPC3	18	25	26

Los tres anticuerpos se expresaron de forma transitoria en células HEK293 y se purificaron como se describe en los ejemplos 1 y 2.

10

Tabla 8: Rendimiento de los anticuerpos biespecíficos indicados

nombre de molécula	Rendimiento [mg/l]
BsAb LeY-Bio(SS)-LeY	3,8
BsAb CD33-Bio(SS)-CD33	8,3
BsAb GPC3-Bio(SS)-GPC3	3,8

15 Para someter a prueba la unión a antígeno simultánea de BsAb LeY-Bio(SS)-LeY, se analizó el anticuerpo por análisis FACS en células MCF7 que expresan LeY usando Cy5 biotinilada como carga. Los resultados del análisis FACS se muestran en la fig. 8.

20 Se observó unión simultánea a biotina y la superficie celular de MCF7 para el anticuerpo BsAb LeY-Bio(SS)-LeY. Como control, se pasó en paralelo un complejo del BsAb CD33-Bio(SS)-CD33 con Cy5 biotinilada como carga, demostrando que no se identificó una unión inespecífica del complejo a las células cancerosas. Los resultados fueron que el tercer sitio de unión del anticuerpo de acuerdo con la invención es fácilmente accesible para la unión a hapteno, específicamente para la unión a biotina y cargas acopladas a biotina.

25 **Ejemplo 7:**

Aplicación de anticuerpos biespecíficos trivalentes de acuerdo con la invención para suministro de carga dirigido

30 Usando el mismo enfoque como se describe en el ejemplo 5, se evaluaron los anticuerpos de acuerdo con la invención preparados en el ejemplo 6 para determinar su aplicabilidad en el suministro de carga dirigido. Para esto, se complejaron los anticuerpos con un derivado de exotoxina de *Pseudomonas* (PE) truncada biotinilada como carga tóxica. Una ilustración esquemática de dicho complejo se indica en la fig. 9.

35 Para evaluar si los complejos de BsAb LeY-Bio(SS)-LeY con PC biotinilada se pueden dirigir a células cancerosas, induciendo de este modo la muerte celular, se pusieron en contacto las células de una línea celular de cáncer de mama MCF7 que expresa LeY *in vitro* con los complejos. Se evaluó la inducción de la muerte celular por un ensayo BrdU comercial (ELISA de proliferación celular, BrdU (quimioluminiscencia), n.º cat. 11 669 915 001, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Los siguientes controles se analizaron en paralelo:

- estaurosporina (control positivo),
- sin aditivos (medio solo, control negativo)

- PE biotinilada libre (PE-Bio),

- complejo de BsAb CD33-Bio(SS)-CD33 (proporcionado en los ejemplos 1 y 2) con PE biotinilada (control negativo para evaluar la actividad inespecífica de un complejo que incluye un anticuerpo de acuerdo con la invención y una toxina como CD33 no se une a células de cáncer de mama MCF7; demostrado en la fig. 7).

Los resultados (fig. 11) demuestran que solo el complejo del anticuerpo BsAb LeY-Bio(SS)-LeY de acuerdo con la invención y la PE biotinilada se pueden dirigir eficazmente a células de cáncer de mama MCF7 en concentraciones nanomolares bajas, lo que indica la dirección específica a las células cancerosas. Por el contrario, los complejos que abordan el antígeno CD33 que no está presente en células de cáncer de mama MCF7 apenas muestran toxicidad. Además, la toxina sin dirigir a vehículos o anticuerpos de control sin una carga tóxica no mostró actividad notable.

Ejemplo 8:

Producción de anticuerpos biespecíficos trivalentes de acuerdo con la invención que se unen específicamente a biotina (Bio) o bien digoxigenina (Dig) en combinación con uno de los antígenos de la superficie celular Lewis-Y (LeY), CD33 y GPC3

Se diseñaron anticuerpos biespecíficos que comprenden tres sitios de unión a antígeno con la misma arquitectura de dominio que se une específicamente a biotina (Bio) o bien digoxigenina (Dig) en combinación con uno de los antígenos de la superficie celular Lewis-Y (LeY), CD33 y GPC3, como se describe para los anticuerpos de acuerdo con el ejemplo 1. La arquitectura de dominio de los anticuerpos biespecíficos se indica en las figuras 2A y 2B, lo que indica que se usan fragmentos Fab como primer y segundo sitio de unión a antígeno.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen las características indicadas en las tablas 9 y 10. Todas las construcciones comprenden dominios constantes de la cadena ligera de isotipo kappa. Además, en todas las construcciones, las sustituciones de "botones" se introducen en el dominio CH3 fusionado a VH3 y las sustituciones de "ojales" se introducen en el dominio CH3 fusionado a VL3.

Tabla 9: Arquitectura de dominio de los anticuerpos biespecíficos indicados

nombre de molécula	fragmentos Fab derivados de	3.º sitio de unión derivado de
BsAb Bio-LeY(SS)-Bio	<Bio>	<LeY>
BsAb Bio-CD33(SS)-Bio	<Bio>	<CD33>
BsAb Bio-GPC3(SS)-Bio	<Bio>	<GPC3>
BsAb Dig-LeY(SS)-Dig	<Dig>	<LeY>
BsAb Dig-CD33(SS)-Dig	<Dig>	<CD33>
BsAb Dig-GPC3(SS)-Dig	<Dig>	<GPC3>

Tabla 10: Características de los anticuerpos biespecíficos indicados

nombre de molécula	1.º y 2.º conector peptídico	enlace S-S entre VH3 y VL3	sustituciones de botones en ojales en la interfase CH3/CH3	S-S entre CH3 y CH3
BsAb Bio-LeY(SS)-Bio	(Gly4Ser)4	VH3 Cys44 VL3 Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb Bio-CD33(SS)-Bio	(Gly4Ser)4	VH3 Cys44 VL3 Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb Bio-GPC3(SS)-Bio	(Gly4Ser)4	VH3 Cys44 VL3 Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb Dig-LeY(SS)-Dig	(Gly4Ser)4	VH3 Cys44 VL3 Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb Dig-CD33(SS)-Dig	(Gly4Ser)4	VH3 Cys44 VL3 Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)
BsAb Dig-GPC3(SS)-Dig	(Gly4Ser)4	VH3 Cys44 VL3 Cys100	Trp366, Tyr407 (botón); Ser366, Ala368, Val407 (ojal)	Cys354 (botón); Cys349 (ojal)

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos biespecíficos sometidos a prueba se indican en la tabla 11.

Tabla 11: Secuencias de aminoácidos de cadenas polipeptídicas de anticuerpos biespecíficos indicados

ES 2 764 111 T3

nombre de molécula	cadenas ligeras SEQ ID NO:	polipéptido VH-CH1- enlazador-VH₃-CH3 SEQ ID NO:	polipéptido VH-CH1- enlazador-VL₃-CH3 SEQ ID NO:
BsAb Bio-LeY(SS)-Bio	27	28	29
BsAb Bio-CD33(SS)-Bio	27	30	31
BsAb Bio-GPC3(SS)-Bio	27	32	33
BsAb Dig-LeY(SS)-Dig	5	34	35
BsAb Dig-CD33(SS)-Dig	5	36	37
BsAb Dig-GPC3(SS)-Dig	5	38	39

Los anticuerpos se expresan y purifican como se describe en los ejemplos 1 y 2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> ANTICUERPOS MULTIESPECÍFICOS

<130> P32449-WO

10 <150> EP14196046.8
<151> 03/12/2014

<160> 39

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 52
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sitio de fusión ejemplar de <anti-DIG> sitio de fusión VL3-CH3 de un anticuerpo de acuerdo con el ejemplo 1

25 <400> 1

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr Phe Gly Cys
1 5 10 15

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
20 25 30

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
35 40 45

Ser Cys Ala Val
50

30 <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> extremo N de dominios CH3 (alternativa 1)

35 <400> 2

Gly Gln Pro Arg Glu
1 5

40 <210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> extremo N de dominios CH3 (alternativa 2)

45 <400> 3

Ala Ser Thr Arg Glu
1 5

ES 2 764 111 T3

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> extremo N de dominios CH3 (alternativa 3)
 10 <400> 4

Arg Thr Val Ala Ala
1 5

 <210> 5
 15 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> polipéptido de cadena ligera con sitio de unión a digoxigenina

 <400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
 25
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

ES 2 764 111 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 6
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb Dig-LeY-Dig

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

ES 2 764 111 T3

	115		120		125														
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser				
	130					135					140								
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu				
145					150					155					160				
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His				
				165					170					175					
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser				
			180					185						190					
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys				
		195					200						205						
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu				
	210					215					220								
Pro	Lys	Ser	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				
225					230						235				240				
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly				
				245					250					255					
Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Thr				
			260					265						270					
Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Thr				
		275					280						285						
Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Asn	Asp	Asp	Ser				
	290					295						300							
Ser	Ala	Ala	Tyr	Ser	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg				
305					310					315					320				
Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Ser				
				325					330					335					
Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Trp	Gly	Ala				
			340					345					350						
Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly				
		355					360					365							

ES 2 764 111 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 7

<211> 467

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Dig-LeY-Dig

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met

ES 2 764 111 T3

100	105	110																		
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr					
		115					120					125								
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser					
	130					135					140									
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu					
145					150					155					160					
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His					
				165					170					175						
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser					
			180					185						190						
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys					
		195					200						205							
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu					
	210					215					220									
Pro	Lys	Ser	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly					
225				230						235					240					
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro					
				245					250					255						
Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg					
			260					265						270						
Ser	Ser	Gln	Ile	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp					
		275					280						285							
Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val					
	290					295					300									
Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser					
305					310					315					320					
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu					
				325					330					335						
Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	His	Val	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly					
			340					345					350							

ES 2 764 111 T3

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 8
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido de la cadena ligera con sitio de unión a Lewis Y

<400> 8

Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

ES 2 764 111 T3

85

90

95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile 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> 9
<211> 474
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb LeY-Dig(SS)-LeY

<400> 9

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ES 2 764 111 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp 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 Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
245 250 255

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys
260 265 270

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
275 280 285

Leu Ile Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
290 295 300

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

ES 2 764 111 T3

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

ES 2 764 111 T3

305 310 315 320

Asp Asn Pro Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 325 330 335

Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala
 340 345 350

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 12
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Dig-CD33-Dig

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

ES 2 764 111 T3

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro
245 250 255

Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
260 265 270

Ala Ser Glu Ser Leu Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe
275 280 285

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser

ES 2 764 111 T3

Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

- <210> 14
- 5 <211> 471
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb CD33-Dig(SS)-CD33
- <400> 14

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

ES 2 764 111 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 225 230 235 240

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 245 250 255

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala
 260 265 270

ES 2 764 111 T3

Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser
275 280 285

Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
290 295 300

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
305 310 315 320

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
325 330

Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala
340 345 350

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

- 5 <210> 15
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

- 10 <220>
<223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb CD33-Dig(SS)-CD33

<400> 15

ES 2 764 111 T3

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

ES 2 764 111 T3

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu
 260 265 270

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 275 280 285

Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 290 295 300

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 305 310 315 320

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr
 325 330 335

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

- <210> 16
- 5 <211> 470
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb Dig-GPC3-Dig
- <400> 16

ES 2 764 111 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 245 250 255

ES 2 764 111 T3

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
260 265 270

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala
275 280 285

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly
290 295 300

Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala
305 310 315 320

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser
325 330 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr
340 345 350

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

- <210> 17
- 5 <211> 467
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Dig-GPC3-Dig

ES 2 764 111 T3

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

5

ES 2 764 111 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
 245 250 255

Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 260 265 270

Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp
 275 280 285

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 290 300

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 305 310 315 320

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
 325 330 335

Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly
 340 345 350

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

- <210> 18
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 764 111 T3

<220>

<223> polipéptido de la cadena ligera con sitio de unión a glipicano 3

5 <400> 18

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile 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

10

<210> 19

<211> 470

ES 2 764 111 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3

<400> 19

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

10

ES 2 764 111 T3

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 225 230 235 240

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu
 245 250 255

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met
 260 265 270

Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ser
 275 280 285

Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 290 295 300

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 305 310 315 320

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 325 330 335

Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr
 340 345 350

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

- <210> 20
- <211> 452
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb GPC3-Dig(SS)-GPC3
- <400> 20

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

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

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

ES 2 764 111 T3

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

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 225 230 235 240

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 245 250 255

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn
 260 265 270

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr
 275 280 285

Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 290 295 300

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 305 310 315 320

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr Phe
 325 330 335

Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

5 <210> 21
<211> 469
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb LeY-Bio(SS)-LeY
<400> 21

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp 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 2 764 111 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 Gly Gly
 210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 245 250 255

Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys
 260 265 270

Asp Thr Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu
 275 280 285

Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln
 290 295 300

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr
 305 310 315 320

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 325 330 335

Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
 340 345 350

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

ES 2 764 111 T3

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 22
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb LeY-Bio(SS)-LeY

<400> 22

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp 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

ES 2 764 111 T3

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 Gly Gly
 210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 245 250 255

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His
 260 265 270

Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
 275 280 285

Leu Ile Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
 290 295 300

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 305 310 315 320

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser
 325 330 335

ES 2 764 111 T3

Ile Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

- 5 <210> 23
- <211> 466
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb CD33-Bio(SS)-CD33
- <400> 23

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

- 15 Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ES 2 764 111 T3

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

Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
225 230 235 240

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser
245 250 255

Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr Phe
260 265 270

Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly
275 280 285

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
290 295 300

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
305 310 315 320

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
325 330 335

ES 2 764 111 T3

Arg Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

5

<210> 24
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb CD33-Bio(SS)-CD33

15

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser
 20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

ES 2 764 111 T3

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

ES 2 764 111 T3

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr
 325 330 335

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

- 5 <210> 25
- <211> 465
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb GPC3-Bio(SS)-GPC3
- <400> 25

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

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

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

- 15 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

ES 2 764 111 T3

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

ES 2 764 111 T3

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 325 330 335

Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 340 345 350

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

- 5 <210> 26
- <211> 452
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb GPC3-Bio(SS)-GPC3
- <400> 26

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

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

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

15

ES 2 764 111 T3

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
225 230 235 240

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
245 250 255

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser
260 265 270

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
275 280 285

Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
290 295 300

ES 2 764 111 T3

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
305 310 315 320

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr Phe
325 330 335

Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

- 5 <210> 27
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> polipéptido de la cadena ligera con sitio de unión a biotina
- <400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

15

ES 2 764 111 T3

Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

- 5 <210> 28
- <211> 469
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb Bio-LeY(SS)-Bio
- <400> 28

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

- 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr
20 25 30

ES 2 764 111 T3

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

ES 2 764 111 T3

Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Cys Leu
 275 280 285

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser Ser Ala Ala Tyr Ser
 290 295 300

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
 305 310 315 320

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile
 325 330 335

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
 340 345 350

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

- 5
- <210> 29
- <211> 462
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Bio-LeY(SS)-Bio
- 15 <400> 29

ES 2 764 111 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr
 20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 245 250 255

ES 2 764 111 T3

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile
 260 265 270

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 275 280 285

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 290 295 300

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 305 310 315 320

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 325 330 335

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
 340 345 350

Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

5

<210> 30
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb Bio-CD33(SS)-Bio

15

<400> 30

ES 2 764 111 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr
 20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 245 250 255

ES 2 764 111 T3

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile
260 265 270

Thr Asp Ser Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu
275 280 285

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn
290 295 300

Gln Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn
305 310 315 320

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe
325 330 335

Tyr Tyr Cys Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

5

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 31
<211> 461
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Bio-CD33(SS)-Bio

ES 2 764 111 T3

<400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr
 20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

5

ES 2 764 111 T3

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala
 245 250 255

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu
 260 265 270

Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
 275 280 285

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly
 290 295 300

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu
 305 310 315 320

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 325 330 335

Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu
 340 345 350

Val Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

5

<210> 32
 <211> 465
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb Bio-GPC3(SS)-Bio

ES 2 764 111 T3

<400> 32

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr
 20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

ES 2 764 111 T3

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 245 250 255

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 260 265 270

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu
 275 280 285

Glu Trp Met Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 290 295 300

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 305 310 315 320

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 325 330 335

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 340 345 350

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
 370 375 380

5

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 33
 <211> 462
 <212> PRT

10

ES 2 764 111 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Bio-GPC3(SS)-Bio

5

<400> 33

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr
20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

ES 2 764 111 T3

Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 245 250 255

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 260 265 270

Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 275 280 285

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 290 295 300

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 305 310 315 320

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 325 330 335

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
 340 345 350

Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

5

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

10

<210> 34
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb Dig-LeY(SS)-Dig

ES 2 764 111 T3

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

ES 2 764 111 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly
 245 250 255

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr
 260 265 270

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr
 275 280 285

Pro Glu Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Asp Asp Ser
 290 295 300

Ser Ala Ala Tyr Ser Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320

Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser
 325 330 335

Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Ala Trp Gly Ala
 340 345 350

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 355 360 365

5

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
 370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 35
 <211> 467
 <212> PRT

10

ES 2 764 111 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Dig-LeY(SS)-Dig

5

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

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

10

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

ES 2 764 111 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro
 245 250 255

Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 260 265 270

Ser Ser Gln Ile Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp
 275 280 285

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 290 295 300

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 305 310 315 320

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu
 325 330 335

Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly
 340 345 350

5

Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

<210> 36
 <211> 471
 <212> PRT

10

ES 2 764 111 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb Dig-CD33(SS)-Dig

5

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

10

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 245 250 255

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 260 265 270

Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 275 280 285

Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly
 290 295 300

Gly Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val
 305 310 315 320

Asp Asn Pro Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 325 330 335

5

Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala
 340 345 350

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

ES 2 764 111 T3

<210> 37
 <211> 466
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Dig-CD33(SS)-Dig

10 <400> 37

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

15

ES 2 764 111 T3

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro
 245 250 255

Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
 260 265 270

Ala Ser Glu Ser Leu Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe
 275 280 285

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser
 290 295 300

Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 305 310 315 320

Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala
 325 330 335

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Cys
 340 345 350

Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

ES 2 764 111 T3

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

5 <210> 38
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VH3-CH3 de BsAb Dig-GPC3(SS)-Dig
 <400> 38

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

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
 100 105 110

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

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

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

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

ES 2 764 111 T3

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 245 250 255

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 260 265 270

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala
 275 280 285

Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly
 290 295 300

Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala
 305 310 315 320

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 325 330 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr
 340 345 350

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

ES 2 764 111 T3

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 39
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido VH-CH1-enlazador-VL3-CH3 de BsAb Dig-GPC3(SS)-Dig

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
 100 105 110

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

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

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

ES 2 764 111 T3

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
 245 250 255

Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 260 265 270

Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp
 275 280 285

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 290 295 300

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 305 310 315 320

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
 325 330 335

Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly
 340 345 350

Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

ES 2 764 111 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos tres sitios de unión a antígeno, en el que dos sitios de unión a antígeno se forman por un primer fragmento Fab y un segundo fragmento Fab, en el que
- 10 a) un tercer sitio de unión a antígeno se forma por un dominio variable de la cadena pesada (VH₃) y un dominio variable de la cadena ligera (VL₃), en el que
- el extremo N del dominio VH₃ se conecta al extremo C del dominio constante de la cadena pesada (CH1) o del dominio constante de la cadena ligera (CL) del primer fragmento Fab por medio de un primer conector peptídico, y
- el extremo N del dominio VL₃ se conecta al extremo C del dominio constante de la cadena pesada (CH1) o del dominio constante de la cadena ligera (CL) del segundo fragmento Fab por medio de un segundo conector peptídico,
- 15 b) el anticuerpo multiespecífico comprende dos dominios constantes de la cadena pesada 3 (CH3), que se alteran para promover la heterodimerización por
- i) generación de una protuberancia en uno de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo aminoacídico original, y
- 20 generación de una cavidad en el otro de los dominios CH3 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original con un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoacídico original, de modo que la protuberancia generada en uno de los dominios CH3 es posicionable en la cavidad generada en el otro de los dominios CH3; o
- 25 sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en uno de los dominios CH3 con un aminoácido cargado positivamente, y sustituyendo al menos un residuo aminoacídico original en el otro de los dominios CH3 con un aminoácido cargado negativamente;
- 30 ii) introducción de al menos un residuo de cisteína en cada dominio CH3 de modo que se forma un enlace disulfuro entre los dominios CH3, o
- iii) ambas modificaciones de i) y ii);
- 35 c) el extremo C del dominio VH₃ del tercer sitio de unión a antígeno se conecta a uno de los dominios CH3, y el extremo C del dominio VL₃ del tercer sitio de unión a antígeno se conecta al otro de los dominios CH3, y
- d) el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de los dominios constantes de la cadena pesada 2 (CH2).
- 40 2. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tercer sitio de unión a antígeno se estabiliza con disulfuro por introducción de residuos de cisteína en las siguientes posiciones para formar un enlace disulfuro entre los dominios VH₃ y VL₃ (numeración de acuerdo con Kabat):
- VH₃ en la posición 44, y VL₃ en la posición 100;
- 45 - VH₃ en la posición 105, y VL₃ en la posición 43; o
- VH₃ en la posición 101, y VL₃ en la posición 100.
- 50 3. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer y segundo conector peptídico son péptidos de al menos 15 aminoácidos.
4. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que no se forma un enlace disulfuro intercatenario entre el primer y el segundo conector peptídico.
- 55 5. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el extremo C del dominio VH₃ se conecta directamente a uno de los dominios CH3, y el extremo C del dominio VL₃ se conecta directamente al otro de los dominios CH3.
- 60 6. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es trivalente.
7. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es biespecífico o triespecífico.
- 65 8. Un complejo que comprende

- el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a un hapteno y una proteína diana, y
 - 5 - el hapteno, que está unido específicamente por el anticuerpo multiespecífico, en el que el hapteno se conjuga con un agente terapéutico o de diagnóstico.
9. Un procedimiento para la preparación del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de
- 10 - transformar una célula huésped con vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multiespecífico,
 - cultivar dicha célula huésped en condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo multiespecífico, y
 - 15 - recuperar dicho anticuerpo multiespecífico de dicho cultivo de célula huésped.
10. Un anticuerpo multiespecífico producido por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 20 12. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.
- 25 14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un complejo de acuerdo con la reivindicación 8, en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 15. Un inmunocombinado que comprende el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 acoplado a un agente citotóxico.

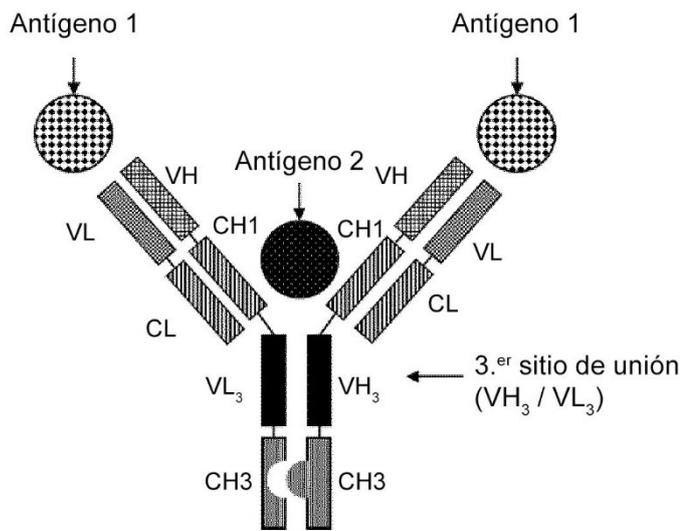


Fig. 1

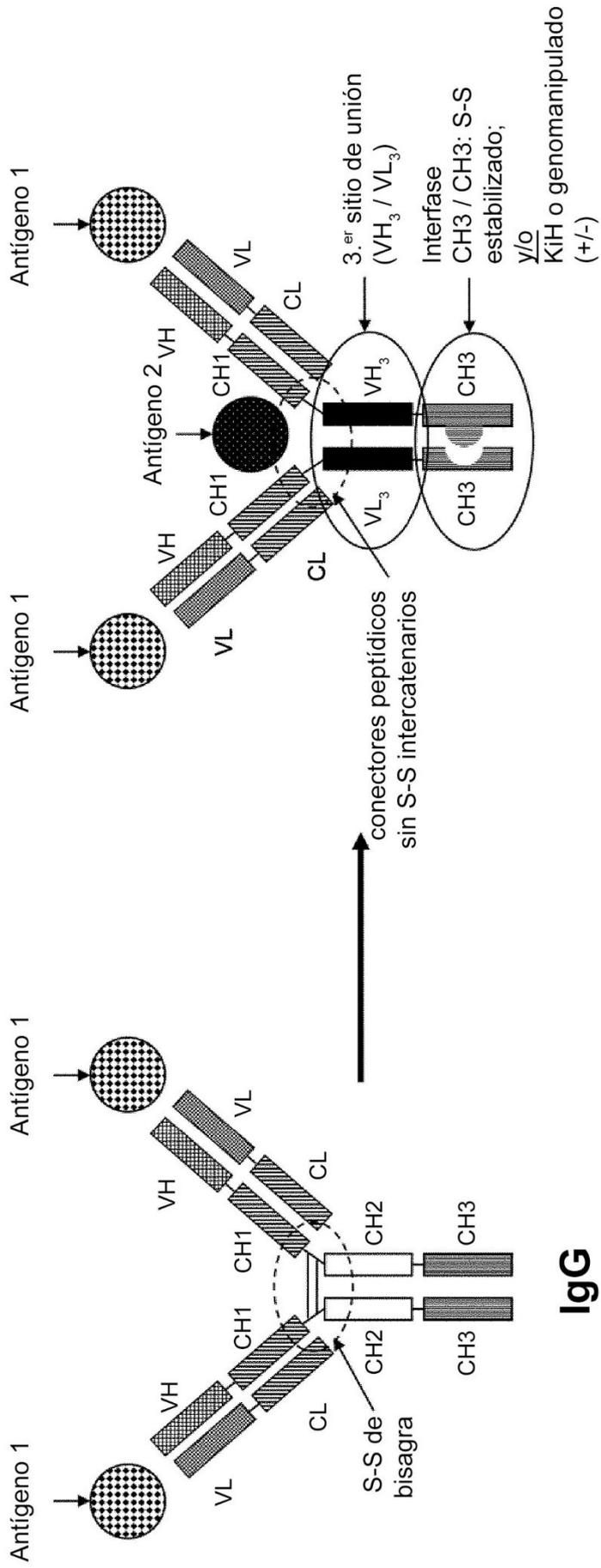


Fig. 2A

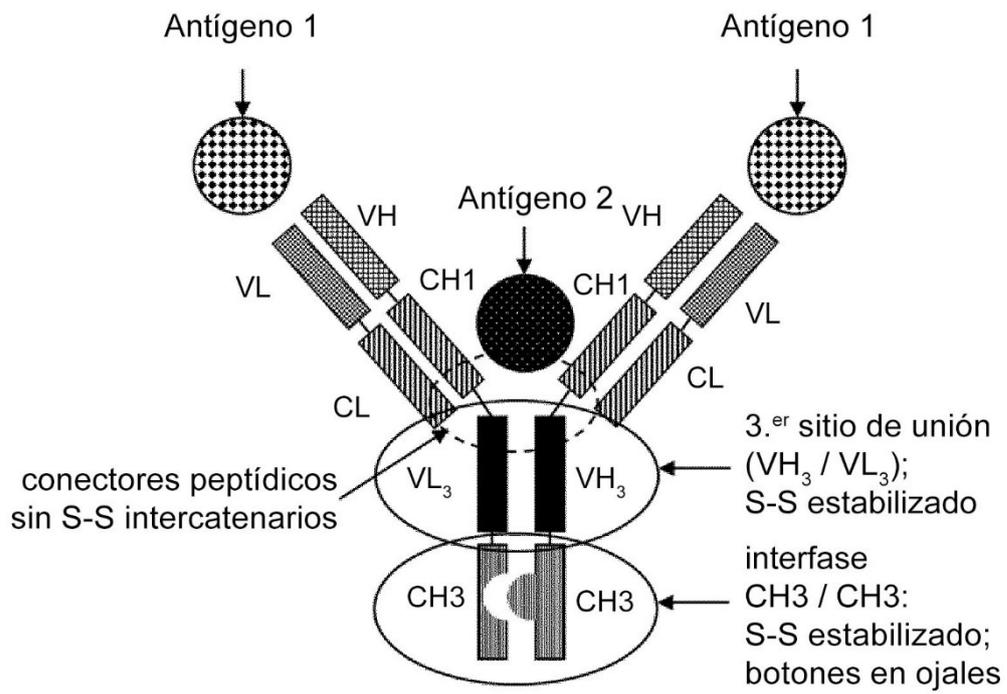


Fig. 2B

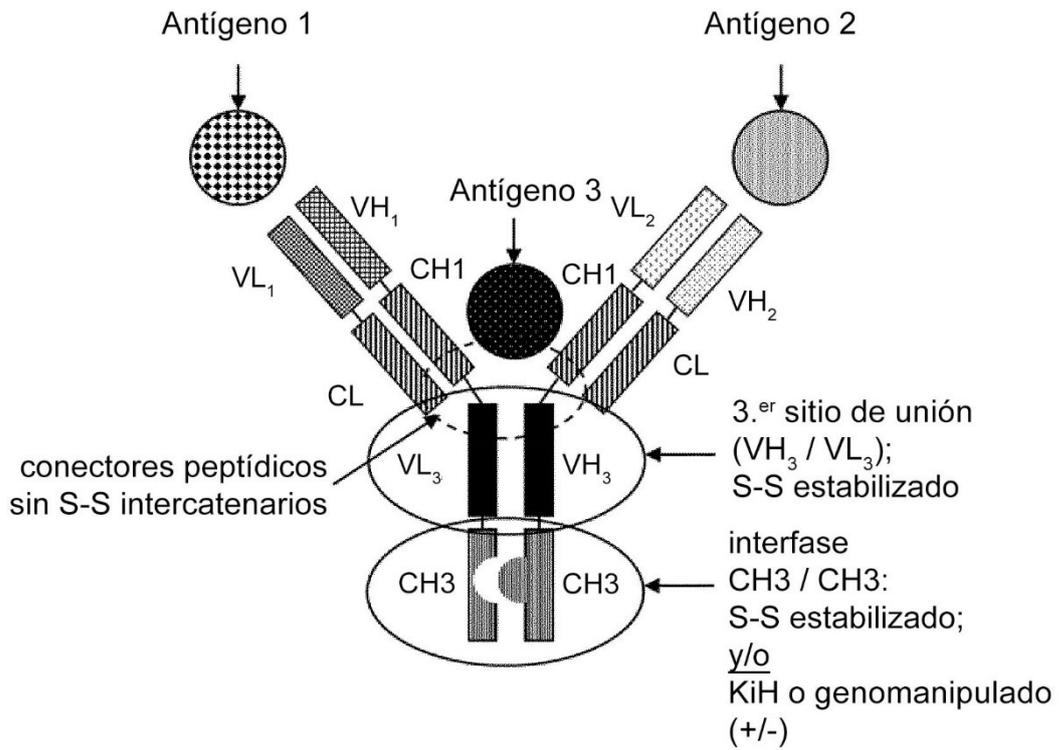


Fig. 3A

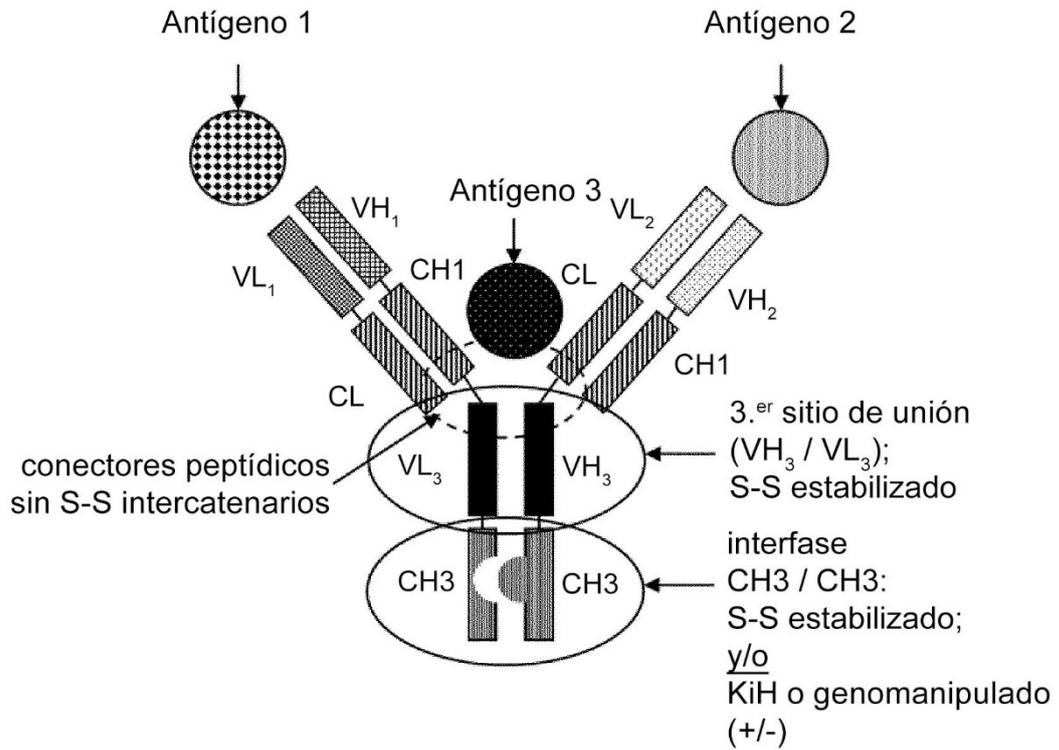


Fig. 3B

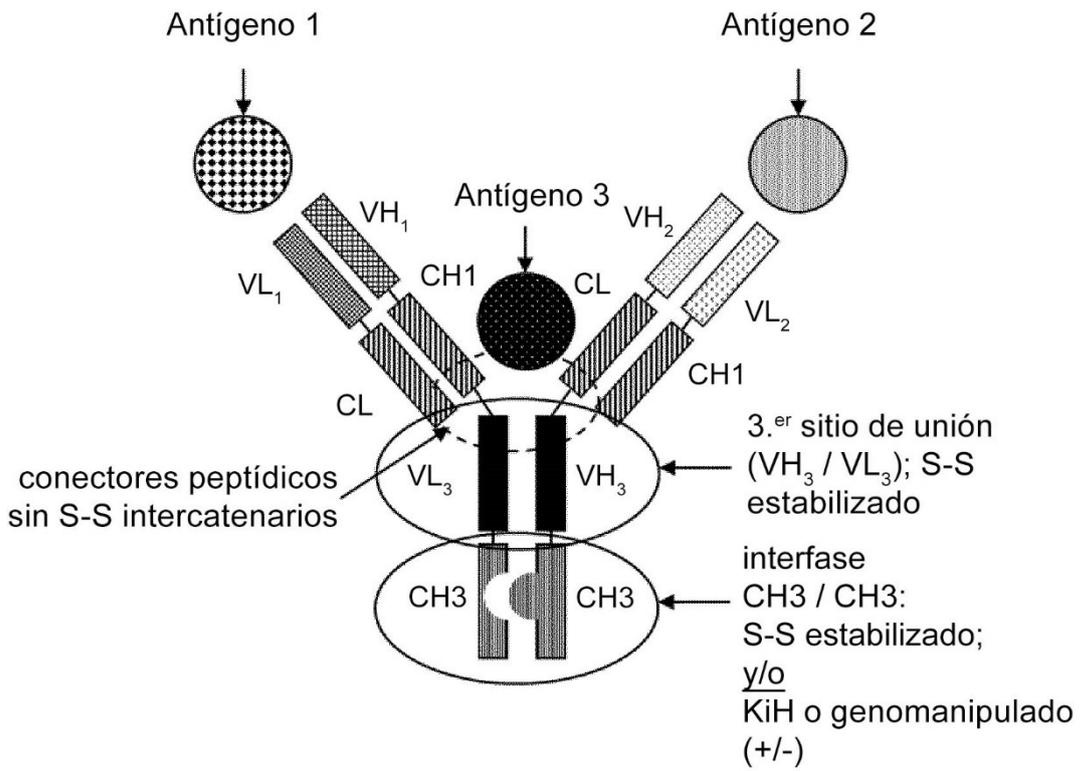


Fig. 3C

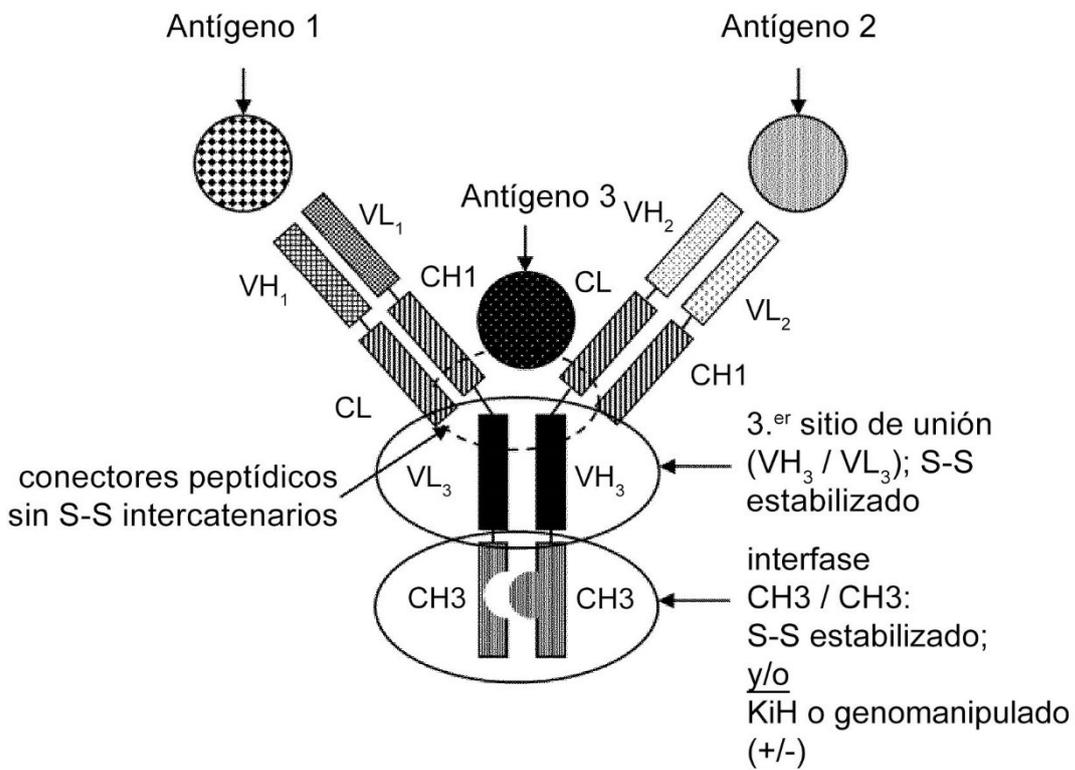


Fig. 3D

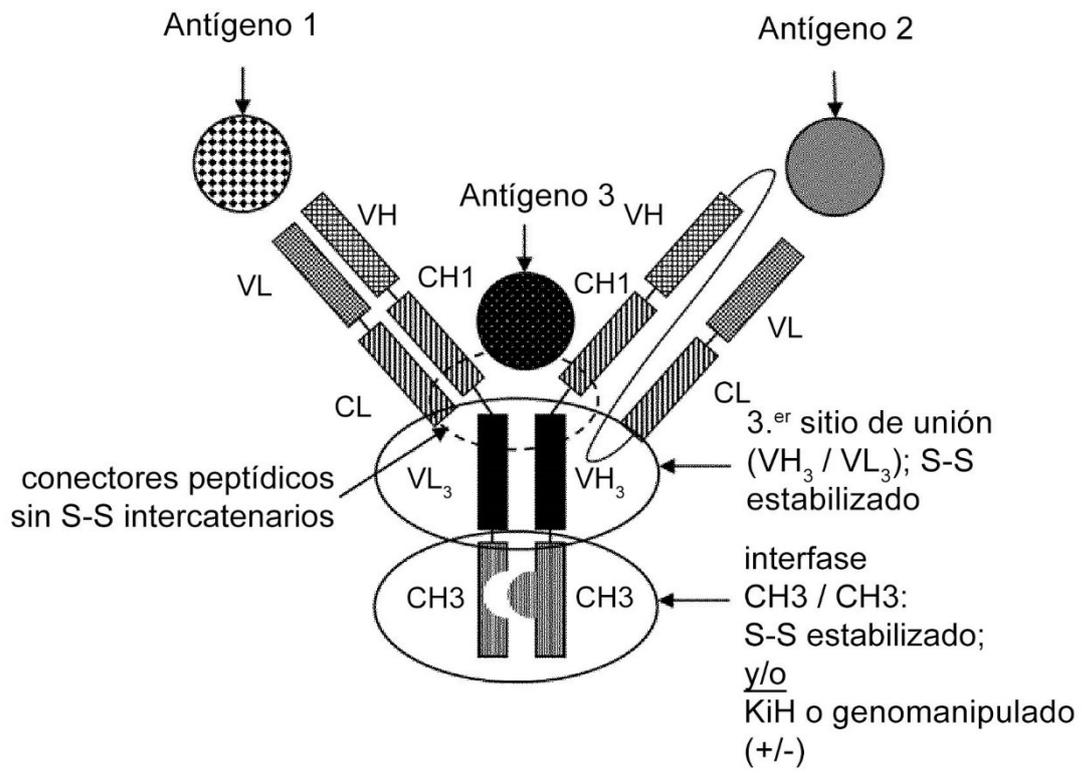


Fig. 3E

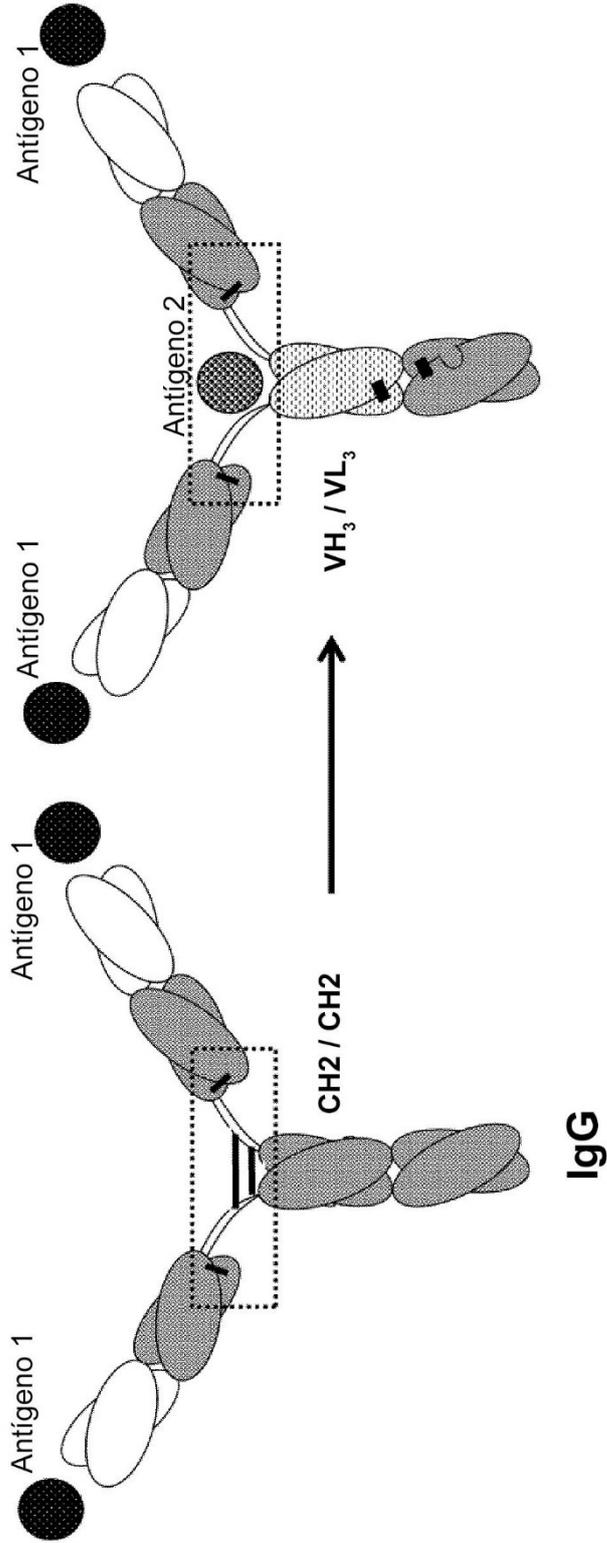


Fig. 4A

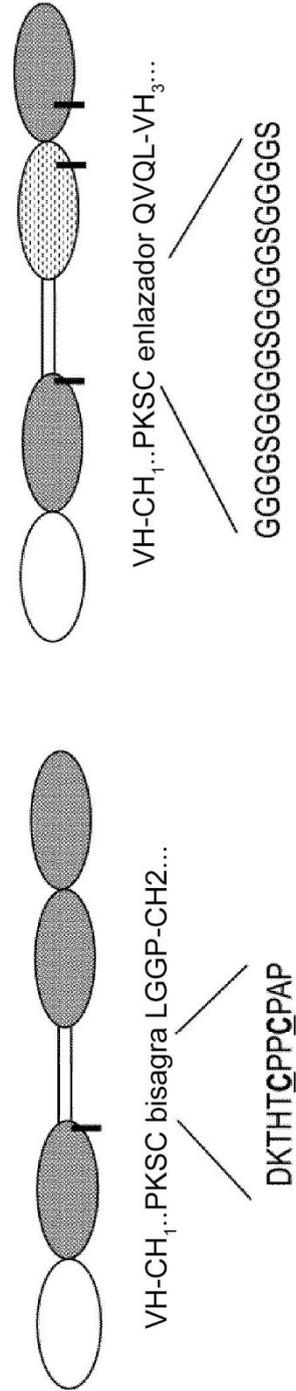


Fig. 4B

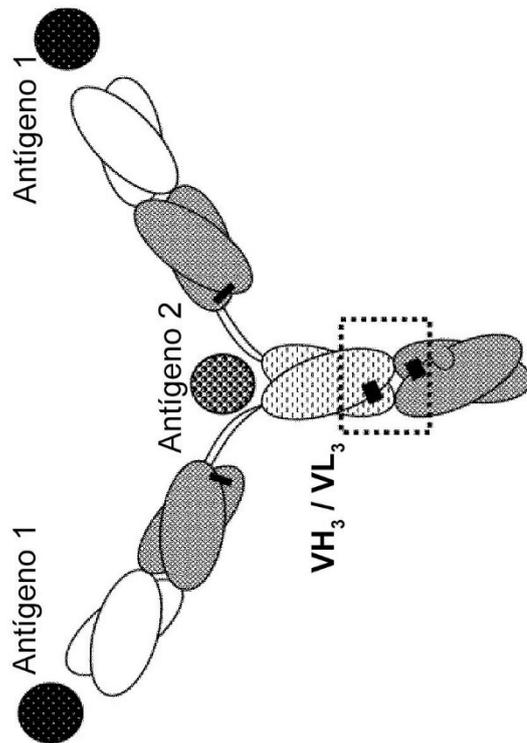
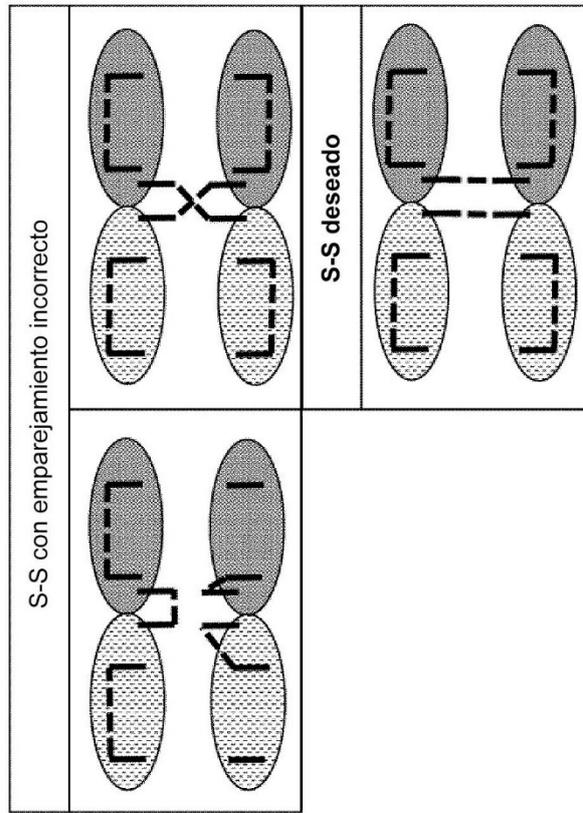


Fig. 5A

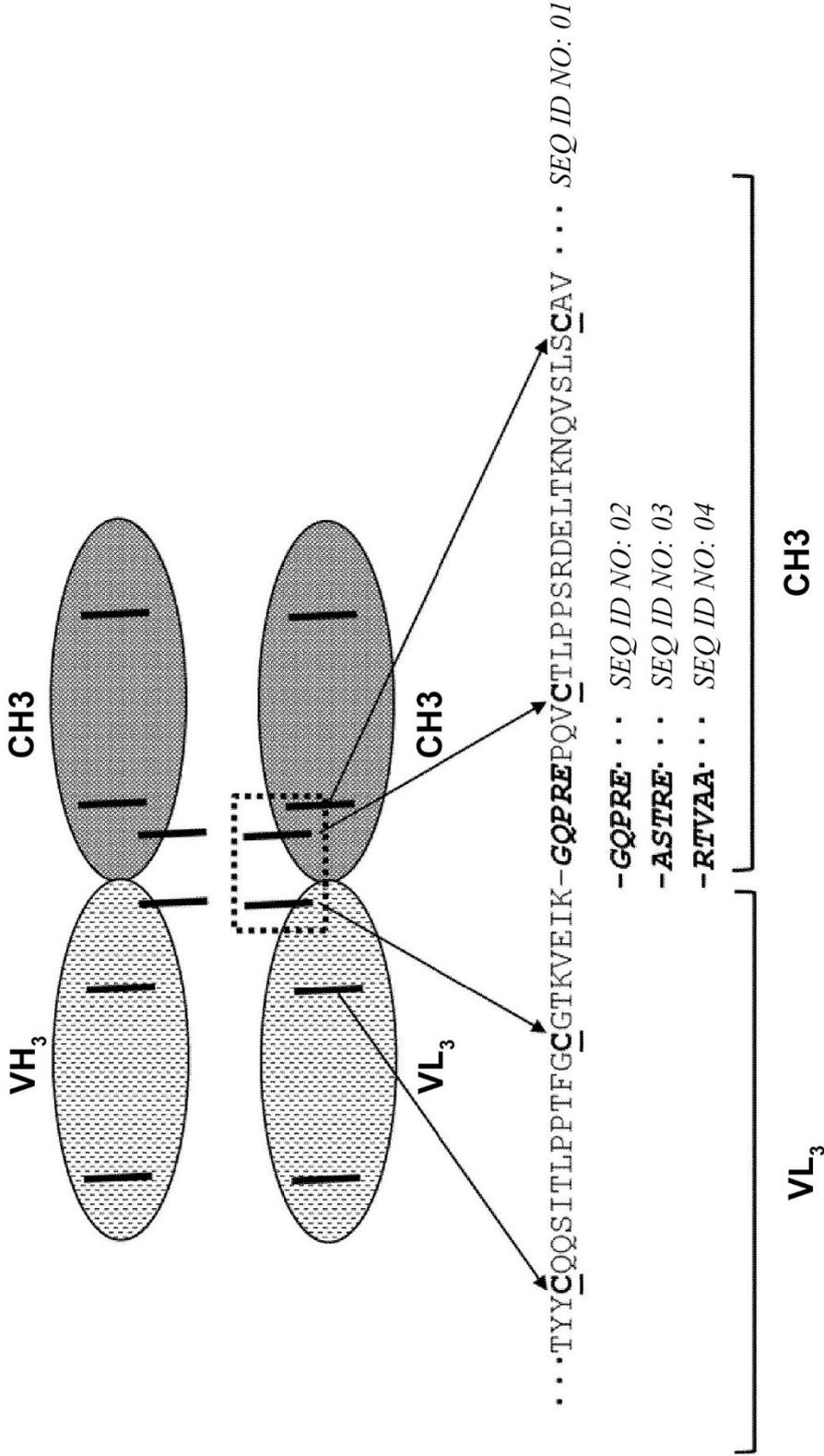


Fig. 5B

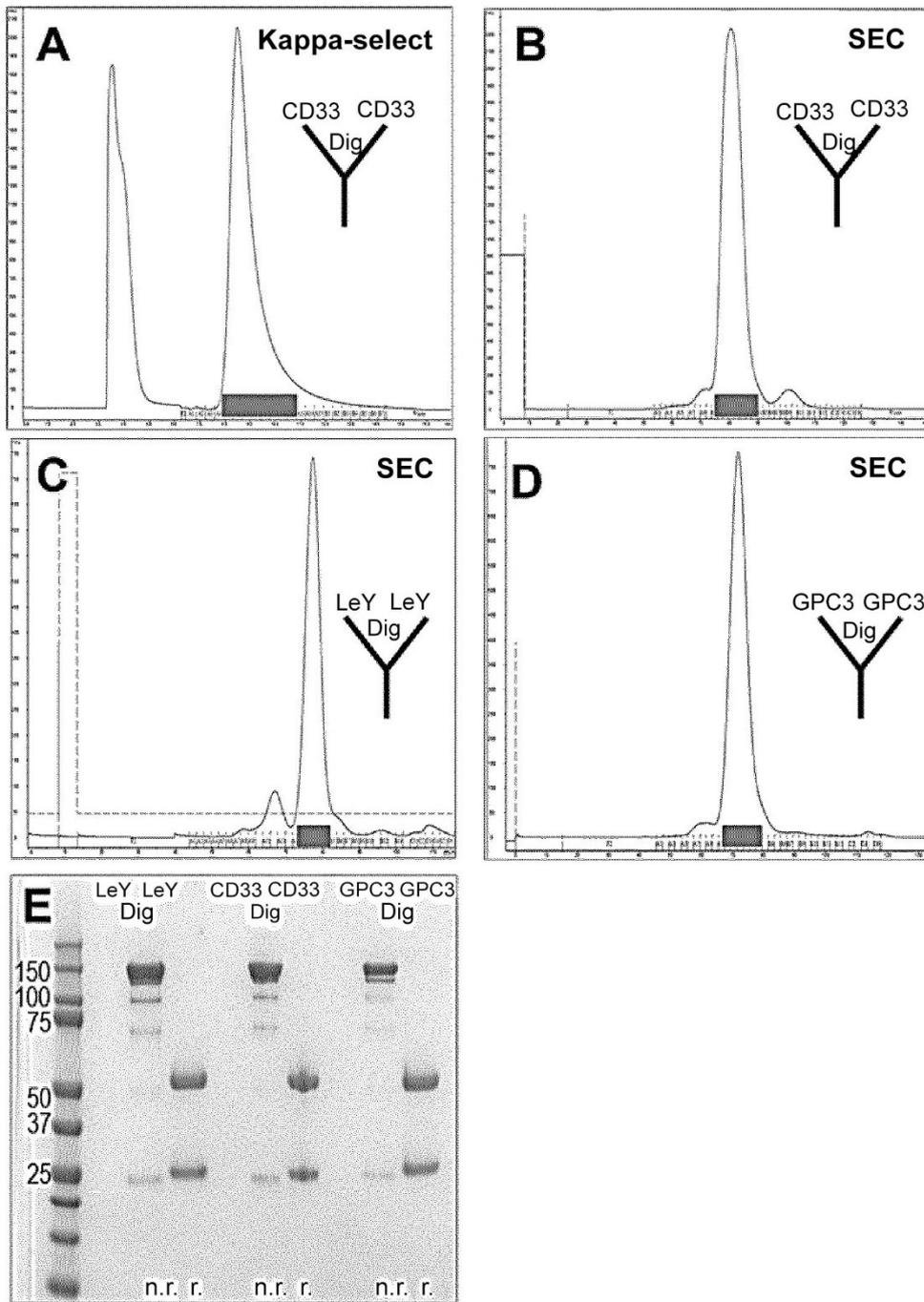


Fig. 6A

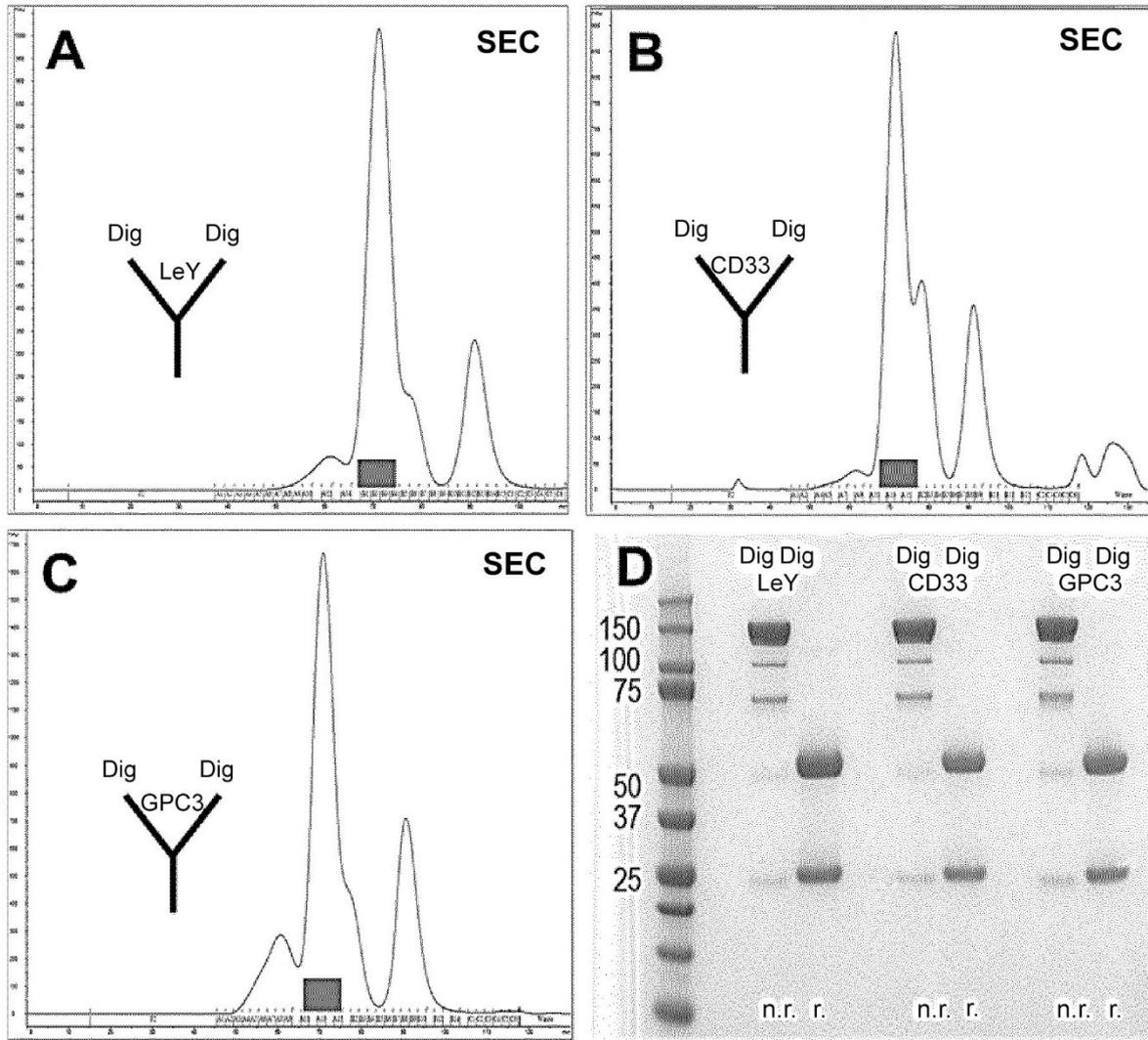


Fig. 6B

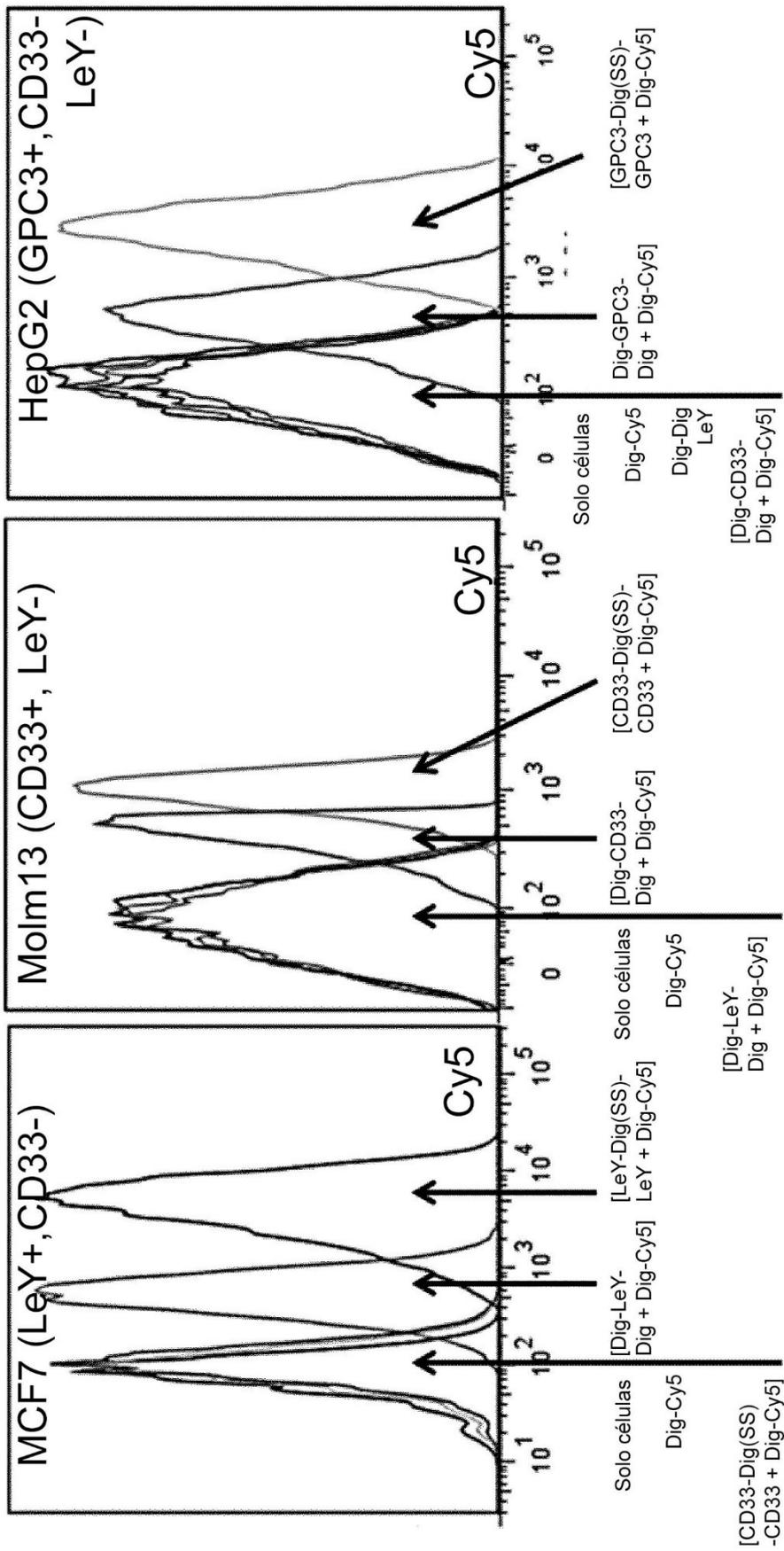


Fig. 7

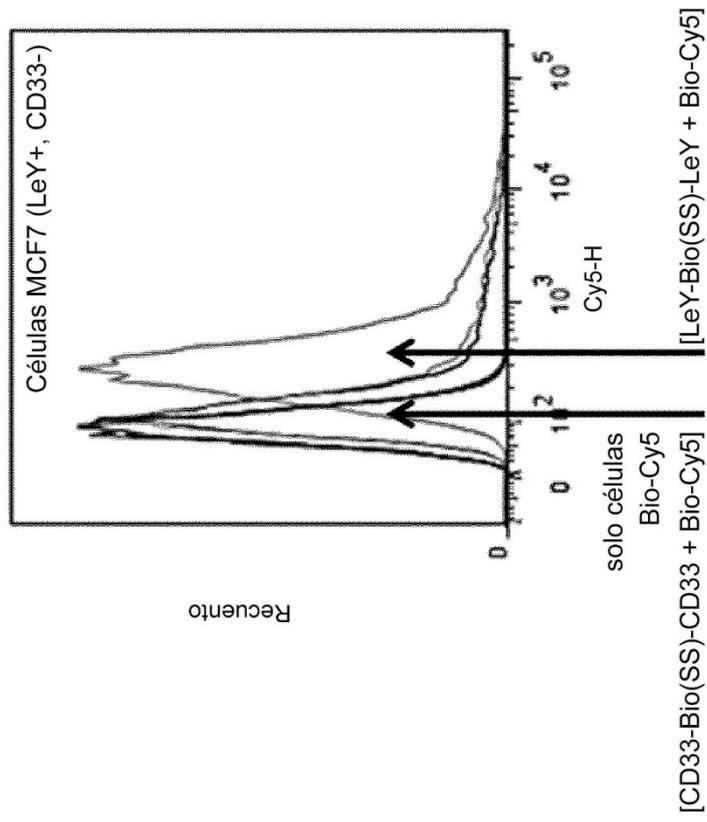


Fig. 8

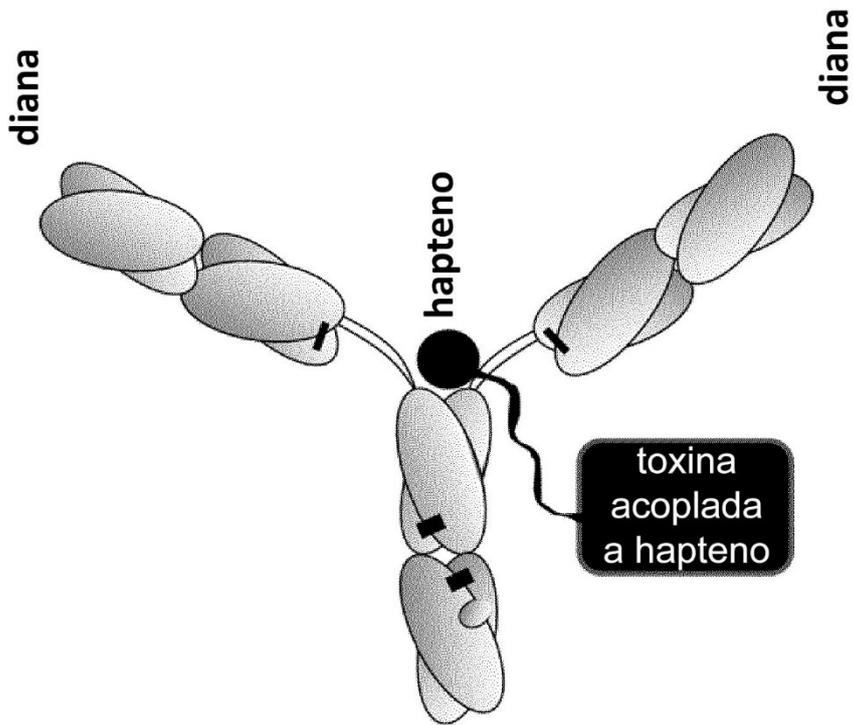


Fig. 9

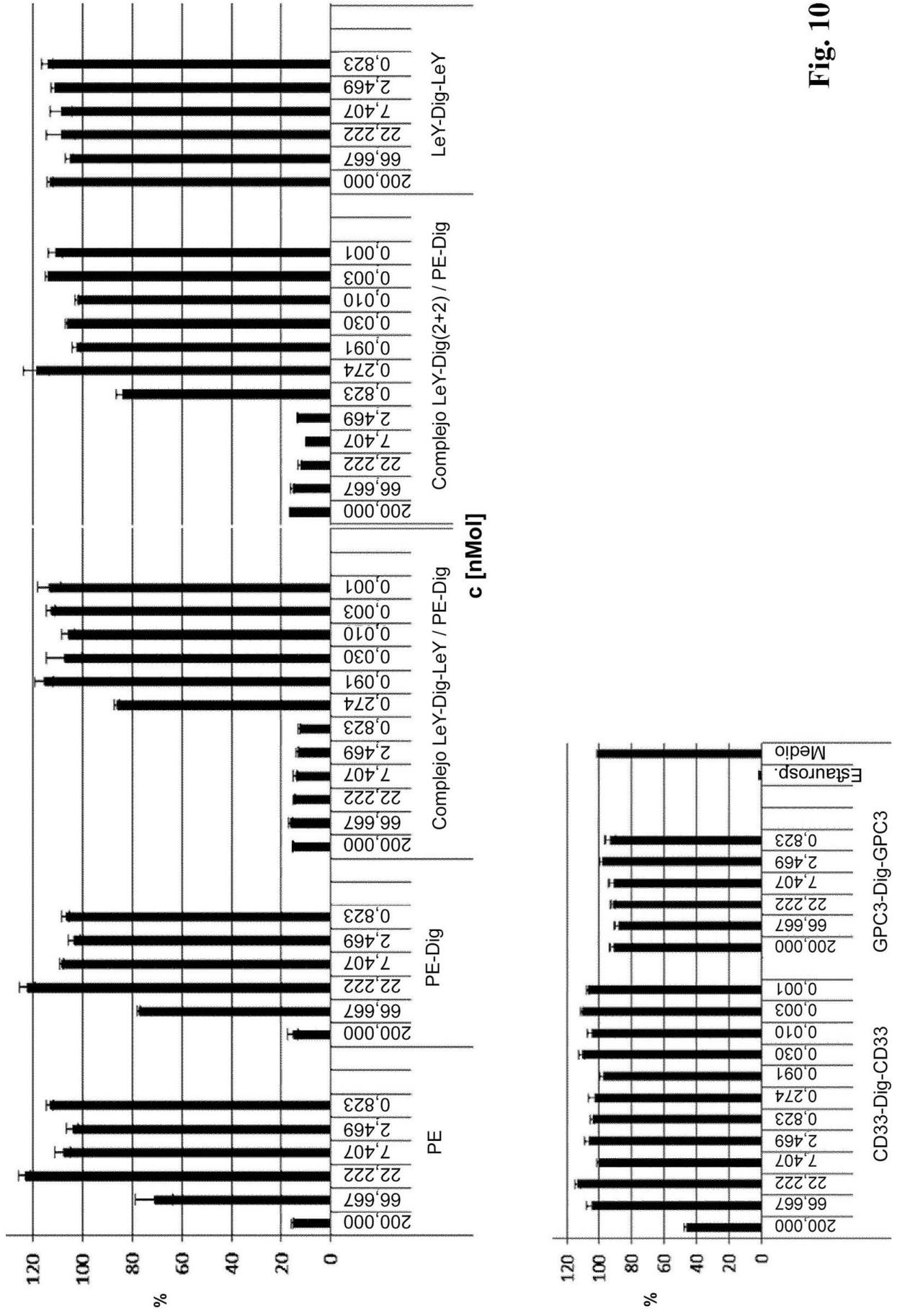


Fig. 10

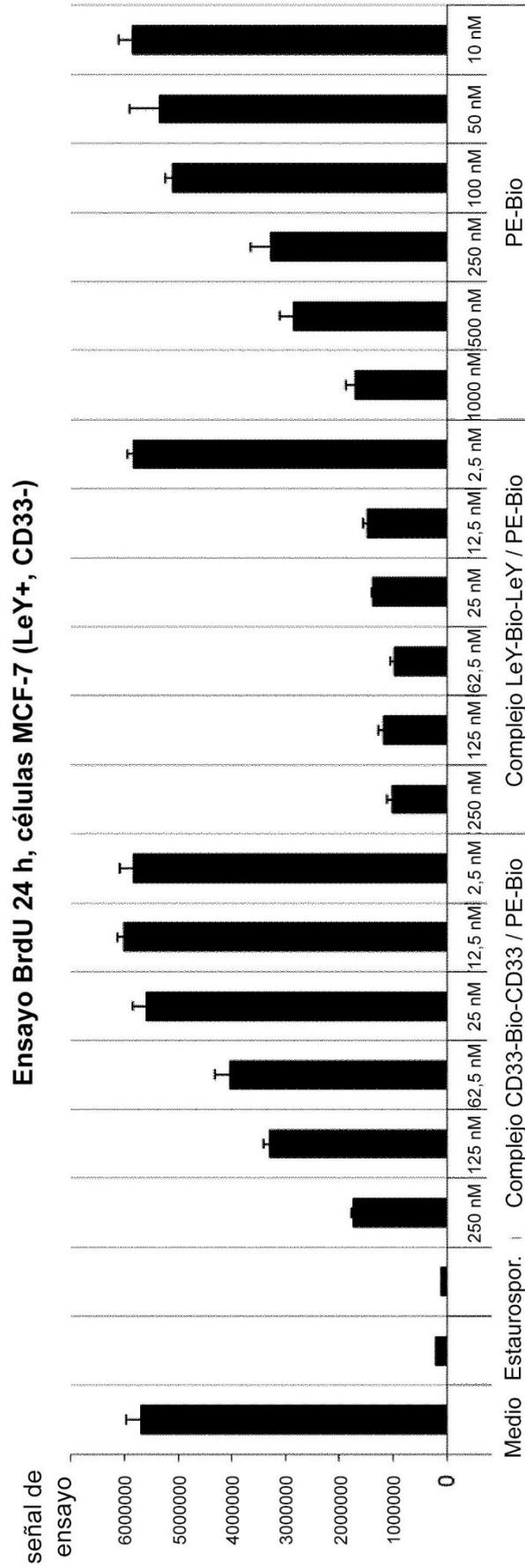


Fig. 11