

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 091**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2006 PCT/EP2006/012425**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2007 WO07071426**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006 E 06841112 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 1976880**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas con resistencia a CEA soluble**

30 Prioridad:

**21.12.2005 EP 05028064**  
**21.12.2005 US 751963 P**  
**10.03.2006 US 780861 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.12.2016**

73 Titular/es:

**AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (100.0%)**  
**Staffelseestrasse 2**  
**81477 München, DE**

72 Inventor/es:

**LUTTERBÜSE, RALF;**  
**MAYER, PETRA;**  
**SCHALLER, EVELYNE;**  
**RAU, DORIS;**  
**MANGOLD, SUSANNE;**  
**KUFER, PETER;**  
**MURR, ALEXANDER;**  
**WISSINGER, MONIKA y**  
**RAUM, TOBIAS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 595 091 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

Composiciones farmacéuticas con resistencia a CEA soluble

Han pasado más de tres décadas desde que Gold y Freedman describieron por primera vez el antígeno carcinoembrionario asociado a tumor (CEA) en extractos tisulares de cáncer de colon humanos (Gold y Freedman; J. Exp. Med. 122 (1965); 467-481).

Entre tanto, se han descubierto otros 28 genes/pseudogenes relativos a la familia de genes CEA. En un intento de simplificar la nomenclatura usada para los miembros de la familia de genes CEA, la familia se ha renombrado recientemente "moléculas de adhesión celular relacionadas con CEA" (CEACAM) y la nomenclatura para sus miembros se ha unificado (Beauchemin, Exp. Cell Res. 252 (1999), 243-249). Por ejemplo, de acuerdo con esta nomenclatura, el CEA humano (CD66e) se llama CEACAM5.

La familia de genes CEA humanos se agrupa en el cromosoma 19q13.2 (Olsen *et al.* Genomics 23 (1994); 659-668). Sus 29 genes y pseudogenes se pueden dividir en tres subgrupos, es decir, el subgrupo CEA que contiene siete genes expresados, el subgrupo de glucoproteínas específicas del embarazo (PSG) que contiene once genes expresados y el tercer subgrupo que solo contiene pseudogenes (Hammarström, Sem. Cancer Biol. 9 (1999), 67-81; Beauchemin, Exp. Cell Res. 252 (1999), 243-249). El análisis de las secuencias de aminoácidos de CEA y los otros miembros de la familia reveló que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) (Williams y Barclay, Annu. Rev. Immunol. 6 (1988), 381-405). Todos los miembros del subgrupo CEA se unen a la membrana de la superficie celular: la glucoproteína biliar (CEACAM1; BGP1; TM-CEA; CD66a), el miembro de la familia de genes CEA 1 (CEACAM3; CGM1; CD66d) y el miembro de la familia de genes CEA 7 (CEACAM4; CGM7) tienen dominios transmembranarios hidrófobos, mientras que el antígeno carcinoembrionario (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5; CEACAM5; CEA; CD66e), el antígeno no específico de reacción cruzada (CEACAM6; NCA; NCA-50/90; CD66c), el miembro de la familia de genes CEA 2 (CEACAM7; CGM2) y el miembro de la familia de genes CEA 6 (CEACAM8; CGM6; CD66b) se unen a la membrana plasmática por restos lipídicos de glucosilfosfatidilinositol (GPI). Las proteínas CEA están altamente glucosiladas con un peso molecular de hasta aproximadamente 300 kDa, dependiendo del número de dominios Ig.

En lo que respecta a la actividad biológica de las proteínas CEA, los estudios *in vitro* con líneas celulares tumorales sugirieron que varias subfamilias CEA incluyendo glucoproteína biliar, CEA y antígeno no específico de reacción cruzada pueden actuar como moléculas de adhesión celular heterotípicas y homofilicas cuando se expresan en la superficie celular del tumor (Oikawa *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 186 (1992), 881-887; Zhou *et al.*, Cancer Res. 53 (1993), 3817-3822). Más recientemente, se ha analizado un posible papel de CEA y antígeno no específico de reacción cruzada en la defensa inmunitaria innata que protege al colon del ataque microbiano (Hammarström y Baranov, Trends Microbiol. 9 (2001), p. 119-125). En particular, se ha propuesto que estas proteínas se unen y atrapan microorganismos evitando que alcancen e invadan las células epiteliales de microvellosidades.

Se planteó la hipótesis de que el CEA es un antígeno oncofetal que se expresa durante el período fetal, ausente en el adulto sano y reexpresado en cáncer. Sin embargo, el CEA también se expresa en el tejido adulto normal. Por ejemplo, la glucoproteína biliar, el CEA, el antígeno no específico de reacción cruzada y el miembro de la familia de genes CEA 2 se expresan en el colon humano normal, en particular en las células epiteliales cilíndricas maduras frente a la luz intestinal y en las células altamente diferenciadas de las criptas orales (Frängsmyr *et al.*, Cancer Res. 55 (1995), 2963-2967; Frängsmyr *et al.*, Tumor Biol. 20 (1999), 277-292). Más específicamente, estas proteínas están ubicadas en el glucocáliz del borde en cepillo de colonocitos maduros que recubren la superficie luminal libre. La glucoproteína biliar, el CEA y el antígeno no específico de reacción cruzada también se expresan en varios tumores de origen epitelial (Hammarström, Sem. Cancer Biol. 9 (1999), 67-81; Shively y Beatty CRC Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2 (1985), 355-399).

Ya a finales de los años 70 y principios de los 80, el CEA se convirtió en un antígeno diana favorecido para la radioinmunolocalización de tumores colorrectales y otros tumores epiteliales. Esto es debido al hecho de que el CEA se sobreexpresa en un 95 % de los cánceres gastrointestinales y pancreáticos, así como en la mayoría de los carcinomas pulmonares microcíticos y no microcíticos. También se expresa en el carcinoma de mama y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Primus *et al.*, Cancer 42 (1978), 1540-1545). De hecho, el CEA es uno de los marcadores tumorales clínicos usados de forma más extensa. Se usa como marcador tumoral sérico para cánceres colorrectales y algunos otros cánceres debido a su estabilidad, su expresión bastante restringida en el tejido adulto normal y su expresión alta en tumores de origen epitelial. La mayor parte del CEA en un individuo sano se produce en el colon. Ahí se libera desde la superficie apical de las células cilíndricas maduras a la luz intestinal y desaparece con las heces. Por tanto, normalmente solo se observan niveles muy bajos en la sangre de individuos sanos. Por ejemplo, los niveles de CEA en la sangre de individuos sanos son de menos de 2 µg/l. Por el contrario, los niveles de CEA en el suero de pacientes con carcinomas colorrectales y otros carcinomas están incrementados, variando hasta más de 2000 µg/l (Thomson *et al.*, PNAS 64 (1969), 161-167). En particular, los tumores epiteliales progresivos, malignos o en estadio tardío están acompañados con frecuencia por concentraciones séricas altas de CEA soluble (Fletcher; Ann. Intern. Med. 104 (1986), 66-73). Se sabe que los componentes de la membrana plasmática, incluyendo el CEA, se exfolian continuamente de la superficie como vesículas derivadas de la membrana

plasmática (Taylor y Black, *J. Natl. Cancer Inst.* 74 (1985), 859-866; Sack *et al.*, *J Clin Invest.* 82 (1988), 586-93) que, a través del drenaje linfático y de los vasos sanguíneos pueden terminar en la sangre. A medida que el tamaño del tumor incrementa, más CEA se acumulará en la sangre. El uso principal de las determinaciones de CEA sérico como marcador tumoral está en la vigilancia posquirúrgica del cáncer de colon. El incremento en los niveles de CEA fue el primer indicador de enfermedad recidivante en un 81 % (Minton *et al.*, *Cancer* 55 (1985), 1284-1290) y 89 % (Wanebo *et al.*, *Surg. Gynecol. Obstet.* 169 (1989), 479-487) de los pacientes, respectivamente. Los niveles de CEA séricos también se pueden usar como indicador de pronóstico (Mulcahy y Benson, *Curr. Oncol. Rep.* 1 (1999), 168-172).

Debido a su sobreexpresión en muchos cánceres epiteliales, el CEA no solo se usa como marcador tumoral sino también como diana para tratamiento antitumoral. Por ejemplo, los cánceres gastrointestinales representan una gran proporción de los tumores epiteliales humanos, con una estimación de 21.700 nuevos casos de cáncer gástrico y 135.400 nuevos casos de cáncer colorrectal en los Estados Unidos en el año 2001 (Greenlee; *CA Cancer J Clin* 51 (2001), 15-36). El cáncer colorrectal es la tercera neoplasia maligna más común y la tercera causa principal de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres (Ries; *Cancer* 88 (2000), 2398-2424). En un intento por encontrar nuevas opciones terapéuticas contra estos tumores, se han explorado los anticuerpos monoclonales anti-CEA como posibles opciones terapéuticas para los cánceres positivos para CEA (Murakami *et al.*, *Immunol. Invest.* 25 (1996), 23-35).

Un ejemplo para un enfoque en el que los pacientes con carga tumoral baja (correspondiente a niveles de CEA séricos bajos) se han tratado con éxito es un estudio realizado por Behr *et al.* En este enfoque, una variante marcada con  $^{131}\text{I}$  de labetuzumab (labetuzumab es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal anti-CEA MN-14; Behr *et al.*, *Cancer*, 94: 1373-1381, (2002), 1559-64) se ha analizado en un ensayo en fase II en el que se han incluido 30 pacientes con CCR con enfermedad metastásica de volumen pequeño quimiorrefractaria a 5-fluorouracilo y ácido folínico o con tratamiento adyuvante después de metástasis hepática. Se suministró una única inyección de labetuzumab marcado con  $^{131}\text{I}$ . De 19 pacientes evaluables, 3 tuvieron una remisión parcial y ocho mostraron respuestas secundarias durante hasta 15 meses. Con tratamiento adyuvante, 7 de 9 pacientes estuvieron sin cáncer durante hasta 3 años, mientras que la tasa de recaída en el grupo de control fue de un 67 % en el mismo período de tiempo. Los niveles de CEA séricos de los pacientes variaron de 3,9 - 45 ng/ml (Behr *et al.*, *Cancer*, 94: 1373-1381, 2002). En otro estudio caracterizado por pacientes con niveles séricos de CEA bajos (<5 ng/ml), se ha demostrado que la radioinmunoterapia de CEA con  $^{131}\text{I}$ -labetuzumab (loc. cit.) mejora la supervivencia posextirpación de rescate de metástasis de cáncer colorrectal en el hígado. 23 pacientes recibieron una dosis de 40-60 mCi/m<sup>2</sup> de  $^{131}\text{I}$ -labetuzumab. La supervivencia en cinco años fue de un 51,3 % para grupos tratados y de un 7,4 % para grupos de control, respectivamente (Liersch *et al.*, *JCO*, 2005, ASCO Proc, Vol 23, n.º 16S: 3627).

Aún, los enfoques terapéuticos que tratan las concentraciones de CEA séricas altas con frecuencia dan como resultado respuestas antitumorales bajas o nulas. Por ejemplo, en un estudio clínico realizado para evaluar un anticuerpo monoclonal anti-CEA humanizado en clínica, una versión injertada con CDR de MN-14 (hMN-14; Sharkey, *Cancer Res.* 55 (23 Supl.) (1995) 5935s-5945s) se ha marcado con  $^{131}\text{I}$ . 19 pacientes con tumores productores de CEA avanzados recibieron hMN-14 marcado con  $^{131}\text{I}$ . La biodistribución, selección tumoral y comportamiento farmacocinético del hMN-14 fue similar al observado con el MN-14 murino. Sin embargo, los pacientes con CEA elevado (> 200 ng/ml) en plasma tuvieron más de un 30 % del anticuerpo marcado complejado en 1 h después de la inyección. En algunos de estos pacientes, el incremento en la complicación dio como resultado una potenciación del metabolismo del anticuerpo con un aclaramiento más rápido de la sangre que el observado en pacientes con menor CEA en plasma (Sharkey, loc. cit.). En otro ensayo en fase I llevado a cabo por Yu *et al.*, un anticuerpo monoclonal murino de alta afinidad marcado con  $^{131}\text{I}$  (mAb) frente a CEA, COL-1 (Muraro, *Cancer Res.* 45 (1985), 5769-80), se ha investigado en pacientes con neoplasias malignas gastrointestinales. En particular, se ha analizado la influencia del CEA sérico y de la masa tumoral sobre la farmacocinética. Para este fin, 18 pacientes con neoplasias malignas gastrointestinales avanzadas recibieron 20 mg de COL-1 marcado con  $^{131}\text{I}$ , con dosis de 10 mCi/m<sup>2</sup> a 75 mCi/m<sup>2</sup>. El nivel de CEA sérico varió de 6 a 2739 ng/ml (media +/- DE, 500 +/- 639). Un 82 % de todos los órganos con afectación tumoral fueron positivos y un 58 % de todas las lesiones. Sin embargo, de nuevo se ha observado que un elevado CEA sérico (> 500 ng/ml) y masa tumoral se correlacionaban directamente con el aclaramiento de la radioactividad sérica. Los autores concluyeron que los pacientes con niveles de CEA en circulación altamente elevados y/o un incremento en la masa tumoral aclararon el COL-1 marcado con  $^{131}\text{I}$  más rápidamente de la circulación (Yu *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14 (1996), 1798-1809). Se han obtenido resultados similares en un estudio por Hajjar *et al.* con anticuerpo monoclonal anti-CEA MN-14 marcado con yodo-131 en pacientes con cáncer colorrectal y gastrointestinal metastásico. En este ensayo en fase I, 21 pacientes después de radioterapia externa previa o bien después de quimioterapia estándar se han tratado con anticuerpo. 7 de 21 pacientes tuvieron anticuerpos humanos anti-humanos (HAAA), pero sin efectos secundarios. No se observó ninguna respuesta antitumoral. De nuevo, se ha descubierto que los niveles de CEA en plasma elevados incrementan el aclaramiento del anticuerpo de la sangre y todo el cuerpo (Hajjar *et al.*, *Clin Colorectal Cancer*, 2 (2002), 31-42), lo que, al menos en parte, puede proporcionar una explicación de la falta de respuesta antitumoral observada en este estudio. El fenómeno de aclaramiento rápido del anticuerpo terapéutico de la sangre y del cuerpo se puede explicar por el incremento en la formación de complejos inmunitarios que han de eliminarse rápidamente del cuerpo para prevenir daño orgánico. No se pudo observar ningún efecto terapéutico en los pacientes con tumores incluidos en estos estudios, debido lo más probablemente al aclaramiento rápido de los anticuerpos monoclonales. Kontermann (2005),

Acta Pharmacologica Sinica Vol. 26, nº. 1, 1-9 describe varios anticuerpos CD3xCEA biespecíficos. El documento EP 491031 proporciona anticuerpos CEA injertados con CDR.

5 Para superar los problemas provocados por la formación de complejos inmunitarios y el aclaramiento rápido de anticuerpos monoclonales terapéuticos que están mediados lo más probablemente por la parte Fc de los anticuerpos reconocidos por los receptores de Fc de células inmunitarias, derivados de anticuerpos (por ejemplo, construcciones de scFv) o fragmentos (por ejemplo, fragmentos Fab y Fab<sub>2</sub>) sin parte Fc se han producido y analizado en la clínica. La mayoría de estos estudios están dirigidos al diagnóstico por imagen y detección/localización de tumores (véase, por ejemplo, Chester *et al.*, Cancer Chemother Pharmacol, 46 (2000) Supl: S8-12; Mayer *et al.*, Clin Cancer Res, 6: (2000) 1711-1719; Begent *et al.*, Nat Med, 2 (1996): 979-984). Solo unos pocos estudios investigaron la eficacia terapéutica de dichos derivados/fragmentos de anticuerpos en la clínica. Por ejemplo, en un enfoque clínico por Francis *et al.* (Francis, Br. J. Cancer 87(6) (2002), 600-607) se ha investigado la actividad anti-tumoral de una construcción de scFv-carboxipeptidasa. En este ensayo en fase I, se ha usado el tratamiento enzimático con profármaco dirigido por anticuerpos (ADEPT) en pacientes con carcinoma colorrectal avanzado u otros tumores productores de CEA. Para este fin, se ha utilizado A5CP, que consiste en un fragmento F(ab)<sub>2</sub> de un anticuerpo monoclonal de ratón para CEA (A5B7) unido a la enzima bacteriana carboxipeptidasa (CPG2) como agente de selección de anticuerpo-enzima y ZD2767P, un profármaco de bis-yodofenol-mostaza. Como resultado, no se han observado respuestas clínicas ni radiológicas en el estudio. Los niveles de CEA séricos de pretratamiento variaron hasta 1000 ng/ml. Estas concentraciones de CEA altas en suero de los pacientes con tumores tratados pueden ser, al menos en parte, responsables de la falta de respuesta antitumoral observada en este estudio.

20 En vista de los problemas expuestos anteriormente, la provisión de medios y procedimientos para una opción terapéutica eficaz para tumores epiteliales progresivos, malignos o en estadio tardío es altamente deseable.

En consecuencia, un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición farmacéutica un anticuerpo monocatenario biespecífico que tiene

(a) un primer dominio de unión que se une específicamente a CD3 humano, y

25 (b) un segundo dominio de unión que se une específicamente a CEA humano,

en el que dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano comprende

(i) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "SYWMH" (SEQ ID NO. 68), una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "FIRNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 67), una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TLRRGINVGAYSIY" (SEQ ID NO. 73), una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos "YKSDSDKQQGS" (SEQ ID NO. 72) y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos "MIWHSGASAV" (SEQ ID NO. 71);

(ii) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "SYWMH" (SEQ ID NO. 68), una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "FILNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 145), una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TLRRGINVGAYSIY" (SEQ ID NO. 73), una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos "YKSDSDKQQGS" (SEQ ID NO. 72) y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos "MIWHSGASAV" (SEQ ID NO. 71); o

(iii) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TYAMH" (SEQ ID NO. 70), una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "LISNDGSNKYYADSVKG" (SEQ ID NO. 69), una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TLRRGINVGAYSIY" (SEQ ID NO. 73), una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos "YKSDSDKQQGS" (SEQ ID NO. 72) y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos "MIWHSGASAV" (SEQ ID NO. 71); y

en el que dicho segundo dominio de unión comprende al menos la secuencia de aminoácidos "DX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>FYFDY" (SEQ ID NO. 65), en la que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" o "X<sub>4</sub>" representa cualquier residuo aminoacídico, y el residuo aminoacídico "D" corresponde a la posición de Kabat 95 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 y los residuos aminoacídicos "FYFDY" corresponden a las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, y 102, respectivamente, de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7. En un modo de realización, "X<sub>1</sub>" representa "R" (arginina), "F" (fenilalanina), "M" (metionina), "E" (ácido glutámico), o "T" (treonina); "X<sub>2</sub>" representa "G" (glicina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), o "S" (serina); "X<sub>3</sub>" representa "L" (leucina), "F" (fenilalanina), "M" (metionina), "E" (ácido glutámico), o "T" (treonina); y "X<sub>4</sub>" representa "R" (arginina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), o "S" (serina).

En un modo de realización de la composición farmacéutica de la invención, dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento comprende al menos la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) correspondiente a las posiciones de Kabat 95 – 102 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7.

55 La presente invención proporciona medios y procedimientos particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes con tumores epiteliales con concentraciones de CEA soluble altas en su plasma. Dichas concentraciones

de CEA soluble altas se encuentran en el suero/plasma de pacientes con tumores epiteliales con tumores progresivos, tumores recidivantes, metastásicos, en estadio tardío y para pacientes con una carga/masa tumoral alta. Se ha descubierto que los anticuerpos monocatenarios biespecíficos con un dominio de unión a CEA que comprende la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) no solo se unen a células diana positivas para CEA, sino también a CEA soluble; véase el ejemplo 3 y la figura 2 de la presente invención; y el documento EP B1 491031. La secuencia de aminoácidos indicada "DRGLRFYFDY" corresponde a las posiciones de Kabat 95 – 102 (SEQ ID NO. 66) de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 (Harwood, Br J Cancer. 54 (1986), 75-82). Sorprendentemente, aunque se unen a CEA soluble, dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos destruyen las células tumorales que llevan CEA, incluso en presencia de concentraciones altas de CEA soluble (se ha sometido a prueba hasta 1 µg/ml de CEA soluble). Dicho de otro modo, dichas construcciones biespecíficas no se inhiben por CEA soluble en su actividad citotóxica contra células tumorales positivas para CEA.

Como se muestra en los siguientes ejemplos 5 y 8 (en combinación con las figuras 5, 6, 8, 10, 19, 20, 22 y 27), los anticuerpos monocatenarios biespecíficos con un dominio de unión a CEA que comprenden la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" mediaron en la citotoxicidad para células tumorales positivas para CEA, incluso en presencia de concentraciones altas de CEA soluble. Por ejemplo, la figura 10 muestra un ensayo de citotoxicidad de construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA redirigidas a células Kato III (línea celular de carcinoma gástrico humano positivas para CEA) en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Los linfocitos T citotóxicos positivos para CD8 humanos estimulados (CTL) se usaron como células efectoras. La citotoxicidad mediada por CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL es resistente a CEA soluble. Por el contrario, la actividad citotóxica mediada por CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL se inhibe por un incremento en las cantidades de CEA soluble. CEAI es una región variable derivada del mAb murino A5B7, mientras que CEAI VHVL se deriva del mAb T84.66.

De forma importante, se ha descubierto que la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" es suficiente para mediar la resistencia a CEA soluble cuando se usa en un dominio de unión a CEA humano (es decir, un dominio de unión humano que se une específicamente a CEA humano) de anticuerpos monocatenarios biespecíficos anti-CEA anti-CD3; véanse, por ejemplo, las figuras 19, 20, 22 y 27.

A continuación, anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define en el presente documento se refieren por tanto a que son resistentes al antígeno CEA soluble. El término "resistencia al antígeno CEA soluble", "resistente a CEA soluble" o términos relacionados como se usa en el presente documento se refiere al hecho de que la citotoxicidad frente a células tumorales o células diana positivas para CEA mediadas por dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos no se ve afectada por el incremento en las concentraciones de CEA soluble. En particular, la actividad citotóxica no se inhibe incluso por concentraciones altas de CEA soluble (se ha sometido a prueba hasta 1 µg/ml). Como se ha expuesto anteriormente, los niveles de CEA en la sangre de individuos sanos son de menos de 2 ng/ml. Las concentraciones de CEA soluble altas en el suero/plasma de pacientes con tumores son características para tumores progresivos, recidivantes, metastásicos o en estadio tardío y para pacientes con carga tumoral alta. Por tanto, la presente invención proporciona medios y procedimientos particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes con tumores epiteliales con dichas concentraciones de CEA soluble altas en su plasma. El término "concentraciones de CEA soluble altas" como se usa en el presente documento indica una concentración de CEA en suero/plasma soluble mayor de 10, 20, 50, 70, 80, 90 o 100 ng/ml. Esta concentración de CEA en suero/plasma se puede determinar, *inter alia*, por ELISA. Preferentemente, dicha concentración de CEA en suero/plasma es mayor de 100 ng/ml, como se determina, por ejemplo, por ELISA.

La generación de dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos con resistencia a antígeno CEA soluble no fue una tarea trivial, como resulta evidente a partir de los siguientes ejemplos. Por ejemplo, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos con un dominio de unión a CEA derivado de un anticuerpo monoclonal (mAb) conocido por unirse a CEA unido a membrana pero no a CEA soluble, es decir, mAb PR1A3 (Durbin, Proc Natl Acad Sci U S A. 91 (1994), 4313-7), no se pudieron producir: cuando se usó en el formato de anticuerpo monocatenario biespecífico, no se pudo lograr ninguna expresión/secréción de la construcción monocatenaria biespecífica anti-CD3xanti-CEA. Cuando se ha utilizado una versión humanizada de PR1A3 (Durbin, loc. cit.) para la generación, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se expresó y se secretó de la célula huésped. Sin embargo, no se pudo obtener ninguna unión de dominio de unión anti-CEA a CEA unido a membrana.

Cuando se han generado anticuerpos monocatenarios biespecíficos derivados de los anticuerpos monoclonales bien descritos T84.66 (Neumaier, M. *et al.*, Cancer Res 50 (1990), 2128-34) o MFE-23 (Boehm, M. K. Biochem J 2 (2000), 519-28), estos anticuerpos biespecíficos fueron altamente sensibles al antígeno CEA soluble, es decir, su actividad citotóxica frente a células tumorales o células diana positivas para CEA se han bloqueado en presencia de antígeno CEA soluble. Puesto que se ha descubierto que dichas construcciones se unen a CEA soluble, se concluyó que el antígeno CEA soluble evita que el anticuerpo se una a CEA unido a membrana, bloqueando de este modo la actividad citotóxica mediada por anticuerpo. Por ejemplo, la figura 7 muestra un ensayo de citotoxicidad de una construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA redirigida a células CHO transfectadas con CEA en presencia de CEA humano soluble. Los linfocitos T citotóxicos positivos para CD8 humanos estimulados (CTL) se usaron como células efectoras. La actividad citotóxica de CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL se inhibe claramente incrementando las cantidades de CEA soluble. CEAI VHVL se deriva de mAb T84.66; la SEQ ID NO.77 es un dominio anti-CD3 VH-VL.

La resistencia a antígeno CEA soluble solo se puede encontrar para anticuerpos monocatenarios biespecíficos, cuyo dominio de unión a CEA comprendía la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 (Harwood, Br J Cancer. 54 (1986), 75-82). Al igual que para construcciones monocatenarias biespecíficas derivadas de MFE-23 y T84.66, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos derivados de A5B7 se unen a CEA soluble. En vista de los resultados obtenidos para las construcciones monocatenarias biespecíficas derivadas de MFE-23 y T84.66, no se podía esperar que el CEA soluble no influyera en la actividad citotóxica en construcciones de anticuerpos biespecíficos monocatenarios derivados de A5B7.

Como se ha expuesto anteriormente, muchos enfoques terapéuticos dirigidos frente a tumores epiteliales que llevan CEA en seres humanos están impedidos seriamente por la presencia de niveles altos de antígeno CEA soluble en el plasma de pacientes con cáncer. Por ejemplo, un incremento en la formación de complejos inmunitarios y el aclaramiento de anticuerpos monoclonales anti-CEA terapéuticos en presencia de concentraciones de CEA altas en plasma se ha observado en varios estudios clínicos. Además, el antígeno CEA soluble (con frecuencia presente en concentraciones altas en el suero de pacientes con cáncer con tumores progresivos, cáncer recidivante, tumores metastásicos, carga/masa tumoral alta o tumores en estadio tardío) bloquea la opción terapéutica dirigida contra células tumorales positivas para CEA, evitando por tanto el reconocimiento y la destrucción de células tumorales. Por lo tanto, la cantidad real de la opción terapéutica que alcanza el tumor se reduce, dando como resultado una actividad antitumoral disminuida, baja o incluso nula. Esta limitación restringe hasta ahora, por ejemplo, los enfoques basados en anticuerpos a los pacientes con cantidades muy bajas de antígeno CEA soluble con pocas probabilidades de prevenir una interacción de las células tumorales con opción terapéutica.

En la presente invención, se ha descubierto que es posible generar una opción terapéutica con anticuerpos monocatenarios biespecíficos con especificidad por CD3 humano y CEA humano, en la que la actividad citotóxica dirigida contra células tumorales es resistente incluso a concentraciones altas de antígeno CEA soluble (se ha sometido a prueba hasta 1µg/ml de CEA soluble). Este hallazgo es totalmente inesperado en vista del hecho de que los anticuerpos monocatenarios biespecíficos de la invención se unen al antígeno CEA soluble (véanse el ejemplo 3 y la figura 2 de la presente invención; véase también el documento EP B1 491031). No obstante, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en el presente documento son totalmente resistentes a la presencia incluso de niveles altos de CEA soluble en su actividad citotóxica hacia células tumorales. Por tanto, la presente invención proporciona medios y procedimientos particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes con tumores con concentraciones de CEA soluble altas en su plasma, como se observa, por ejemplo, durante la progresión tumoral, para cáncer recidivante, para metástasis, para pacientes con carga/masa tumoral alta, o tumores en estadio tardío.

De acuerdo con la presente invención, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición para su administración a un paciente humano. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende formulaciones adecuadas de vehículos, estabilizantes y/o excipientes. En un modo de realización preferente, la composición farmacéutica comprende una composición para su administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal y/o intranasal o por inyección directa en el tejido. Se prevé en particular que dicha composición se administre a un paciente por medio de infusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar por diferentes maneras, por ejemplo, por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La composición de la presente invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, liposomas, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada que se puede determinar, por ejemplo, por estudios de aumento gradual de la dosis por administración de dosis crecientes del anticuerpo monocatenario biespecífico que presenta resistencia a antígeno CEA soluble sérico descrito en el presente documento. Como se ha expuesto anteriormente, el anticuerpo monocatenario biespecífico descrito en el presente documento con resistencia a antígeno CEA soluble sérico se puede usar ventajosamente en el tratamiento de pacientes con cáncer con concentraciones séricas de CEA altas, tales como tumores progresivos, cáncer recidivante, tumores metastásicos, carga/masa tumoral alta, o tumores en estadio tardío. Estas composiciones también se pueden administrar en combinación con otros fármacos proteínicos y no proteínicos, por ejemplo, en forma de un cotratamiento. Estos fármacos se pueden administrar simultáneamente con la composición que comprende el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento o por separado antes o después de la administración de dicho anticuerpo biespecífico en intervalos y dosis oportunamente definidos. El régimen de dosificación se determinará por el médico especialista y por factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, y suspensiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, suspensiones o soluciones acuosas, incluyendo medios tamponados y solución salina. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, o Ringer con lactato. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los

basados en la dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antibióticos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Además, la composición de la presente invención puede comprender vehículos proteínicos, como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferentemente de origen humano. Se prevé que el cotratamiento comprenda, además del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento, otros agentes biológicamente activos, dependiendo del uso destinado de la composición. Dichos agentes pueden ser fármacos que actúan sobre el aparato digestivo, fármacos que actúan como agentes antineoplásicos, agentes quimioterápicos, agentes citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben inmunorreacciones (por ejemplo, corticoesteroides), fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan sobre el aparato circulatorio y/o agentes tales como citocinas, conocidos en la técnica.

Preferentemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento se formula en un tampón, un estabilizante y un tensioactivo. El tampón puede ser un tampón fosfato, citrato, succinato o acetato. El estabilizante puede ser (un) aminoácido(s) y/o un azúcar. Los tensioactivos pueden ser detergentes, PEG, o similares. Más preferentemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento se formula en citrato, lisina, trehalosa y Tween 80. Como diluyente para la composición farmacéutica de la invención, es preferente solución salina isotónica y Tween 80.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo monocatenario biespecífico" indica una única cadena polipeptídica que comprende dos dominios de unión. Cada "dominio de unión" como se usa en el presente documento comprende una región variable de una cadena pesada de anticuerpo ("región VH"), en la que la región VH del primer dominio de unión se une específicamente a dicha primera molécula, es decir, la molécula de CD3 humano, y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente al CEA humano, como se define con más detalle a continuación. Los dos dominios de unión se unen opcionalmente entre sí por un espaciador polipeptídico corto que comprende, en general, del orden de 5 aminoácidos. Cada dominio de unión puede comprender adicionalmente una región variable de una cadena ligera de anticuerpo ("región VL"), uniéndose la región VH y la región VL dentro de cada uno de los dominios de unión primero y segundo entre sí por medio de un enlazador polipeptídico, por ejemplo del tipo divulgado y reivindicado en el documento EP B1 623679, pero en cualquier caso, lo suficientemente largo para permitir que la región VH y la región VL del primer dominio de unión y la región VH y la región VL del segundo dominio de unión se emparejen entre sí de modo que, juntas, puedan unirse específicamente a las respectivas moléculas primera y segunda. La disposición de las regiones V del dominio de unión primero y segundo puede ser VH-VL o VL-VH. Preferentemente, la disposición del primer dominio de unión que se une específicamente a CD3 humano es VH-VL, como se muestra en los siguientes ejemplos. Se prevé que el primer dominio de unión pueda estar situado de forma N-terminal o de forma C-terminal en el segundo dominio de unión. Por tanto, la disposición de los dominios de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento puede ser  $VH_{CEA}-VL_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ ,  $VL_{CEA}-VH_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ ,  $VH_{CD3}-VL_{CD3}-VH_{CEA}-VL_{CEA}$  o  $VH_{CD3}-VL_{CD3}-VL_{CEA}-VH_{CEA}$ . Preferentemente, dicho primer dominio de unión específico para CD3 está situado de forma C-terminal en el segundo dominio de unión. Más preferentemente, los dominios de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento están dispuestos en el orden  $VH_{CEA}-VL_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$  o  $VL_{CEA}-VH_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ . Incluso más preferente, la disposición es  $VL_{CEA}-VH_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ . Lo más preferente es la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico A240 VL-B9 VHxSEQ ID 25 NO. 77 VHVL como se define en SEQ ID NO. 34. Se prevé que dichos dominios de unión primero y/o segundo de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento puedan ser de origen no humano (es decir, derivados de secuencias no humanas). Por ejemplo, dichos dominios de unión primero y/o segundo se pueden derivar de anticuerpos monoclonales murinos. Sin embargo, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos derivados de anticuerpos murinos se pueden reconocer como exógenos, cuando se administran a pacientes humanos. Por tanto, dichos dominios de unión primero y/o segundo de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento son preferentemente de origen humano (es decir, derivados de secuencias humanas). Dichos dominios de unión humanos se unen específicamente a CEA o CD3 se pueden identificar, por ejemplo, por técnicas basadas en presentación en fagos. También se prevé que, por ejemplo, la región VH del primer (o segundo) dominio de unión sea una región VH humana, mientras que la correspondiente región VL del primer (o segundo) dominio de unión pueda ser de origen no humano. Dichos dominios de unión también se pueden denominar dominios de unión quiméricos. O uno de dichos dominios de unión es de origen no humano, mientras que el otro es de origen humano, dando como resultado un anticuerpo monocatenario biespecífico quimérico. Dichos dominios de unión primero y/o segundo se pueden modificar adicionalmente para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo monocatenario biespecífico descrito en el presente documento, cuando se administra a pacientes humanos. Por ejemplo, al menos uno de dichos dominios de unión primero o segundo de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento puede ser humanizado, injertado con CDR, quimérico y/o desinmunizado o humano, como se expone con más detalle a continuación. También se prevé que el enlazador polipeptídico que une la región VH y VL dentro del dominio de unión primero y/o segundo sea desinmunizado. Preferentemente, el enlazador polipeptídico que une la región VH y VL dentro del primer dominio de unión desinmunizado (específico para CD3) es un enlazador polipeptídico desinmunizado que tiene la secuencia "GEGTSTGS(G2S)2GGAD" (SEQ ID NO. 141). Además, se prevé que uno o ambos de dichos dominios de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento lleven las denominadas "marcas" que se pueden usar, por ejemplo, para expresión, purificación, detección o enriquecimiento de proteínas, tales como marcas Flag, marcas c-myc, marcas GST o marcas His. Por ejemplo, para la marca Flag, el octapéptido hidrófilo

usando más ampliamente ahora es DYKDDDDK (Chubet y Brizzard, *Biotechniques* 20 (1996): 136-141) aunque estudios recientes sugieren que un péptido más corto, DYKD, se puede reconocer casi con la misma afinidad por el anticuerpo monoclonal M1 (Knappik A, Pluckthun A; *Biotechniques* 17 (1994):754-761). Las marcas Flag, marcas c-myc, marcas GST, marcas His o similares pueden estar dispuestas en el extremo N-terminal o bien en el extremo C-terminal de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos tales como, por ejemplo, marca-VH<sub>CEA</sub>-VL<sub>CEA</sub>-VH<sub>CD3</sub>-VL<sub>CD3</sub> o VL<sub>CEA</sub>-VH<sub>CEA</sub>-VH<sub>CD3</sub>-VL<sub>CD3</sub>-marca. Las fuentes para y las propiedades de dichas marcas con propósitos de expresión, detección o purificación están bien descritas en la técnica; véase, por ejemplo, Lichty, *Protein Expr Purif.* 41 (2005), 98-105.

Como se usa en el presente documento, el término "Fv monocatenario" o "scFv" se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Los dominios variables pueden estar dispuestos en el orden VH-VL o VL-VH. En general, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). En un modo de realización específico, la invención se refiere a scFv anti-CEA derivados de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento.

De acuerdo con la presente invención, el término "dominio de unión" o "región variable" usado en el contexto con la interacción con antígeno derivado de Ig comprende fragmentos y derivados de polipéptidos que al menos comprenden una CDR derivada de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado del mismo. Se prevé por la invención, que el segundo dominio de unión que se une específicamente a CEA humano del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento comprenda al menos una CDR, preferentemente una CDR-H3, más preferentemente una parte de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 con la secuencia de aminoácidos "FYFDY" (SEQ ID NO. 112) correspondiente a las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, y 102, respectivamente, de CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7; incluso más preferente con la secuencia de aminoácidos "DX1X2X3X4FYFDY" (SEQ ID NO. 65), en la que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" o "X<sub>4</sub>" representa cualquier residuo aminoacídico, y el residuo aminoacídico "D" corresponde a la posición de Kabat 95 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 y los residuos aminoacídicos "FYFDY" corresponden a las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, y 102, respectivamente, de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7. Se prevé que "x<sub>1</sub>" "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" o "X<sub>4</sub>" correspondiente a las posiciones de Kabat 96 ("X<sub>1</sub>"), 97 ("X<sub>2</sub>"), 98 ("X<sub>3</sub>") y 99 ("X<sub>4</sub>"), respectivamente, de CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7, representen el residuo aminoacídico "R" (arginina), "G" (glicina), "L" (leucina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), "S" (serina), "W" (triptófano), "F" (fenilalanina) o "T" (treonina). En el presente documento, se excluye del alcance de la invención que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" y "X<sub>4</sub>" representen el mismo aminoácido, por ejemplo, que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" y "X<sub>4</sub>" sean todos "F" (fenilalanina). Preferentemente, "X<sub>1</sub>" representa "R" (arginina), "F" (fenilalanina), "M" (metionina), "E" (ácido glutámico), o "T" (treonina); "X<sub>2</sub>" representa "G" (glicina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), o "S" (serina); "X<sub>3</sub>" representa "L" (leucina), "F" (fenilalanina), "M" (metionina), "E" (ácido glutámico), o "T" (treonina); y "X<sub>4</sub>" representa "R" (arginina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), o "S" (serina). O lo más preferente, el segundo dominio de unión que se une específicamente a CEA humano del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento comprende la CDR-H3 completa de A5B7 con la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) correspondiente a las posiciones de Kabat 95 – 102 de la CDR-H3 de A5B7. Como se muestra en los siguientes ejemplos, la actividad citotóxica frente a células tumorales del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento que comprende dicha secuencia de aminoácidos de CDR-H3 derivada del mAb A5B7 "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) en el segundo dominio de unión que interacciona con CEA es resistente al antígeno CEA soluble, permitiendo de este modo el tratamiento de pacientes con tumores con concentraciones de CEA séricas altas en su plasma. La determinación de las CDR es conocida por el experto en la técnica; véase, por ejemplo, <http://www.bioinf.org.Uk/abs/#cdrid>. La numeración de las secuencias de aminoácidos en anticuerpos se puede llevar a cabo, por ejemplo, de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat descrito en la técnica; véase por ejemplo, Kabat, E. A., T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, y C. Foeller. 1991. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Bethesda, Md.: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine.

Lo más preferentemente y como se documenta en los ejemplos adjuntos, el "anticuerpo monocatenario biespecífico" que se va a emplear en la composición farmacéutica de la invención es un Fv monocatenario biespecífico (scFv) con un dominio de unión anti-CD3 desinmunizado (documento WO 2005/040220) y un dominio de unión anti-CEA humano que comprende al menos la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" correspondiente a las posiciones de Kabat 95-102 (SEQ ID NO. 66) de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7. Las moléculas monocatenarias biespecíficas son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 99/54440 o Mack, *PNAS*, (1995), 92, 7021-7025.

El término "monocatenario" como se usa de acuerdo con la presente invención quiere decir que dichos dominios primero y segundo de la construcción monocatenaria biespecífica se unen covalentemente, preferentemente en forma de secuencia de aminoácidos colineal codificable por una única molécula de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, "humano" se refiere a la especie *Homo sapiens*. Una molécula "humana", por ejemplo, CEA humano o CD3 humano (CD3 épsilon), es, por lo tanto, la variante de esa molécula tal como se



expresa de forma natural en *Homo sapiens*.

El término "tumor epitelial" como se usa en el presente documento indica un tumor de origen epitelial que es positivo para CEA (Cancer Medicine; 6ª ed.; Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil, editors. Hamilton (Canadá): BC Decker Inc. 2003; <http://www.dkfz.de>; <http://www.krebsinformationsdienst.de/Krebsarten/index.html>). El tumor epitelial que se va a tratar puede ser un adenocarcinoma gastrointestinal, un adenocarcinoma de mama o un adenocarcinoma pulmonar. Dicho adenocarcinoma gastrointestinal es preferentemente un adenocarcinoma colorrectal, pancreático, esofágico o gástrico. Como se ha expuesto en el presente documento, la composición farmacéutica de la invención es particularmente ventajosa para el tratamiento de pacientes con tumores progresivos, metástasis, cáncer recidivante, tumores epiteliales en estadio tardío, carga/masa de tumor epitelial alta, o pacientes con tumores con una concentración sérica de CEA mayor de 100 ng/ml (como se determina, por ejemplo, por ELISA), caracterizada por niveles altos de antígeno CEA soluble en el plasma de los pacientes con tumores. También está dentro del alcance de la invención que dicha composición farmacéutica se use después de la extirpación quirúrgica del tumor primario. Por ejemplo, las células tumorales residuales diseminadas derivadas de un tumor epitelial que produce CEA también liberan CEA en sus microentornos. Por tanto, en los alrededores de estas células tumorales, el nivel de CEA soluble también es alto. En consecuencia, la resistencia a CEA soluble de la actividad citotóxica de las composiciones farmacéuticas de la invención también es ventajosa para el tratamiento de la enfermedad residual mínima. Se prevé que dichas composiciones farmacéuticas se puedan administrar en un período en el que los niveles de CEA séricos disminuyan (debido a la retirada de la fuente de CEA, es decir, el tumor primario) para destruir las células tumorales restantes. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser útiles después de la retirada del tumor primario, en el caso en el que los niveles de CEA séricos se incrementen debido a la formación de metástasis o tumores secundarios. La concentración sérica de CEA se puede determinar, por ejemplo, por ensayos ELISA de CEA (véase, por ejemplo, IBL CEA EIA, IBL Hamburg, Alemania). Como se ha expuesto anteriormente, en muchos enfoques terapéuticos basados en anticuerpos, dicho CEA sérico inhibe la unión del anticuerpo a CEA unido a membrana en las células tumorales y bloquea la actividad del anticuerpo, empeorando de este modo el éxito del tratamiento antitumoral.

Como se usa en el presente documento, el término "se une específicamente" o expresiones relacionadas tales como "que se une específicamente" o "reactividad específica con/para" etc. se refiere a la capacidad de los dominios de unión primero y/o segundo del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento para discriminar entre la respectiva molécula primera y/o segunda hasta un grado tal que, de un grupo de una pluralidad de diferentes moléculas como compañeros de unión potenciales, sólo dicha respectiva molécula primera y/o segunda se, o se une significativamente. Dichas medidas de unión se pueden realizar de forma rutinaria, por ejemplo, en un aparato Biacore, por ELISA, análisis FACS o similares. Más específicamente, el primer dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento se une a CD3 humano, preferentemente CD3 épsilon humano. El segundo dominio de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define en el presente documento se une a un antígeno de tumor epitelial, es decir, CEA humano (antígeno carcinoembrionario, molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5; CEACAM5; CD66e), como se expone a continuación. El término "que se une específicamente" quiere decir de acuerdo con la presente invención que la molécula de anticuerpo monocatenario biespecífico puede específicamente interactuar con y/o unirse a al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o incluso más aminoácidos de cada una de la molécula diana humana como se define en el presente documento. Dicho término se refiere a la especificidad de la molécula de anticuerpo, es decir, a su capacidad para discriminar entre las regiones específicas de la molécula diana humana como se define en el presente documento. La interacción específica del sitio de interacción con antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado un inicio de una señal, por ejemplo, debido a la inducción de un cambio de la conformación del antígeno, un oligomerización del antígeno, etc. Además, dicha unión se puede ejemplificar por la especificidad de un "principio llave/cerradura". Por tanto, los motivos específicos en la secuencia de aminoácidos del sitio de interacción con antígeno y del antígeno se unen entre sí como resultado de su estructura primaria, secundaria o terciaria, así como resultado de modificaciones secundarias de dicha estructura. La interacción específica del sitio de interacción con antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado también una unión de dicho sitio al antígeno.

La "unión específica" de un anticuerpo se caracteriza principalmente por dos parámetros: un parámetro cualitativo (el epítipo de unión, o *donde* se une el anticuerpo) y un parámetro cuantitativo (la afinidad de unión, o *con qué fuerza* se une donde lo hace). Se puede determinar de forma ventajosa el epítipo que se une, por ejemplo, por metodología FACS conocida, identificación genética de posiciones peptídicas, espectroscopía de masas o ELISA peptídico. La fuerza de unión del anticuerpo a un epítipo particular se puede determinar ventajosamente, por ejemplo, por metodologías Biacore y/o ELISA conocidas. Una combinación de dichas técnicas permite el cálculo de una proporción de señal:ruido como medida representativa de la especificidad de unión. En una proporción de señal:ruido de este tipo, la señal representa la fuerza de unión del anticuerpo al epítipo de interés, mientras que el ruido representa la fuerza de unión del anticuerpo a otros epítipos, no relacionados, que difieren del epítipo de interés. Preferentemente, una proporción de señal:ruido para un epítipo de interés que es aproximadamente 50 veces mayor que para otros epítipos diferentes del epítipo de interés se puede tomar como indicativo de que el anticuerpo evaluado se une al epítipo de interés de manera específica, es decir, es un "enlazador específico".

El término "unión específica" o "interacción específica" como se usa de acuerdo con la presente invención quiere

decir que la construcción monocatenaria biespecífica no o esencialmente no reacciona de forma cruzada con polipéptidos de estructuras similares. La reactividad cruzada de un panel de construcción monocatenaria biespecífica en investigación se puede someter a prueba, por ejemplo, evaluando la unión de dicho panel de construcción monocatenaria biespecífica en condiciones convencionales (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 5 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 and Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) al polipéptido de interés así como a varios polipéptidos más o menos (de forma estructural y/o funcional) estrechamente relacionados. Por ejemplo, está dentro del alcance de la invención que el primer dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico de la invención se une al CEA humano (antígeno carcinoembrionario; CEACAM5; CEA; CD66e) es decir, tanto a un antígeno CEA soluble como al 10 CEA unido a membrana, mientras que los anticuerpos biespecíficos que se unen a otros miembros de la familia de CEA, tales como glucoproteína biliar (CEACAM1; BGP1; TM-CEA; CD66a), están excluidos de dicho alcance.

Los ejemplos para la interacción específica de un sitio de interacción con antígeno con un antígeno específico comprenden la especificidad de un ligando por su receptor. Dicha definición comprende en particular la interacción 15 de ligandos que inducen una señal tras la unión a su receptor específico. Los ejemplos para los correspondientes ligandos comprenden citocinas que interaccionan/se unen con/a sus receptores de citocinas específicos. También está comprendida particularmente por dicha definición la unión de un sitio de interacción con antígeno a antígenos como los antígenos de la familia de selectina, integrinas y de la familia de factores de crecimiento como EGF. Otro ejemplo de dicha interacción, que también está comprendida particularmente por dicha definición, es la interacción de un determinante antigénico (epítipo) con el sitio de unión antigénico de un anticuerpo.

El término “que se une a/que interacciona con” también se puede referir a un epítipo conformacional, un epítipo 20 estructural o un epítipo discontinuo que consiste en dos regiones de las moléculas diana humanas o partes de las mismas. En el contexto de la presente invención, un epítipo conformacional se define por dos o más secuencias de aminoácidos discretas separadas en la secuencia primaria que se unen sobre la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega a la proteína natural (Sela, (1969) Science 166, 1365 y Laver, (1990) Cell 61, 553-6).

El término “epítipo discontinuo” quiere decir en el contexto de la invención epítopos no lineales que se ensamblan a 25 partir de residuos de porciones distantes de la cadena polipeptídica. Estos residuos se unen sobre la superficie de la molécula cuando la cadena polipeptídica se pliega en una estructura tridimensional para constituir un epítipo conformacional/estructural.

“CD3” como se usa en el presente documento indica un antígeno que se expresa en linfocitos T como parte del 30 complejo de receptor de linfocitos T multimolecular y que consiste en al menos cinco cadenas diferentes, CD3-gamma, -delta, -épsilon, -zeta, y -eta. El agrupamiento de CD3 en linfocitos T, por ejemplo, por anticuerpos anti-CD3 inmovilizados, da lugar a la activación de linfocitos T similar al acoplamiento del receptor de linfocitos T pero independiente de su especificidad típica de clon. En realidad, la mayoría de los anticuerpos anti-CD3 reconocen la cadena CD3 épsilon. La secuencia de aminoácidos de CD3 épsilon humano está representada en el número de acceso GenBank NM\_000733 y comprende la SEQ ID NO. 111. 35

“CEA” indica el antígeno carcinoembrionario (molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario 5; CEACAM5; CEA; CD66e), un antígeno expresado en un gran número de tumores de origen 40 epitelial (Hammarström, Sem. Cancer Biol. 9 (1999), 67-81; Shively y Beatty CRC Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2 (1985), 355-399). La secuencia de aminoácidos de CEA humano está representada en el número de acceso GenBank NM\_004363 y comprende la SEQ ID NO. 76.

En la presente invención, se ha descubierto sorprendentemente que es posible generar una opción terapéutica basada en anticuerpos con especificidad por CD3 humano y CEA humano, en la que la actividad citotóxica dirigida 45 contra células tumorales es resistente incluso a concentraciones altas de antígeno CEA soluble. Este hallazgo es totalmente inesperado en vista del hecho de que los anticuerpos monocatenarios biespecíficos de la invención se unen al antígeno CEA soluble. Por ejemplo, cuando se han generado construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos derivadas de anticuerpos monoclonales T84.66 o MFE-23, estos anticuerpos fueron altamente sensibles al antígeno CEA soluble, es decir, su actividad citotóxica se ha bloqueado en presencia del antígeno CEA soluble. La inhibición de la actividad citotóxica de dichas construcciones por CEA soluble tampoco se pudo superar por el incremento en las cantidades de anticuerpo. También se ha descubierto que estas construcciones se pueden 50 unir al CEA soluble. En vista de esto, se concluyó que el antígeno CEA soluble evita que el anticuerpo ejerza su actividad citotóxica. Por el contrario, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en el presente documento son totalmente resistentes a la presencia incluso de niveles altos de CEA soluble en su actividad citotóxica hacia células tumorales. Además, debido a su actividad citotóxica alta, dichas construcciones biespecíficas como se define en el presente documento provocan su actividad biológica incluso a concentraciones bajas. Por consiguiente, son suficientes cantidades bajas de composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos 55 monocatenarios biespecíficos como se define en el presente documento para lograr un efecto terapéutico en pacientes con tumores epiteliales caracterizado por concentraciones de CEA soluble altas en su suero/plasma. Las concentraciones de CEA soluble altas en el suero/plasma de pacientes con tumores epiteliales son características para tumores progresivos, recidivantes, metastásicos o en estadio tardío y para pacientes con carga alta. Incluso más sorprendente, se ha descubierto que la secuencia de aminoácidos “DRGLRFYFDY” (SEQ ID NO. 66) correspondiente a las posiciones de Kabat 95 - 102 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 es 60

suficiente para mediar en la resistencia a antígeno CEA soluble cuando se usa en un dominio de unión a CEA humano (es decir, dominios de unión humanos que se unen específicamente a CEA humano) de anticuerpos monocatenarios biespecíficos anti-CEAxanti-CD3. Debido a su origen humano, dichas construcciones son poco o no inmunógenas cuando se administran a pacientes humanos con tumores. En resumen, las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define en el presente documento son particularmente útiles para el tratamiento de pacientes con tumores epiteliales con concentraciones de CEA soluble altas en su plasma, como se observa, por ejemplo, durante la progresión tumoral, para cáncer recidivante, para metástasis, para pacientes con carga/masa tumoral alta o tumores en estadio tardío.

En otro modo de realización preferente de la composición farmacéutica de la invención, dicho primer dominio de unión específico para CD3 de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento se sitúa de forma C-terminal al segundo dominio de unión.

Dentro del alcance de la invención y todos modos de realización de la misma, el orden de disposición de los dominios de unión primero y segundo en la única cadena polipeptídica, es decir, dentro del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento, es relevante. Se prevé que la disposición de los dominios de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento pueda ser  $VH_{CEA}-VL_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ ,  $VL_{CEA}-VH_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ ,  $VH_{CD3}-VL_{CD3}-VH_{CEA}-VL_{CEA}$  o  $VH_{CD3}-VL_{CD3}-VL_{CEA}-VH_{CEA}$ . Como se muestra en los siguientes ejemplos, las ventajas como se describe anteriormente en el presente documento son particularmente realizables cuando el primer dominio de unión (que se une específicamente a CD3) se sitúa de forma C-terminal al segundo dominio de unión, es decir, más cerca del extremo C-terminal del anticuerpo monocatenario biespecífico que el segundo dominio de unión. Es preferente que el primer dominio de unión que se une específicamente a CD3 humano esté dispuesto en la orientación VH-VL. Por ejemplo, los dominios de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento pueden estar dispuestos en el orden  $VH_{CEA}-VL_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$  o  $VL_{CEA}-VH_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ . Como se usa en el presente documento, "de forma N-terminal a" o "de forma C-terminal a" y variantes gramaticales del mismo indican una ubicación relativa dentro de la secuencia de aminoácidos primaria en lugar de la disposición en el extremo N- o C-terminal absoluto del anticuerpo monocatenario biespecífico. Por consiguiente, como ejemplo no limitante, un primer dominio de unión que está "situado de forma C-terminal al segundo dominio de unión" simplemente indica que el primer dominio de unión está situado en el lado carboxilo del segundo dominio de unión dentro del anticuerpo monocatenario biespecífico, y no excluye la posibilidad de que una secuencia adicional, por ejemplo una marca como se expone anteriormente, u otro compuesto proteínico o no proteínico tal como un radioisótopo, esté situado en el extremo C-terminal final del anticuerpo monocatenario biespecífico.

Preferentemente, dichos dominios de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento están dispuestos en el orden  $VH_{CEA}-VL_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$  o  $VL_{CEA}-VH_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ . Incluso más preferente, la disposición es  $VL_{CEA}-VH_{CEA}-VH_{CD3}-VL_{CD3}$ . Lo más preferente es la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico A240 VL-B9 VHxSEQ ID NO. 77 VHVL como se define en SEQ ID NO. 34.

Es preferente que el segundo dominio de unión que se une específicamente a CEA humano del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento comprenda al menos una CDR, preferentemente una CDR-H3, más preferentemente una parte de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 con la secuencia de aminoácidos "FYFDY" (SEQ ID NO. 112) correspondiente a las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, y 102, respectivamente, de CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7; incluso más preferente con la secuencia de aminoácidos "DX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>FYFDY" (SEQ ID NO. 65), en la que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" o "X<sub>4</sub>" representa cualquier residuo aminoacídico, y el residuo aminoacídico "D" corresponde a la posición de Kabat 95 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 y los residuos aminoacídicos "FYFDY" corresponden a las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, y 102, respectivamente, de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7. En el presente documento, "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" y "X<sub>4</sub>" corresponden a posiciones de Kabat 96 ("X<sub>1</sub>"), 97 ("X<sub>2</sub>"), 98 ("X<sub>3</sub>") y 99 5 ("X<sub>4</sub>"), respectivamente, de CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7. Se prevé que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" o "X<sub>4</sub>" representen un residuo aminoacídico "R" (arginina), "G" (glicina), "L" (leucina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), "S" (serina), "W" (triptófano), "F" (fenilalanina) o "T" (treonina). En el presente documento, se excluye del alcance de las reivindicaciones de la invención que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" y "X<sub>4</sub>" representen el mismo aminoácido, por ejemplo, que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" y "X<sub>4</sub>" sean todos "F" (fenilalanina). Preferentemente, "X<sub>1</sub>" representa "R" (arginina), "F" (fenilalanina), "M" (metionina), "E" (ácido glutámico), o "T" (treonina); "X<sub>2</sub>" representa "G" (glicina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), o "S" (serina); "X<sub>3</sub>" representa "L" (leucina), "F" (fenilalanina), "M" (metionina), "E" (ácido glutámico), o "T" (treonina); y "X<sub>4</sub>" representa "R" (arginina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), o "S" (serina). Incluso más preferente, el segundo dominio de unión específico para CEA humano comprende al menos la secuencia de aminoácidos "RFYFDY" (SEQ ID NO. 113), "LRFYFDY" (SEQ ID NO. 114), "GLRFYFDY" (SEQ ID NO. 115), o "RGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 116) de CDR-H3 del anticuerpo monoclonal A5B7. Lo más preferente es el CDR-H3 completo de A5B7 con la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) correspondiente a las posiciones de Kabat 95 ("D", ácido aspártico), 96 ("R", arginina), 97 ("G", glicina), 98 ("L", leucina), 99 ("R", arginina), 100 ("F", fenilalanina), 100a ("Y", tirosina), 100b ("F", fenilalanina), 101 ("D", ácido aspártico), y 102 ("Y", tirosina), respectivamente. La numeración de acuerdo con el sistema de Kabat se expone, por ejemplo, en Kabat, E. A., T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, y C. Foeller. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> ed. Bethesda, Md.: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, la actividad citotóxica frente a células tumorales del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento que comprende dicha secuencia de aminoácidos de CDR-H3 derivada del mAb A5B7 "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) en el segundo dominio de unión que interacciona con CEA es resistente al antígeno CEA soluble, permitiendo de este modo el tratamiento de pacientes con tumores con concentraciones de CEA séricas altas en su plasma.

Puede ser deseable modificar adicionalmente esta secuencia de aminoácidos de CDR-H3 "DRGLRFYFDY" derivada de A5B7, por ejemplo, para mejorar la afinidad por el antígeno diana CEA (en las células tumorales epiteliales) y/o para optimizar la "especificidad fina" del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento. Para este fin, en la secuencia de aminoácidos "DX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>FYFDY" (SEQ ID NO. 65), varios residuos aminoacídicos se pueden someter a prueba en las posiciones "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" y/o "X<sub>4</sub>" (correspondientes a las posiciones de Kabat 96 ("X<sub>1</sub>"), 97 ("X<sub>2</sub>"), 98 ("X<sub>3</sub>") y 99 ("X<sub>4</sub>"), respectivamente, de CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7) para identificar una CDR-H3 modificada con una mejora en la afinidad y/o especificidad fina. Por ejemplo, "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" o "X<sub>4</sub>" puede representar un residuo aminoacídico "R" (arginina), "G" (glicina), "L" (leucina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), "S" (serina), "W" (triptófano), "F" (fenilalanina) o "T" (treonina). En el presente documento, una, dos, tres o todas las cuatro de las posiciones "X" indicadas se pueden intercambiar en comparación con la secuencia de aminoácidos "RGLR" original en las posiciones de Kabat 96 a 99 en la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66). Sin embargo, se excluye del alcance de las reivindicaciones de la invención que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" y "X<sub>4</sub>" representen el mismo aminoácido, por ejemplo, que "X<sub>1</sub>", "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" y "X<sub>4</sub>" sean todos "F" (fenilalanina). La modificación mencionada anteriormente de la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 "DRGLRFYFDY" derivada de A5B7 se puede lograr por procedimientos conocidos en la técnica, tales como PCR usando cebadores aleatorizados, lo que permite la generación de anticuerpos monocatenarios biespecíficos con dichas regiones CDR-H3, modificadas en el dominio de unión a CEA. La afinidad o especificidad fina de estos anticuerpos monocatenarios biespecíficos modificados se puede someter a prueba por procedimientos descritos en la técnica, por ejemplo, por ELISA, Biacore o análisis FACS. La resistencia a antígeno CEA soluble de un anticuerpo monocatenario biespecífico con una CDR-H3 modificada de este tipo se puede someter a prueba en ensayos de citotoxicidad en presencia de un incremento en las cantidades de CEA soluble, como se describe en los siguientes ejemplos.

Más preferentemente, dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento comprende SEQ ID NO. 65 o 66 y/o una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "SYWMH" (SEQ ID NO. 68) y/o una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "FIRNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 67) o "FILNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 145). Por tanto, dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento puede comprender una, dos o tres regiones CDR-H como se define anteriormente. De manera alternativa, dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento comprende SEQ ID NO. 65 o 66 y/o una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TYAMH" (SEQ ID NO. 70) y/o una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "LISNDGSNKYYADSVKG" (SEQ ID NO. 569).

Por tanto, de manera alternativa, dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento puede comprender una, dos o tres regiones CDR-H como se define anteriormente. Incluso más preferente, dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento además de la una, dos o tres regiones CDR-H como se representa anteriormente comprende una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TLRRGINVGAYSIY" (SEQ ID NO. 73) y/o una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos "YKSDSDKQQGS" (SEQ ID NO. 72) y/o una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos "MIWHSGASAV" (SEQ ID NO. 71).

La secuencia de aminoácidos de la región VH del segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento es preferentemente la SEQ ID NO. 60 que comprende "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) correspondiente a las posiciones de Kabat 95 – 102 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 y una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "SYWMH" (SEQ ID NO. 68) y una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "FIRNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 67).

La secuencia de aminoácidos de la región VH del segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento es preferentemente la SEQ ID NO. 146 que comprende "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) correspondiente a las posiciones de Kabat 95 – 102 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 y una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "SYWMH" (SEQ ID NO. 68) y una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "FILNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 145).

La secuencia de aminoácidos de la región VH del segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento es preferentemente la SEQ ID NO. 58 o SEQ ID NO. 62 que comprende "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) correspondiente a las posiciones de Kabat 95 – 102 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 y una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TYAMH" (SEQ ID NO. 70) y una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "LISNDGSNKYYADSVKG" (SEQ

ID NO. 69).

La región VL del segundo dominio de unión específico para CEA humano de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento es preferentemente la SEQ ID NO. 64 que comprende una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TLRRGINVVGAYSIY" (SEQ ID NO. 73) y una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos "YKSDSDKQQGS" (SEQ ID NO. 72) y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos "MIWHS GASAV" (SEQ ID NO. 71).

Como se ha expuesto anteriormente, el orden o la disposición de las regiones variables del segundo dominio de unión que se une específicamente a CEA puede ser VH-VL o VL-VH. Ambas disposiciones están dentro del alcance de la invención. Para un segundo dominio de unión que comprende la VH de SEQ ID NO. 60 y la VL de SEQ ID NO. 64, la disposición VH-VL se muestra en la SEQ ID NO. 52, mientras que la disposición VL-VH se representa en la SEQ ID NO. 122. Para un segundo dominio de unión que comprende la VH de SEQ ID NO. 146 y la VL de SEQ ID NO. 64, la disposición VH-VL se muestra en la SEQ ID NO. 147.

Para un segundo dominio de unión que comprende la VH de SEQ ID NO. 58 y la VL de SEQ ID NO. 64, la disposición VH-VL se muestra en la SEQ ID NO 50, mientras que la disposición VL-VH se muestra en la SEQ ID NO. 120. Para un segundo dominio de unión que comprende la VH de SEQ ID NO. 62 y la VL de SEQ ID NO. 64, la disposición VH-VL se muestra en la SEQ ID NO. 54, mientras que la disposición VL-VH se representa en la SEQ ID NO. 124. Para un segundo dominio de unión que comprende la VH de SEQ ID NO. 56 y la VL de SEQ ID NO. 64, la disposición VH-VL se muestra en la SEQ ID NO. 48, mientras que la disposición VL-VH se representa en la SEQ ID NO. 118.

Incluso más preferente, las regiones V del segundo dominio de unión específico para CEA de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 60 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64;

(b) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 146 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64;

(c) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 58 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64;

(d) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 62 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64; y

(e) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 56 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64.

Lo más preferente, dicho anticuerpo monocatenario biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de las SEQ ID NO. 6, 8, 16, 18, 24, 26, 32, 34, 40, 42, 126, 130, 134 o 143;

(b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en las SEQ ID NO. 5, 7, 15, 17, 23, 25, 31, 33, 39, 41, 125, 129, 133 o 142; y

(c) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético a una secuencia de nucleótidos de (b).

En otro modo de realización preferente de la composición farmacéutica de la invención, dicho tumor epitelial que se va a tratar es un adenocarcinoma gastrointestinal, un adenocarcinoma de mama o un adenocarcinoma pulmonar. Dicho adenocarcinoma gastrointestinal es preferentemente un adenocarcinoma colorrectal, pancreático, esofágico o gástrico.

Más preferentemente, dicha composición farmacéutica de la invención es para el tratamiento de tumores progresivos, tumores en estadio tardío, pacientes con tumores con carga/masa tumoral alta, tumores metastásicos, o pacientes con tumores con una concentración sérica de CEA mayor de 100 ng/ml. Dicha concentración sérica de CEA se puede determinar, por ejemplo, por ELISA.

En otro modo de realización preferente de la composición farmacéutica de la invención, al menos uno de dichos dominios de unión primero o segundo de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento es quimérico, humanizado, injertado con CDR, y/o desinmunizado o humano.

El término "quimérico" como se usa en el presente documento se ha definido anteriormente. El término dominio de unión "humano", por ejemplo, un dominio de unión humano que se une específicamente a CEA humano como se

5 usa en el presente documento se debe entender que quiere decir que el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento comprende (una) secuencia(s) de aminoácidos contenida(s) en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana o repertorio de anticuerpos que tiene al menos la secuencia de aminoácidos "FYFDY" correspondiente a las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, y 102 (SEQ ID NO. 112) de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 o una CDR-H3 derivada de A5B7 como se define anteriormente. Un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento se puede considerar humano si consiste en (una) secuencia(s) que se desvía(n) de su(s) secuencia(s) de línea germinal humana más próxima(s) no más de lo que se podría esperar debido al sello de hipermutación somática. Adicionalmente, los anticuerpos de muchos mamíferos no humanos, por ejemplo, roedores tales como ratones y ratas, comprenden secuencias de aminoácidos de CDR3 de VH que se puede esperar que existan en el repertorio de anticuerpos humanos expresados, además. Cualquiera de dicha(s) secuencia(s) de origen humano o no humano que se puede esperar que exista en el repertorio humano expresado también se podría considerar "humana" para los propósitos de la presente invención.

15 Como se usa en el presente documento, el término "humanizado", "humanización" o "como humano" se usan de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende en al menos uno de sus dominios de unión al menos una región determinante de la complementariedad ("CDR") de un anticuerpo no humano o fragmento del mismo. Los enfoques de humanización se describen, por ejemplo, en los documentos WO 91/09968 y US 6.407.213. Como ejemplos no limitantes, el término engloba el caso en el que una región variable de al menos un dominio de unión comprende una única región CDR, por ejemplo, la tercera región CDR del VH, de otro animal no humano, por ejemplo, un roedor, así como el caso en el que una o ambas regiones variables comprenden en cada una de sus respectivas CDR primera, segunda y tercera, las CDR de dicho animal no humano. En el caso en el que todas las CDR de un dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico se hayan reemplazado por sus correspondientes equivalentes de, por ejemplo, un roedor, se habla típicamente de "injerto con CDR", y este término se debe entender que está englobado por el término "humanizado" o variantes gramáticamente relacionadas con el mismo como se usa en el presente documento. El término "humanizado" o variantes gramáticamente relacionadas con el mismo también engloba casos en los que, además del reemplazo de una o más regiones CDR dentro de un VH y/o VL del dominio de unión primero y/o segundo se ha(n) efectuado otra(s) mutación/mutaciones (por ejemplo, sustituciones) de al menos un residuo(s) aminoácido(s) individual(es) dentro de las regiones estructurales ("FR") entre las CDR de modo que los aminoácidos en esa(s) posición/posiciones corresponde(n) al/a los aminoácido(s) en esa(s) posición/posiciones en el animal a partir de que se derivan las regiones CDR usadas para el reemplazo. Como es conocido en la técnica, dichas mutaciones individuales se realizan a menudo en las regiones estructurales después de un injerto con CDR para restablecer la afinidad de unión original del anticuerpo no humano usado como dador de CDR para su molécula diana. El término "humanizado" pueden englobar adicionalmente una sustitución/sustituciones de aminoácidos en las regiones CDR de un animal no humano al/a los aminoácido(s) de una región CDR correspondiente de un anticuerpo humano, además de las sustituciones de aminoácidos en las regiones estructurales como se describe anteriormente.

40 Como se usa en el presente documento, el término "desinmunizado" o "desinmunización" indica la modificación del dominio de unión primero y/o segundo con respecto a una construcción natural haciendo dicha construcción natural no inmunógena o menos inmunógena en seres humanos. Los enfoques de desinmunización se muestran, por ejemplo, en los documentos WO 00/34317, WO 98/52976, WO 02/079415 o WO 92/10755. El término "desinmunizado" también se refiere a construcciones, que muestran una reducción en la propensión a generar epítopos de linfocitos T. De acuerdo con la presente invención, el término "reducción en la propensión a generar epítopos de linfocitos T" se refiere a la retirada de epítopos de linfocitos T que da lugar a la activación de linfocitos T específica. Además, "reducción en la propensión a generar epítopos de linfocitos T" quiere decir sustitución de aminoácidos que contribuyen a la formación de epítopos de linfocitos T, es decir, sustitución de aminoácidos, que son esenciales para la formación de un epítopo de linfocito T. En otras palabras, "reducción en la propensión a generar epítopos de linfocitos T" se refiere a una reducción en la inmunogenicidad o reducción en la capacidad para inducir proliferación de linfocitos T independiente de antígenos. El término "epítopo de linfocito T" se refiere a secuencias peptídicas cortas que se pueden liberar durante la degradación de péptidos, polipéptidos o proteínas dentro de células y posteriormente presentarse por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para desencadenar la activación de linfocitos T; véase, *inter alia*, el documento WO 02/066514. Para los péptidos presentados por el MHC clase II, dicha activación de linfocitos T puede dar lugar a continuación a una respuesta de anticuerpos por estimulación directa de linfocitos T para producir dichos anticuerpos. La "reducción en la propensión a generar epítopos de linfocitos T" y/o "desinmunización" se pueden medir por técnicas conocidas en la técnica. Preferentemente, la desinmunización de proteínas se puede someter a prueba *in vitro* por ensayo de proliferación de linfocitos T. En este ensayo, las PBMC de donantes que representan > 80 % de los alelos HLA-DR en el mundo se criban para determinar la proliferación en respuesta a péptidos naturales o bien desinmunizados. Idealmente, la proliferación celular solo se detecta tras la carga de las células presentadoras de antígenos con péptidos naturales. De manera alternativa, se puede someter a prueba la desinmunización expresando los tetrámeros de HLA-DR que representan todos los haplotipos. Estos tetrámeros se pueden someter a prueba para determinar la unión a péptidos o cargarse con péptidos sustitutos de las células presentadoras de antígenos en ensayos de proliferación. Para someter a prueba si los péptidos desinmunizados están presentes en los haplotipos de HLA-DR, se puede medir la unión de, por ejemplo, péptidos marcados con fluorescencia en PBMC. Además, se puede probar la desinmunización determinando si los anticuerpos frente a las moléculas desinmunizadas se han formado después

de la administración en pacientes. Preferentemente, las moléculas derivadas de anticuerpos se desinmunizan en las regiones estructurales y la mayoría de las regiones CDR no se modifican para generar una reducción en la propensión para inducir un epítipo de linfocito T de modo que la afinidad de unión de las regiones CDR no se ve afectada. Incluso la eliminación de un epítipo de linfocito T da como resultado una reducción en la inmunogenicidad.

5 En resumen, los enfoques anteriores ayudan a reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos terapéuticos como se define en el presente documento cuando se administran a pacientes con tumores epiteliales. Por ejemplo, el primer dominio de unión que se une específicamente a CD3 como se muestra en SEQ ID NO. 77 está desinmunizado; véase también el documento WO2005/040220. Preferentemente, la disposición de las regiones V en este dominio de unión a CD3 es VH-VL.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de las SEQ ID NO. 6, 8, 30, 16, 18, 24, 26, 32, 34, 40, 42, 126, 130, 134 o 143;

15 (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en las SEQ ID NO. 5, 7, 15, 17, 23, 25, 31, 33, 39, 41, 125, 129, 133 o 142; y

(c) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético a una secuencia de nucleótidos de (b).

20 En un modo de realización, la invención se refiere a una composición que comprende anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define anteriormente. Preferentemente, dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define anteriormente se usan como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un tumor epitelial o tumores epiteliales en un ser humano. Dicho(s) tumor(es) epitelial(es) es/son positivo(s) para CEA. La actividad citotóxica frente a células tumorales epiteliales positivas para CEA de estas composiciones farmacéuticas es resistente incluso a concentraciones altas de antígeno CEA soluble en el plasma de pacientes con tumores. Además, dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define anteriormente o scFv anti-CEA derivados de los mismos se pueden usar como composiciones de diagnóstico para la detección de un tumor epitelial o tumores epiteliales en un ser humano como se expone con más detalle a continuación.

30 El término "hibridar en condiciones rigurosas" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que pueden hibridar, en condiciones de hibridación rigurosas, a secuencias representadas en las SEQ ID NO. 5, 7, 15, 17, 23, 25, 31, 33, 39, 41, 125, 129, 133 o 142, o el complemento de las mismas, y que codifican un anticuerpo monocatenario biespecífico que tiene actividad citotóxica frente a células tumorales positivas para CEA. "Condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a una incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende formamida al 50 %, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado cortado, seguido de lavado de los filtros en 0,1x SSC a aproximadamente 65 °C.

35 Si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos en un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a un nucleótido o secuencia de aminoácidos definida en el presente documento se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos conocidos. Un procedimiento preferente para determinar el mejor emparejamiento global entre una secuencia de consulta (una secuencia definida en el presente documento) y una secuencia sujeto, también denominada alineación de secuencias global, se puede determinar usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. 6:237-245(1990)). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y sujeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar convirtiendo U en T.

45 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento. Dicho ácido nucleico se puede utilizar, por ejemplo, para enfoques de tratamiento génico para tratar un tumor epitelial en un ser humano, como se expone con más detalle a continuación.

50 La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define anteriormente. Preferentemente, dicho vector comprende además una secuencia reguladora que está unida de forma funcional a dicha secuencia de ácido nucleico definida anteriormente. Más preferentemente, dicho vector es un vector de expresión.

Además, el vector de la presente invención también puede ser un vector de transferencia génica o de selección génica. El tratamiento génico, que se basa en la introducción de ácidos nucleicos o genes terapéuticos en células por técnicas *ex vivo* o *in vivo* es una de las aplicaciones más importantes de transferencia génica. Los vectores, procedimientos o sistemas de suministro génico adecuados para tratamiento génico *in vitro* o *in vivo* se describen en la literatura y son conocidos para el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodua, Blood 91 (1998), 30-36; Verzeletti, Hum. Gene

5 Ther. 9 (1998), 2243-2251; 25 Verma, Nature 389 (1997), 239-242; Anderson, Nature 392 (Sup. 1998), 25-30; Wang, Gene Therapy 4 (1997), 393-400; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; documentos WO 94/29469; WO 97/00957; US 5.580.859; US 5.589.466; US 4.394.448 o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640, y referencias citadas en los mismos. Las moléculas de ácido nucleico y vectores como se define en el presente documento se pueden diseñar para su introducción directa o para su introducción por medio de liposomas, vectores víricos (por ejemplo, adenovírico, retrovírico), electroporación, u otros sistemas de suministro en la célula. Adicionalmente, se puede usar un sistema baculovírico como sistema de expresión eucariota para las moléculas de ácido nucleico como se define en el presente documento. La introducción y el enfoque terapéutico génico debe dar lugar, preferentemente, a la expresión de una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico funcional como se define en el presente documento, de este modo dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico expresada es particularmente útil en el tratamiento, mejoría y/o prevención de un tumor epitelial en un ser humano.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un huésped transformado o transfectado con un vector o un ácido nucleico como se define anteriormente.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica como se define anteriormente en el presente documento, que comprende además un compuesto proteínico que puede proporcionar una señal de activación para células efectoras inmunitarias.

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende además formulaciones adecuadas de vehículos, estabilizantes y/o excipientes.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica como se define anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento cultivar un huésped como se define anteriormente en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define anteriormente en el presente documento y recuperar el anticuerpo monocatenario biespecífico producido del cultivo.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un uso de un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define anteriormente en el presente documento o como se produce por el procedimiento como se define anteriormente en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se define anteriormente en el presente documento, un vector como se define anteriormente en el presente documento o un huésped como se define anteriormente en el presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento o mejoría de un tumor epitelial en un ser humano. Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica de la invención o como se produce de acuerdo con el procedimiento expuesto anteriormente para su uso en un procedimiento para la prevención, tratamiento o mejoría de un tumor epitelial en un ser humano. El experto en la técnica, en particular el médico encargado puede evaluar el tratamiento exitoso del paciente que necesita la administración de la molécula biespecífica/anticuerpo monocatenario biespecífico de la invención. En consecuencia, el esquema de administración así como la dosificación y el tiempo de administración se pueden evaluar por dicho experto en la técnica: Una correspondiente "mejoría" y/o "tratamiento" que se va a evaluar se define a continuación.

35 Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición farmacéutica de la invención en el contexto de tumores epiteliales se refiere a esa cantidad del agente terapéutico suficiente para destruir, modificar, controlar o retirar tejido tumoral primario, regional o metastásico. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede referir a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar la propagación del/de los tumor(es) epitelial(es). Una cantidad terapéuticamente eficaz también se puede referir a la cantidad del agente terapéutico o agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión del/de los tumor(es) epitelial(es). Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico o agente farmacéutico de la invención quiere decir esa cantidad de agente terapéutico o agente farmacéutico solo, o en combinación con otros tratamientos, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de un tumor epitelial. Usada junto con una cantidad del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento, el término puede englobar una cantidad que mejora el tratamiento global, reduce o evita efectos no deseados, o potencia la eficacia de o sinergias (como se define en el presente documento) con otro agente terapéutico. Preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz de una opción terapéutica mejora el tratamiento global, reduce o evita efectos no deseados, o potencia la eficacia terapéutica de o sinergias con otro agente terapéutico en el tratamiento de (un) tumor(es) epitelial(es). Por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento puede provocar una reducción del diámetro de un tumor epitelial de un 20 % si se administra a un paciente como monoterapia. Por el contrario, una segunda opción terapéutica, por ejemplo, un agente antineoplásico como se define a continuación, puede provocar una reducción tumoral de un 10 %. Sin embargo, si tanto el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento como dicha segunda opción terapéutica se administran en combinación en forma de cotratamiento, se puede observar una reducción tumoral de un 50 %. Un efecto de este tipo se entiende como un efecto sinérgico como se usa en el presente documento.

60 Como se denomina en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a cualquier esquema, procedimiento y/o agente de administración que se puede usar en la prevención, tratamiento o mejoría de un tumor epitelial. El término "prevención, tratamiento o mejoría de un tumor epitelial" se expone con más detalle a continuación. Los términos "tratamientos" y "tratamiento" se pueden referir a un tratamiento biológico, tratamiento



complementario, quimioterapia, radioterapia y/u otros tratamientos útiles en el tratamiento, prevención, o mejora de un tumor epitelial, o uno o más síntomas del mismo.

Como se usa en el presente documento, los términos “tratar”, “tratamiento” y “tratando” en el contexto de administrar un tratamiento o tratamientos a un paciente se refieren a la reducción o mejoría de la progresión, gravedad y/o duración de un tumor epitelial. Dicho(s) tumor(es) epitelial(es) puede(n) estar asociado(s) con la expresión anómala, por ejemplo, sobreexpresión o actividad de CEA, y/o la mejoría de uno o más síntomas de los mismos de la administración de uno o más tratamientos (incluyendo la administración de uno o más agentes farmacéuticos o terapéuticos).

El modo de administración más preferente es una administración intravenosa durante un tiempo/periodo de tiempo dado. Aunque el anticuerpo monocatenario biespecifico como se define en el presente documento se puede administrar solo, es preferente la administración en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, liposomas, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. El régimen de dosificación se determinará por el médico especialista y por factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, y suspensiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, suspensiones o soluciones acuosas, incluyendo medios tamponados y solución salina. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en la dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antibióticos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Además, la composición puede comprender vehículos proteináceos, como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferentemente de origen humano. Se prevé que el cotratamiento pueda comprender, además del anticuerpo monocatenario biespecifico proteináceo, otros agentes biológicamente activos, dependiendo del uso destinado de la composición farmacéutica. Dichos agentes pueden ser agentes que actúan sobre el sistema gastrointestinal, agentes que actúan como agentes citostáticos, agentes que previenen la hiperuricemia, agentes que inhiben reacciones inmunitarias (por ejemplo, corticoesteroides, FK506), fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como moléculas coestimuladores de linfocitos T o citocinas conocidas en la técnica. Preferentemente, el anticuerpo monocatenario biespecifico como se define en el presente documento se formula en un tampón, un estabilizante y un tensioactivo. El tampón puede ser un tampón fosfato, citrato, succinato o acetato. El estabilizante puede ser (un) aminoácido(s) y/o un azúcar. Los tensioactivos pueden ser detergentes, PEG, o similares. Más preferentemente, el anticuerpo monocatenario biespecifico como se define en el presente documento se formula en citrato, lisina, trehalosa y Tween 80. Como diluyente para dicha composición farmacéutica, es preferente solución salina isotónica y Tween 80.

El término “mejoría” como se usa en el presente documento se refiere una mejora o una moderación en la gravedad de una enfermedad, es decir, un tumor epitelial. Por ejemplo, una mejoría de este tipo puede ser el logro de una enfermedad estable (o incluso más preferentemente) una reducción del/de los tumor(es) epitelial(es), es decir, una respuesta mínima, parcial o respuesta completa, debido a la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención. “Enfermedad estable” se refiere a un estado de enfermedad en el que ninguna progresión/crecimiento tumoral o progresión/crecimiento tumoral significativo se puede observar o detectar por procedimientos de diagnóstico clínico e/o histológico. Por ejemplo, una reducción del tumor mayor de una reducción de un 50 % de la suma de las áreas transversales de las lesiones indicadoras se puede considerar como una “respuesta parcial”. Una “respuesta completa” indica un estado en el que ya no se puede(n) detectar lesión/lesiones después de tratamiento. Una respuesta con una reducción tumoral entre una enfermedad estable y una respuesta parcial se puede considerar como una respuesta mínima. Por ejemplo, una reducción de un 20 %, 25 % o 30 % de la suma de las áreas transversales de lesiones indicadoras se puede denominar una respuesta mínima.

El término “mejoría” como se usa en el presente documento engloba también una reducción del número de tumores epiteliales. Adicionalmente indica la prevención/ralentización de la progresión tumoral. Además, una mejora de la supervivencia global de los pacientes con tumores tratados en comparación con pacientes con tumores no tratados se puede considerar como una “mejoría” como se usa en el presente documento. Esto se aplica mutatis mutandis a una mejora de la supervivencia sin progresión o la supervivencia sin recaída de pacientes con tumores tratados en comparación con pacientes con tumores no tratados. Además, el término “mejoría” también se puede referir a una reducción de la intensidad de los síntomas de un tumor epitelial, dando como resultado, por ejemplo, una mejora de la calidad de vida de los pacientes con tumores tratados.

El término “prevención de un tumor epitelial” como se usa en el presente documento se debe entender como sigue: Después de la retirada quirúrgica del/de los tumor(es) epitelial(es) primario(s) de un paciente humano y/o después del tratamiento quimioterápico o radioterápico del/de los tumor(es) epitelial(es) primario(s), puede darse el caso de

que no todas las células tumorales se puedan eliminar del cuerpo. Sin embargo, estas células tumorales restantes pueden dar lugar a cáncer recidivante, es decir, recidiva y/o metástasis local en el paciente. La metástasis es una complicación frecuente del cáncer, aunque el proceso a través de que se diseminan las células cancerosas desde el/los tumor(es) primario(s) para formar colonias a distancia es poco conocido. Los cánceres metastásicos son, casi sin excepción, incurables, lo que eleva la necesidad de nuevas modalidades terapéuticas. La composición farmacéutica de la invención se puede usar para destruir estas células tumorales diseminadas para prevenir la formación de tumores secundarios (que se originan desde las células tumorales que permanecen en el cuerpo después de un tratamiento primario). De esta forma, la composición farmacéutica ayuda a prevenir la formación de recidiva local y/o metástasis en pacientes con tumores.

Se puede realizar un seguimiento del éxito del tratamiento antitumoral por procedimientos estándar establecidos para las respectivas entidades de enfermedad, por ejemplo, por tomografía axial computerizada, rayos X, tomografía por resonancia magnética nuclear (por ejemplo, para la evaluación de la respuesta en base a los criterios del National Cancer Institute [Cheson (1999), J. Clin. Oncol.; 17(4):1244]), tomografía por emisión de positrones, endoscopia, separación celular activada por fluorescencia, aspirado medular, de líquido pleural o peritoneal, histologías tisulares, y varios parámetros químicos clínicos específicos de tumores epiteliales (por ejemplo, concentración de CEA soluble en suero) y se pueden usar otros procedimientos estándar establecidos. Además, se pueden usar ensayos que determinan la activación de linfocitos T; véase por ejemplo, el documento WO99/054440. También se pueden usar estadísticas para la determinación de la supervivencia global, supervivencia sin progresión o supervivencia sin recaída de pacientes con tumores tratados en comparación con pacientes con tumores no tratados.

Preferentemente, dicho tumor epitelial es un adenocarcinoma gastrointestinal, un adenocarcinoma de mama o un adenocarcinoma pulmonar. Dicho adenocarcinoma gastrointestinal es más preferentemente un adenocarcinoma colorrectal, pancreático, esofágico o gástrico.

Incluso más preferentemente, dicha composición farmacéutica de la invención es para el tratamiento de tumores progresivos, tumores en estadio tardío, pacientes con tumores con carga/masa tumoral alta, tumores metastásicos, o pacientes con tumores con una concentración sérica de CEA mayor de 100 ng/ml (como se determina, por ejemplo, por ELISA).

En otro modo de realización preferente de los usos o procedimientos de la invención, dicha composición farmacéutica como se define anteriormente en el presente documento es adecuada para administrarse en combinación con un fármaco adicional, es decir, como parte de un cotratamiento.

En determinados modos de realización, el anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento se administra en combinación con uno o más de otros tratamientos. En determinados modos de realización, el anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento se administra a un paciente simultáneamente con uno o más de otros tratamientos. Preferentemente, dichos tratamientos son útiles para el tratamiento de tumores epiteliales. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de composiciones farmacéuticas o agentes terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino más bien quiere decir que el anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento y el/los otro(s) agente(s) se administran a un paciente en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que el anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento puede actuar junto con el otro agente para proporcionar un incremento en el beneficio mayor que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente terapéutico se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden a diferentes puntos temporales; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, se deben administrar lo suficientemente próximos en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

Cada agente terapéutico se puede administrar por separado, es una forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En otros modos de realización, el anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento se administran antes, simultáneamente o después de una intervención quirúrgica. Preferentemente, la intervención quirúrgica retira completamente los tumores epiteliales localizados o reduce el tamaño de los tumores epiteliales grandes. También se puede realizar una intervención quirúrgica como medida preventiva o para aliviar el dolor.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en el presente documento se engloban por el término "terapéuticamente eficaz" como se define anteriormente. Típicamente, la dosificación y la frecuencia variarán adicionalmente de acuerdo con factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de tumor epitelial, la vía de administración, así como la edad, peso corporal, respuesta, y los antecedentes personales del paciente. Se pueden seleccionar regímenes adecuados por un experto en la técnica considerando dichos factores y siguiendo, por ejemplo, dosificaciones informadas en la literatura y recomendadas en el Physicians' Desk Reference (59ª ed., 2005).

En algunos modos de realización, el tratamiento por administración del anticuerpo monocatenario biespecífico o

composición farmacéutica como se define en el presente documento se combina con la administración de uno o más tratamientos tales como quimioterapias, radioterapias, hormonoterapia y/o tratamientos biológicos/inmunoterapias. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, moléculas proteináceas, incluyendo, pero sin limitarse a, péptidos, polipéptidos, proteínas, incluyendo proteínas modificadas postraduccionalmente, anticuerpos etc.; o moléculas pequeñas (menos de 1000 daltons), compuestos orgánicos o inorgánicos; o moléculas de ácido nucleico incluyendo ADN monocatenario o bicatenario, o ARN monocatenario o bicatenario; así como moléculas de ácido nucleico de triple hélice. Los agentes terapéuticos se pueden derivar de cualquier organismo conocido (incluyendo, pero sin limitarse a, animales, plantas, bacterias, hongos y protistas o virus) o de una colección de moléculas sintéticas.

En un modo de realización específico, los procedimientos y usos de la invención engloban la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento en combinación con la administración de uno o más agentes terapéuticos que son inhibidores de cinasas tales como Gefitinib (Iressa), Erlotinib (Tarceva), anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, Cetuximab; Erbitux), o anticuerpos anti-Her2/neu (por ejemplo, Trastuzumab; Herceptin) descritos en la técnica; véase por ejemplo, Hardie y Hanks (1995) The Protein Kinase Facts Book, I and II, Academic Press, San Diego, California.

En otro modo de realización específico, los procedimientos y usos de la invención engloban la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento en combinación con la administración de uno o más agentes terapéuticos que son inhibidores de la angiogénesis tales como anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, Bevacizumab; Avastin), compuestos de moléculas pequeñas (por ejemplo, Vatalanib o Sorafenib) o inhibidores de la COX descritos en la técnica.

En otro modo de realización específico, los procedimientos y usos de la invención engloban la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento en combinación con la administración de uno o más agentes terapéuticos que son agentes antineoplásicos tales como 5-fluorouracilo, ácido folínico, capecitabina, oxaliplatino, irinotecán, gemcitabina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, cisplatino, carboplatino, taxanos (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel) descritos en la técnica.

Preferentemente, un cotratamiento de un paciente con un tumor epitelial usando un anticuerpo monocatenario biespecífico o composición farmacéutica como se define en el presente documento en combinación con (a) otro(s) agente(s) terapéutico(s) da como resultado un efecto sinérgico. Como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" se refiere a una combinación de tratamientos (por ejemplo, una combinación de un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento y (un) otro(s) agente(s) terapéutico(s) como se expone anteriormente) que es más eficaz que los efectos aditivos de cualquiera de dos o más tratamientos individuales (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos). Por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento puede provocar una reducción del diámetro de un tumor epitelial de un 20 % si se administra a un paciente como monoterapia. Por el contrario, una segunda opción terapéutica, por ejemplo, un agente antineoplásico como se define a continuación, puede provocar una reducción tumoral de un 10 %. Sin embargo, si tanto el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento como dicha segunda opción terapéutica se administran en combinación en forma de cotratamiento, se puede observar una reducción tumoral de un 50 %.

Un efecto sinérgico de una combinación de tratamientos (por ejemplo, una combinación de un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento y (un) otro(s) agente(s) terapéutico(s) como se expone anteriormente) permite el uso de menores dosificaciones de uno o más de los tratamientos (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos) y/o la administración menos frecuente de dichos tratamientos a un paciente con una enfermedad, por ejemplo, un tumor epitelial. La capacidad de utilizar menores dosificaciones de tratamientos (por ejemplo, agentes terapéuticos) y/o de administrar dichos tratamientos con menos frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de dichos tratamientos a un sujeto sin reducir la eficacia de dichos tratamientos en la prevención o tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, un tumor epitelial. Además, un efecto sinérgico puede dar como resultado una mejora en la eficacia de los tratamientos (por ejemplo, agentes terapéuticos) en la prevención, gestión, tratamiento y/o mejoría de un tumor epitelial (que puede estar asociado con la expresión anómala (por ejemplo, sobreexpresión) o actividad de CEA). Finalmente, el efecto sinérgico de una combinación de tratamientos (por ejemplo, agentes terapéuticos) puede evitar o reducir efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier tratamiento individual.

En dicho cotratamiento, se puede incluir opcionalmente un agente activo en la misma composición farmacéutica como el anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento, o se puede incluir en una composición farmacéutica separada. En este último caso, dicha composición farmacéutica separada es adecuada para su administración antes de, simultáneamente con o después de la administración de dicha composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento. La composición farmacéutica o fármaco adicional puede ser un compuesto proteináceo o un compuesto no proteináceo. En el caso en el que el fármaco adicional sea un compuesto proteináceo, es ventajoso que el compuesto proteináceo pueda proporcionar una señal de activación para las células efectoras inmunitarias.

Preferentemente, dicho compuesto proteináceo o compuesto no proteináceo se puede administrar simultáneamente

o no simultáneamente con un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define anteriormente en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se define anteriormente en el presente documento, un vector como se define como se define anteriormente en el presente documento, o un huésped como se define como se define anteriormente en el presente documento. Preferentemente, dicho sujeto que se va a tratar es un ser humano.

5 En otro modo de realización, un único anticuerpo biespecífico monocatenario o scFv anti-CEA como se define en el presente documento puede estar conjugado con un agente detectable o de diagnóstico. Dicho diagnóstico y detección se puede lograr acoplado el anticuerpo o scFv a sustancias detectables, por ejemplo, a varias enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, umbelliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriacilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, luciferasa, luciferina y eucorina; materiales radioactivos e isótopos, tales como cobalto (57Co), indio (115In, 113In, 112In, 111In), yodo (131I, 125I, 123I, 121I), o itrio (90Y), metales emisores de positrones que se usan en varias tomografías por emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos.

15 Las técnicas para conjugar restos a anticuerpos son bien conocidas. Los restos se pueden conjugar a anticuerpos por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a enlace aldehído/Schiff, enlace sulfidrido, enlace lábil ácido, enlace cis-aconitilo, enlace hidrazona, enlace enzimáticamente degradable; véase en general, Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216. Las técnicas adicionales para conjugar restos a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy. En Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985). Los procedimientos para condensar o conjugar anticuerpos a restos polipeptídicos son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Ashkenazi *et al.*, 1991, PNAS 88: 10535-10539. La fusión de un anticuerpo a un resto no tiene que ser necesariamente directa, sino que se puede producir a través de secuencias enlazadoras. Dichas moléculas enlazadoras son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define anteriormente en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se define anteriormente en el presente documento, un vector como se define anteriormente en el presente documento, o un huésped como se define anteriormente en el presente documento.

30 Estos y otros modos de realización se divulgan y se engloban por la descripción y los ejemplos de la presente invención. Las técnicas y procedimientos recombinantes en inmunología se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición 2001; Lefkovits; Immunology Methods Manual; The Comprehensive Sourcebook of Techniques; Academic Press, 1997; Golemis; Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual; Cold Spring Laboratory Press, 2002. Literatura adicional relativa a uno cualquiera de los anticuerpos, procedimientos, usos y compuestos que se van a emplear de acuerdo con la presente invención se puede recuperar de bibliotecas y bases de datos públicas, usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Se puede utilizar, por ejemplo, la base de datos pública "Medline", disponible en Internet, por ejemplo, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Otras bases de datos y direcciones, tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobioaen.fr/>, <http://www.fmi.ch/bioinfo/researchtools.html>, <http://www.infobioaen.fr/>, <http://www.fmi.ch/bioinfo/researchtools.html>, <http://www.tiqr.orq/>. que son conocidas para el experto en la técnica también se pueden obtener usando, por ejemplo, <http://www.lvxos.com>. Para temas relacionados con tumores, véase por ejemplo, <http://www.nih.gov> o <http://www.dkfz.de>.

Las figuras muestran:

45 **Figura 1:** Análisis de unión FACS de varias construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas con CEA humano a células CHO transfectadas con CEA humano y células HPB-All positivas para CD3, respectivamente. Como control positivo para la unión a CEA, se ha usado el anticuerpo monoclonal Col-1. Para el control de la unión a CD3 humano, se usó una construcción monocatenaria biespecífica CD19xCD3 como se describe en el documento WO 99/054440. En este control positivo, la línea gruesa representa células incubadas con 10 µg/ml de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 purificado que se incubó posteriormente con el anticuerpo anti-His y el anticuerpo de detección. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células incubadas con el anticuerpo anti-His y el anticuerpo de detección. La actividad de unión para CEA humano (unido a membrana) y CD3 humano fue detectable para CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL, CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL, CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL, CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL. En los histogramas respectivos correspondientes a los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se describe en la invención, la línea fina representa el control negativo, la línea gruesa clara representa células incubadas con sobrenadante de cultivo, mientras que la línea gruesa oscura (más a la derecha) representa células incubadas con 10 µg/ml de anticuerpo monocatenario biespecífico purificado.

60 **Figura 2:** Señales de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos anti-CEA/anti-CD3 CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL, CEAI VHVLxSEQ ID NO. 77 VHVL y CEAI VHVLxSEQ ID NO. 77 VHVL y anticuerpo anti-CEA Col-1 para CEA soluble detectado por ELISA directo. Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAI VHVLxSEQ ID

NO. 77 VHVL (dominio de unión anti-CEA derivado del mAb A5B7), CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (dominio de unión anti-CEA derivado del mAb T84.66), y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (dominio de unión anti-CEA derivado del mAb MFE-23) y el anticuerpo monoclonal de ratón Col-1 se unieron específicamente a CEA humano soluble inmovilizado. No se observó ninguna señal de unión en ausencia del antígeno CEA soluble (control con PBS).

**Figura 3:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas se redirigieron a linfocitos T para lisar células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. Para demostrar la especificidad de la lisis redirigida, se incluyó una construcción monocatenaria biespecífica no reactiva para CEA como control negativo. Se pudo mostrar la actividad citotóxica frente a células diana transfectadas con CEA humano (células CHO-CEA<sup>+</sup>) para varias disposiciones de dominios, es decir, para SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VHVL y SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VLVH (ambas construcciones con dominio de unión anti-CD3 de forma N-terminal), así como para CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (dominio de unión anti-CD3 de forma C-terminal). Se usaron células CHO no transfectadas (carentes de CEA humano) como control negativo.

**Figura 4:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas se redirigieron a linfocitos T para lisar células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Para demostrar la especificidad de la lisis redirigida, se incluyeron células CHO no transfectadas como control negativo. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. CEA I-HL (CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL), CEA III-LH (CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL), CEA III-HL (CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL), y CEA II HL (CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL) mostraron actividad citotóxica frente a células CHO transfectadas con CEA humano. Se usaron células CHO no transfectadas (carentes de CEA humano) como control negativo para CEA I-LH (CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL), CEA III-HL (CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL) y CEA II HL (CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL). CEAI indica una región variable derivada del mAb murino A5B7, CEAI es una región variable derivada del mAb murino T84.66 y CEAI se refiere a una región variable del mAb murino MFE-23.

**Figura 5:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas se redirigieron a linfocitos T para lisar células CHO transfectadas con CEA en presencia de CEA humano soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La actividad citotóxica mediada por CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL no se inhibe por el incremento en las cantidades de CEA humano soluble, hasta 1 µg/ml. CEAI es una región variable derivada del mAb murino A5B7.

**Figura 6:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas se redirigieron a linfocitos T para lisar células CHO transfectadas con CEA en presencia de CEA humano soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La actividad citotóxica mediada por SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VHVL y SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VL VH no se inhibe por el incremento en las cantidades de CEA humano soluble, hasta 1 µg/ml. CEAI es una región variable derivada del mAb murino A5B7.

**Figura 7:** La construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA indicada se redirigió a linfocitos T para lisar células CHO transfectadas con CEA en presencia de CEA humano soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La actividad citotóxica de CEAI VHVLxSEQ ID NO. 77 VHVL se inhibe por el incremento en las cantidades de CEA soluble. CEAI VHVL se deriva del mAb T84.66.

**Figura 8:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas se redirigieron a linfocitos T para lisar células CHO transfectadas con CEA en presencia de CEA humano soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. Mientras que la citotoxicidad mediada por CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL es resistente a la inhibición por el antígeno CEA soluble, la actividad citotóxica mediada por CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL se inhibe incluso por cantidades bajas de CEA soluble. CEAI VHVL se deriva del mAb MFE-23, mientras que CEAI es una región variable derivada del mAb murino A5B7.

**Figura 9:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigieron linfocitos T para lisar células Kato III en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Se usaron PBMC humanas naturales como células efectoras. La actividad citotóxica mediada por CEAI VHVLxSEQ ID NO. 77 no es resistente a CEA soluble. CEAI VHVL se deriva del mAb T84.66.

**Figura 10:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigieron linfocitos T para lisar células Kato III en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La citotoxicidad mediada por CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL es resistente a CEA soluble. Por el contrario, la actividad citotóxica mediada por CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL se inhibe por un incremento en las cantidades de CEA soluble. CEAI VHVL se deriva del mAb T84.66, mientras que CEAI es una región variable derivada del mAb murino A5B7.

**Figura 11:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigieron linfocitos T para lisar células CHO transfectadas con CEA en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La actividad citotóxica mediada por CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL se inhibe por un incremento en las cantidades de CEA soluble.

CEAI VHVL se deriva del mAb T84.66.

**Figura 12:** Análisis por citometría de flujo de preparaciones periplásmicas que contienen fragmentos de proteína scFv marcados con Flag de clones seleccionados. Se añadieron preparaciones periplásmicas de fragmentos de proteína scFv soluble a de 100.000 a 200.000 células CHO transfectadas con CEA. Para la detección, se usó un anticuerpo monoclonal anti-Flag seguido de un anticuerpo policlonal antimurino marcado con PE. La unión de ScFv a las células se midió por un incremento en la intensidad de fluorescencia en comparación con las células que se incubaron con PBS solo. La intensidad de fluorescencia se representa en el eje X, el número de acontecimientos se representa en el eje Y. El control negativo (PBS y reactivos de detección) se muestra como una curva sombreada, los scFv respectivos se muestran como líneas grises. El desplazamiento a la derecha indica la unión positiva a las células. Todos los scFv, es decir, A-121, A-183, A-240, A-313, A-290, A-315, A4-35, A4-52 y MP2-A5, se unen a CEA unido a membrana en las células CHO. Cada uno de los scFv consiste en la región VH de A5B7 murino y una región VL humana, como se describe en ejemplo 6.

**Figura 13:** Análisis citométrico de flujo de preparaciones periplásmicas que contienen fragmentos de proteína scFv marcados con Flag de los seleccionados. Se añadieron preparaciones periplásmicas de fragmentos de proteína scFv soluble a de 100.000 a 200.000 células CHO transfectadas con CEA. La detección se realizó por un anticuerpo monoclonal anti-Flag seguido de un anticuerpo policlonal antimurino marcado con PE. La unión de ScFv a las células se midió por un incremento en la intensidad de fluorescencia en comparación con las células que se incubaron con PBS solo. La intensidad de fluorescencia se representa en el eje X, el número de acontecimientos se representa en el eje Y. El control negativo (PBS y reactivos de detección) se muestra como una curva sombreada, los scFv respectivos se muestran como líneas grises. El desplazamiento a la derecha indica la unión positiva a las células. Las construcciones de scFv completamente humanas MPS10\_3-AS.3, MPS10\_3-B9.1, y MPS10\_3-D8.1 se unen a CEA unido a membrana en las células CHO. Cada uno de estos scFv consiste en una región VH humana y la región VL humana A240, como se describe en ejemplo 7. 240 Vlambda.3 es un scFv que consiste en la región VH de ASB7 murino y la región VL A-240 humana. Esta construcción muestra también la actividad de unión a CEA.

**Figura 14:** Análisis de unión FACS de varias construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA humano a células Kato III y células HPB-AII, respectivamente. La línea gruesa representa células incubadas con sobrenadante de cultivo celular de células CHO transfectadas incubadas con el anticuerpo anti-His y el anticuerpo de detección. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células incubadas con el anticuerpo anti-His y el anticuerpo de detección. Las construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos humanos AS VHA240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL, B9 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL, y D8 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL se unen a CEA humano en células Kato y a CD3 humano en células HPB-AII. CEAI VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL con la región VH del dominio de unión a CEA derivado del mAb ASB7 muestra la misma actividad de unión.

**Figura 15:** Ensayo citotóxico de las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigidas a células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La actividad citotóxica se pudo detectar para AS VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL, B9 VH-A240 VLx SEQ ID NO.77 VHVL, D8 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL y CEAI VHA240 VLx SEQ ID NO.77 VHVL. CEAI VH es una región VH derivada del mAb ASB7.

**Figura 16:** Ensayo citotóxico de las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigidas a células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. Esta figura demuestra la actividad citotóxica para A240 VL-AS VHxSEQ ID NO.77 VHVL, A240 VLB9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL, A240 VL-D8 VHx SEQ ID NO.77 VHVL, y A240 VL-CEAI VHx SEQ ID NO.77 VHVL.

**Figura 17:** Ensayo citotóxico de las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigidas a células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La citotoxicidad frente a células diana CEA+ se muestra para SEQ ID NO.77 VHVLxAS VH-A240 VL, SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240 VL, SEQ ID NO.77 VHVLxD8 VH-A240 VL, SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VH-A240 VL y SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VLVH.

**Figura 18:** Ensayo citotóxico de las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigidas a células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La actividad citotóxica se muestra para SEQ ID NO.77 VHVLxA240 VL-AS VH, SEQ ID NO.77 VHVLxA240 VL-B9 VH, SEQ ID NO.77 VHVLxA240 VL-D8 VH, y SEQ ID NO.77 VHVLxA240VL-CEAI VH y SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VLVH.

**Figura 19:** Ensayo citotóxico de las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigidas a células CHO transfectadas con CEA en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La figura demuestra la resistencia de la actividad citotóxica de construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos humanos a antígeno CEA soluble, como se ejemplifica para AS VH-A240 VLx SEQ ID NO.77 VHVL y B9 VH-A240 VLx SEQ ID NO.77 VHVL.

**Figura 20:** Ensayo citotóxico de las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas redirigidas a células CHO transfectadas con CEA en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. Las construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos humanos D8 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL y CEAI VH-A240 VLx SEQ ID NO.77 VHVL también muestran resistencia a antígeno CEA soluble.

**Figura 21:** Las construcciones monocatenarias biespecíficas reactivas para CEA indicadas se redirigieron a linfocitos T para lisar células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Para demostrar la especificidad de la lisis redirigida, se incluyeron células CHO no transfectadas como control negativo. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. A240 VL-B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL, SEQ ID NO.77 VHVLxA240 VL-B9 VH, SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240 VL, B9 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL, y SEQ ID NO.77 VHVLxCEA I VHVL revelaron actividad citotóxica frente a células CHO transfectadas con CEA humano.

**Figura 22:** La construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA indicada redirigió linfocitos T para lisar células CHO-CEA+ en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Se usaron linfocitos T CD8+ humanos estimulados como células efectoras. La actividad citotóxica mediada por A240 VL-B9 VHx SEQ ID NO.77 VHVL es resistente a CEA soluble.

**Figura 23:** Cromatograma de intercambio catiónico de alta resolución de la construcción monocatenaria biespecífica A240 VL-B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL, la línea azul (curva superior) muestra las isoformas de carga global de la proteína. Se detectó un único máximo que muestra homogeneidad alta de la construcción.

**Figura 24:** Ensayo de estabilidad de proteína basado en la evaluación de la citotoxicidad después de la incubación en plasma humano durante 24 h. La construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA se redirigió a células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. La figura demuestra la estabilidad en plasma de la construcción monocatenaria biespecífica A240 VLB9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL en plasma humano. La actividad citotóxica de la construcción no se ve influenciada por las proteínas plasmáticas en condiciones fisiológicas.

**Figura 25:** Cromatograma de intercambio catiónico de alta resolución de la construcción monocatenaria biespecífica SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240 VL, la línea azul (curva superior) muestra las isoformas de carga global de la proteína. La figura demuestra la homogeneidad de la construcción monocatenaria biespecífica SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240 VL.

**Figura 26:** Ensayo de estabilidad de proteína basado en la evaluación de la citotoxicidad después de la incubación en plasma humano durante 24 h. La construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA se redirigió a células CHO transfectadas con CEA, en ausencia de CEA soluble. Se usaron CTL positivos para CD8 humanos estimulados como células efectoras. Esta figura demuestra la estabilidad en plasma de la construcción monocatenaria biespecífica SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240 VL en plasma humano. La actividad citotóxica de la construcción no se ve influenciada por las proteínas plasmáticas en condiciones fisiológicas.

**Figura 27:** La construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA indicada redirigió linfocitos T para lisar células CHO-CEA+ en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Se usaron linfocitos T CD8+ humanos estimulados como células efectoras. La actividad citotóxica mediada por la construcción monocatenaria biespecífica SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240 VL es resistente a CEA soluble.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

#### **EJEMPLO 1: Generación de células CHO transfectadas con CEA humano (molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario 5; CEACAM)**

Se usaron células Kato III positivas para CEA (línea celular de carcinoma gástrico humano; ATCC HTB-103) para obtener el ARN total que se aisló de acuerdo con las instrucciones del manual del kit (Qiagen, RNeasy Mini Kit). El ARN obtenido se usó para la síntesis de ADNc por transcripción inversa con cebado aleatorio. Para la clonación de la secuencia de longitud completa del antígeno CEA, se usaron los siguientes oligonucleótidos: 5' CEACAM5 EcoRI GMTTCGCCACCATGGAGTCTCCCTCGGCCCC (SEQ ID NO. 74) y 3' CEACAM5 Sal I GTCGACCTATATCAGAGCMCCCC (SEQ ID NO. 75). Se usó una PCR (desnaturalización a 93 °C durante 5 min, hibridación a 58 °C durante 1 min, alargamiento a 72 °C durante 1 min para el primer ciclo; desnaturalización a 93 °C durante 1 min, hibridación a 58 °C durante 1 min, alargamiento a 72 °C durante 1 min durante 30 ciclos; extensión terminal a 72 °C durante 5 min) para amplificar la secuencia codificante. Posteriormente se digirió el producto de PCR con EcoRI y SalI, se ligó en el vector de expresión apropiadamente digerido pEF-DHFR, y se transformó en E.coli. El ADN plasmídico aislado se secuenció y se comparó con la secuencia de nucleótidos establecida de CEACAM5 (NM\_004363 en el National Center for biotechnology information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los procedimientos mencionados anteriormente se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (1989; 2001). Se transfectó el clon con la secuencia nucleotídica verificada en células CHO deficientes en DHFR para la expresión eucariota de la construcción. La expresión de la proteína eucariota en células CHO deficientes en DHFR se realizó como se describe en Kaufmann (Kaufmann R.J., Methods Enzymol. 185 (1990), 537-566). La

amplificación génica de la construcción se indujo incrementando las concentraciones de MTX hasta una concentración final de MTX hasta 20 nM. Las células transfectadas se sometieron a prueba a continuación para determinar la expresión del antígeno CEA usando un ensayo FACS. Para este propósito, se incubaron 2,5x10<sup>5</sup> células transfectadas con 5 µg/ml del anticuerpo monoclonal murino COL-1 (No. MS-613-P1ABX, Neomakers; Fremont, CA, EE. UU.). La unión del anticuerpo se detectó con un anticuerpo específico de fragmento Fc-gamma, anti-IgG de ratón caprino, del fragmento F(ab')<sub>2</sub> purificado por afinidad conjugado con R-ficoeritrina, diluido 1:100 en 50 µl de PBS con FCS al 2 % (obtenido de Dianova, Hamburg, Alemania). Las células se analizaron por citometría de flujo en un FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg). La tinción de FACS y la medida de la intensidad de fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002). Como resultado, los transfectantes demostraron una tinción claramente positiva para el antígeno CEA humano.

**EJEMPLO 2: Generación de anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3**

En general, las moléculas de anticuerpos monocatenarios biespecíficos, comprendiendo cada una un dominio con especificidad de unión por el antígeno CEA humano así como un dominio desimmunizado con especificidad de unión por el antígeno CD3 humano representado en SEQ ID NO.77 se diseñaron como se expone en la tabla 1. La disposición de las regiones V en este dominio de unión a CD3 siempre es VH-VL. El dominio de unión anti-CD3 desimmunizado usado en los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define en el presente documento se ha descrito previamente, por ejemplo, en el documento WO2005/040220.

1. Formatos de moléculas de anticuerpos monocatenarios biespecíficos que comprenden las especificidades anti-CEA y anti-CD3 (tabla 1)

SEQ ID NO. (secuencia de aminoácidos)	Formatos de construcciones de proteína (extremo N-terminal → extremo C terminal)
2	SEQ ID NO.77 VHVL x CEA I VLVH
4	SEQ ID NO.77 VHVL x CEA I VHVL
6	CEA I VLVH x SEQ ID NO.77 VHVL
8	CEA I VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL
10	CEA II VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL
12	CEA III VLVH x SEQ ID NO.77 VHVL
14	CEA III VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL
16	CEA I VH-A240VL x SEQ ID NO.77 VHVL
18	A240VL - CEA I VH x SEQ ID NO.77 VHVL
20	SEQ ID NO.77 VHVL x CEA I VH - A240 VL
22	SEQ ID NO.77 VHVL x A240 VL - CEA I VH
24	A5 VH - A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL
26	A240 VL - A5 VH x SEQ ID NO.77 VHVL
28	SEQ ID NO.77 VHVL x A240 VL - A5 VH
30	SEQ ID NO.77 VHVL x A5 VH - A240 VL
32	B9 VH - A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL
34	A240 VL - B9 VH x SEQ ID NO.77 VHVL
36	SEQ ID NO.77 VHVL x B9 VH - A240 VL
38	SEQ ID NO.77 VHVL x A240 VL - B9 VH
40	D8 VH - A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL
42	A240 VL - D8 VH x SEQ ID NO.77 VHVL
44	SEQ ID NO.77 VHVL x D8 VH - A240 VL
46	SEQ ID NO.77 VHVL x A240 VL - D8 VH
126	A5 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL
128	SEQ ID NO.77 VHVLxA5 VH-A240VL#
130	B9 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL
132	SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240VL#
134	D8 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL
136	SEQ ID NO.77 VHVLxD8 VH-A240VL#
143	SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240VL

Las construcciones mencionadas anteriormente que contienen las regiones de cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) específicas para el antígeno CEA humano derivadas de anticuerpos monoclonales, hibridomas u obtenidas por selección guiada por presentación en fagos (SGPF) se obtuvieron por síntesis génica y posterior clonación en un vector de expresión que comprende las combinaciones VH y VL específicas para CD3. La generación de dichas construcciones monocatenarias biespecíficas también se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas recombinantes descritas, por ejemplo, en Sambrook (loc.cit.). Una instrucción detallada para la misma se



proporciona, por ejemplo, en el documento WO 99/054440.

El dominio de unión anti-CD3 corresponde a un dominio desinmunizado con especificidad de unión por el antígeno CD3 humano. La disposición de las regiones V del dominio de unión anti-CD3 desinmunizado en las construcciones monocatenarias biespecíficas descritas en el presente documento es siempre VH-VL. La secuencia de aminoácidos correspondiente de dicho dominio VH-VL se representa en SEQ ID NO. 77. CEAI, CEAI I y CEAI II específicos para el antígeno carcinoembrionario humano contienen las regiones de cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) derivadas del mAb A5B7 (Chester, K. A. *et al.*, Int J Cancer 57 (1994), 67-72), T84.66 (Neumaier, M. *et al.*, Cancer Res 50 (1990), 212834) y MFE-23 (Boehm, M. K. Biochem J 2 (2000), 519-28), respectivamente. A5, B9, D8, y E12 son regiones VH humanas específicas para CEA humano, mientras que A240 es una región VL humana con la misma especificidad. La generación de las regiones V de A5, B9, D8, E12 y A240 humanas se describe en detalle en los ejemplos 6 y 7. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes de todos los anticuerpos monocatenarios biespecíficos descritos en el presente documento se muestran en el listado de secuencias.

A continuación, la generación de la construcción CEA I VLVH x SEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO.6) se describe en más detalle. La generación de las otras construcciones mencionadas anteriormente se puede realizar en consecuencia con la implementación necesaria de modificaciones para los procedimientos que son bien conocidos en el alcance del experto en la técnica.

Para generar moléculas de anticuerpos monocatenarios biespecíficos que comprenden la especificidad de CEAI mencionado anteriormente y la especificidad anti-CD3 desinmunizado (SEQ ID NO.77), en primer lugar, las regiones variables de CEAI obtenido por síntesis génica de acuerdo con protocolos estándar se tuvieron que modificar por PCR para obtener el correspondiente fragmento de anticuerpo Fv monocatenario. Para este fin, se usó una PCR de fusión en dos etapas para amplificar la secuencia que codifica las regiones variables. Se diseñó un conjunto de cebadores apropiados para realizar las etapas de clonación basadas en PCR, dando como resultado finalmente un anticuerpo monocatenario que conecta los dos dominios variables con un enlazador de 15 aminoácidos ([Gly<sub>4</sub>Ser]<sub>3</sub>) en el orden VL-Enlazador-VH.

En resumen, se usaron las siguientes combinaciones de cebadores:

Etapa PCR	Cebadores usados		Etapa PCR	Cebadores usados	scFv resultante
1	5'CEAI LH + 3'CEAI VL Enlazador	->	PCR de fusión	5'CEAI LH + 3'CEAI LH	CEAI LH
2	5'CEAI VH Enlazador + 3'CEAI LH	->			

5'CEAI LH: 5' AGGTGTACACTCCGACATTGAGCTCACCCAG 3' (SEQ ID NO. 137)

3'CEAI VL Enlazador: 5' GGAGCCGCCGCCGAGAACACCACCACC TTTGATCTCGAGCTTGG 3' (SEQ ID NO. 138)

5'CEAI VH Enlazador: 5' GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTTCT CAGGTCCAAGTGCAGGAG 3' (SEQ ID NO. 139)

3'CEAI LH: 5' AATCCGAGGAGACGGTGACCG 3' (SEQ ID NO. 140)

Para generar el anticuerpo monocatenario, se realizaron dos PCR con las respectivas combinaciones de cebadores descritas anteriormente como etapa PCR 1 y 2. Durante esta PCR, se introdujeron secuencias complementarias superpuestas en los productos de PCR (que derivan de los respectivos cebadores de enlazadores) que se combinan para formar la secuencia codificante del enlazador de 15 aminoácidos durante la posterior PCR de fusión. Posteriormente, los dominios VH y VL amplificados se unieron en esta PCR de fusión en la que solo se requirieron los cebadores externos y ambos productos de PCR. El anticuerpo de scFv resultante se flanquea en el extremo 5' con el sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BspGI y en el extremo 3' con el sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BspEI. La adición del sitio BspGI se realizó para permitir la fusión en marco con la secuencia codificante de un péptido líder de inmunoglobulina murina como se describe en el documento WO2005/040220. El sitio BspEI se creó para permitir la fusión en marco con la secuencia que codifica el anticuerpo monocatenario específico de CD3 para generar el anticuerpo monocatenario biespecífico. Para llevar a cabo la fusión de los anticuerpos Fv monocatenarios y permitir la expresión eucariota, la secuencia codificante del anticuerpo Fv monocatenario específico de CEA se clonó por medio de BspGI y BspEI en el vector de expresión pEFDHFR (pEFDHFR se describió en Mack *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) que contiene el anticuerpo Fv monocatenario anti-CD3 desinmunizado como se describe en el documento WO2005/040220; en la presente invención denominado SEQ ID NO.77. Clones individuales de la construcción se aislaron y se secuenciaron con cebadores complementarios a regiones flanqueantes en el vector de expresión de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (1989)). Para experimentos adicionales, se seleccionó un clon de la construcción con una secuencia de nucleótidos seleccionada.

## 2. Expresión y purificación de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3

Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión eucariota de proteínas en células CHO deficitarias en DHFR se realizó como se describe en Kaufmann (loc. cit.). La amplificación de las construcciones se indujo incrementando las concentraciones de MTX hasta una concentración final de MTX hasta 20 nM. Después de dos pasos del cultivo estacionario, se hicieron crecer las células en frascos rotatorios con medio DMEM modificado para CHO (HiQ®, HiClone) durante 7 días antes de la recogida. Se retiraron las células por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20 °C.

Para la cromatografía se usaron el sistema Äkta® FPLC (Pharmacia) y el programa informático Unicorn®. Todos los productos químicos eran de calidad de investigación y se compraron de Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt). Se realizó una cromatografía de afinidad de metales inmovilizados ("IMAC") usando una columna Fractogel® (Merck) que se cargó con ZnCl<sub>2</sub> de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Se equilibró la columna con tampón A2 (tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,5, NaCl 0,4 M) y se aplicó el sobrenadante de cultivo celular (500 ml) a la columna (10 ml) a un caudal de 3 ml/min. Se lavó la columna con tampón A2 para retirar la muestra no unida. Se eluyó la proteína unida se eluyó usando un gradiente en 2 etapas de tampón B2 (tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,5, NaCl 0,4 M, imidazol 0,5 M) de acuerdo con lo siguiente:

Etapa 1: tampón B2 al 20 % en 6 volúmenes de columna;

Etapa 2: tampón B2 al 100 % en 6 volúmenes de columna.

Las fracciones de proteína eluida a partir de la etapa 2 se agruparon para su purificación adicional.

Se realizó una cromatografía de filtración en gel en una columna Sephadex S200 HiPrep (Pharmacia) equilibrada con PBS (Gibco). Las muestras de proteína eluidas (caudal 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y análisis de bandas western para su detección. Antes de la purificación, se calibró la columna para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Se determinaron las concentraciones de proteína usando un colorante de ensayo de proteínas (MicroBCA, Pierce) e IgG (Biorad) como proteína estándar.

Se aislaron los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3 en un procedimiento de purificación de dos etapas de IMAC y filtración en gel. El producto principal tenía un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones naturales, como se determina por filtración en gel en PBS. Este peso molecular corresponde al anticuerpo monocatenario biespecífico. Todas las construcciones se purificaron de acuerdo con este procedimiento.

La proteína de anticuerpo monocatenario biespecífico purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles bis-tris preformados al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y la aplicación de las muestras se realizaron de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Se determinó el peso molecular con patrón proteínico MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada fue de un > 95 %, como se determinó por SDS-PAGE.

El análisis de bandas western se realizó usando una membrana Optitrans® BA-S83 y el módulo de bandas de Invitrogen de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Se usaron anticuerpos dirigidos contra la marca His (Penta His, Qiagen) e Ig de cabra anti-ratón marcada con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. El anticuerpo monocatenario biespecífico se pudo detectar específicamente por análisis de bandas western. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente a la molécula de anticuerpo monocatenario biespecífico purificado.

## 3. Análisis de unión por citometría de flujo de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3

Para someter a prueba la funcionalidad de las construcciones con respecto a la capacidad de unión a CEA humano unido a membrana y CD3 humano, se realizó el análisis FACS. Para este propósito, se usaron células CHO transfectadas con CEA humano y la línea celular de leucemia de linfocitos T humanos positivos para CD3 HPB-AII (DSMZ, Braunschweig, ACC483). Se incubaron 200.000 células CHO positivas para CEA o 200.000 células HPB-AII durante 30 min en hielo con 50 µl del sobrenadante celular puro de cultivos de células CHO expresando cada uno anticuerpos biespecíficos con diferentes disposiciones de regiones VH y VL de CEA y CD3 (como se describe anteriormente). Las células se lavaron dos veces en PBS y la unión de la construcción se detectó con un anticuerpo Penta His murino no marcado (diluido 1:20 en 50 µl de PBS con FCS al 2 %; Qiagen), que se une específicamente a la construcción unida a célula por medio de la marca histidina C terminal de la construcción. Siguió una etapa de lavado para retirar el anticuerpo Penta His murino no unido. Se detectaron los anticuerpos anti-His unidos con un anticuerpo específico de Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en 50 µl de PBS con FCS al 2 %. Como control positivo para la unión a CEA humano, se ha usado el anticuerpo monoclonal Col-1 (véase el ejemplo 3). Para el control de la unión a CD3 humano, se ha utilizado una construcción monocatenaria biespecífica CD19xCD3 como se describe en el documento WO 99/054440. Como control negativo, se usó medio de cultivo recién preparado en lugar de sobrenadante de cultivo.

Las células se analizaron por citometría de flujo (FACS-Calibur; Becton Dickinson, Heidelberg). La tinción de FACS y

la medida de la intensidad de fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

5 Como se muestra en figura 1, varias disposiciones de dominios de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos, es decir, CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 8), CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 6), CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 10), CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 12) y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 14), se unieron al CEA unido a membrana humano y CD3 humano. Como control negativo, se han usado medio de cultivo y los anticuerpos de detección 1. y 2.

### EJEMPLO 3: Unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3 a CEA humano soluble

10 Para determinar la especificidad frente a CEA humano soluble, varios anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3 se sometieron a prueba en ELISA.

15 Para este fin, en primer lugar, se biotiniló el antígeno CEA humano soluble. La biotinilación se llevó a cabo PBS que contenía DMSO al 5 % (Sigma) con un exceso molar de quince veces de EZ-Link Sulfo NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) durante 1 hora a temperatura ambiente en un mezclador de muestras (Dyna). Para la separación de la biotina libre y el antígeno CEA biotinilado, el ensayo se dializó en exceso frente a PBS de acuerdo con protocolos estándar. La bioactividad mantenida del CEA marcado con biotina se confirmó en experimentos de unión de ELISA.

20 El ELISA directo para determinar la especificidad del anticuerpo monocatenario biespecífico CEAxCD3 frente a CEA humano soluble se llevó a cabo de acuerdo con procedimientos estándar. En resumen, se inmovilizaron 50 µl/pocillo de PBS o CEA humano biotinilado soluble (Abeam; 5 µg/ml en 1xPBS) en una placa de ELISA recubierta de estreptavidina de 96 pocillos (Nunc) incubando a 4 °C durante aproximadamente 16 horas. Después de lavar con 200 µl de agua por pocillo, se añadieron 200 µl de solución de bloqueo (PBS/3 % BSA). Después del bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente, se retiró la solución de bloqueo. Todas las posteriores etapas de lavado (200 µl/pocillo de 1xPBS/0,05 % (v/v) Tween20) e incubación se realizaron a temperatura ambiente. Después de lavar una vez, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 8; parte anti-CEA derivada de mAb A5B7), CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 10; parte anti-CEA derivada de mAb T84.66), y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 14; parte anti-CEA derivada de mAb MFE-23), y el anticuerpo monoclonal de ratón CEA/CD66 Ab-3 (Col-1; Dunn) se incubaron en diferentes concentraciones (0,5 µg/ml y 5 µg/ml en 1xPBS; 50 µl/pocillos) durante 1 hora. Se añadió 1xPBS (50 µl/pocillo) como control para la unión no específica. Se realizaron 3 etapas de lavado seguidas de adición de 50 µl/pocillo de IgG Penta-His (Qiagen; µg/ml en 1xPBS) para la detección de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos marcados con His. 25 Posteriormente, los pocillos se lavaron 3 veces y se incubaron con 50 µl de un anticuerpo específico de Fc gamma antimurino de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmuneResearch; 1:1000 en 1xPBS) durante 1 hora. Después de lavar 3 veces, el ELISA se desarrolló añadiendo solución de sustrato ABTS (Roche) y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 405 nm.

35 La figura 2 muestra la absorbancia de los diferentes anticuerpos monocatenarios biespecíficos detectados en el ELISA. Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 8; parte anti-CEA derivada de mAb A5B7), CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 10; parte anti-CEA derivada de mAb T84.66), y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 14; parte anti-CEA derivada de mAb MFE-23) y el anticuerpo monoclonal de ratón Col-1 se unieron específicamente a CEA humano soluble. No se observó ninguna señal de unión en ausencia del antígeno CEA (control con PBS). En resumen, los dominios de unión anti-CEA derivados de los mAb A5B7, T84.66 y MFE-23 se unen a CEA tanto soluble como unido a membrana.

### EJEMPLO 4: Bioactividad de anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3

45 La bioactividad de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3 generados por ensayos de citotoxicidad de liberación de cromo *in vitro* usando la línea celular de carcinoma gástrico humano Kato III o las células CHO transfectadas con CEA humano como células diana y linfocitos T positivos CD8 humanos estimulados o PBMC naturales como células efectoras, respectivamente.

La generación de los linfocitos T CD8+ estimulados se realizó como sigue:

50 Una placa Petri (145 mm de diámetro, Greiner bio-one) se precubrió con un anticuerpo anti-CD3 (OKT3 Janssen-Cilag GmbH, Orthoclone 1 mg/ml; concentración final 1 µg/ml) y un anticuerpo anti-CD28 (BD, 1 mg/ml; concentración final 1 µg/ml) durante 1 hora a 37 °C. Después del período de incubación, la proteína no unida se retiró por una etapa de lavado con PBS. Se aislaron las PBMC recién obtenidas a partir de sangre periférica (30 - 50 ml) por centrifugación en gradiente de Ficoll de acuerdo con protocolos estándar. Se añadieron 3 - 5 x 10<sup>7</sup> PBMC a la placa de Petri recubierta previamente en 150 ml de RPMI 1640 / FCS al 10 % / IL-2 20 U/ml (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día, las células se recogieron, se lavaron una vez con RPMI 1640 y se transfirieron a un matraz T grande. Se añadió IL-2 hasta una concentración final de 20 U/ml y se cultivó de nuevo 55 durante un día. Los CD8+ CTL se aislaron con ayuda del kit de aislamiento CD8 negativo (Dyna Biotech) siguiendo las instrucciones del manual. Las PBMC naturales se usaron directamente después de la centrifugación en gradiente de Ficoll sin el procedimiento de estimulación. Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de <sup>51</sup>Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con FCS al 50 % durante 45 minutos a 37 °C.

Posteriormente, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y después se usaron en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de fondo redonde de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI complementado (como antes) con una proporción E:T de 10:1 correspondiente a 5000 células diana y 50000 células efectoras por pocillo. Para la evaluación de las construcciones, se aplicaron una concentración de partida de 1 µg/ml de las moléculas monocatenarias biespecíficas en el volumen de ensayo y diluciones de 12 veces de las mismas. El tiempo de ensayo fue de 18 horas y la citotoxicidad se midió como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante en relación con la diferencia de lisis máxima (adición de Triton-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las medidas se realizaron por triplicado. La medida de la actividad del cromo en los sobrenadantes se realizó con un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los datos experimentales se realizó con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EE. UU.). Típicamente, las curvas sigmoidales de respuesta a dosis tuvieron valores de  $R^2 > 0,90$ , determinados por el programa informático. Los valores de  $CE_{50}$  calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

La figura 3 muestra la actividad citotóxica frente a células diana transfectadas con CEA humano (células CHO-CEA<sup>+</sup>) para varias disposiciones de dominios, es decir, para SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VHVH (SEQ ID NO. 4) y SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VLVH (SEQ ID NO. 2) (ambas construcciones con parte anti-CD3 de forma N-terminal), así como para CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 6) y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVH (SEQ ID NO. 8) (anti-CD3 de forma C-terminal). Se usaron células CHO no transfectadas (carentes de CEA humano) como control negativo.

En la figura 4, CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVH (SEQ ID NO. 8), CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVH (SEQ ID NO. 12), CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVH (SEQ ID NO. 14), y CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVH (SEQ ID NO. 10) presentaron actividad citotóxica frente a células CHO transfectadas con CEA humano. Se usaron células CHO no transfectadas (carentes de CEA humano) como control negativo. Como se ha expuesto anteriormente, CEAI indica una región variable derivada del mA b murino A5B7, CEAI es una región variable derivada del mA b murino T84.66 y CEAI se refiere a una región variable del mA b murino MFE-23.

En resumen, todas las construcciones sometidas a prueba mostraron actividad citotóxica frente a células Kato III que expresan CEA (humano) y células CHO transfectadas con CEA humano, en ausencia de CEA humano soluble.

#### **EJEMPLO 5: Bioactividad de anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3 específicos en presencia de antígeno CEA soluble**

Los ensayos de competición se realizan como se describe en el ejemplo 4, con la siguiente excepción: La bioactividad de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3 se somete a prueba en presencia de varias concentraciones de antígeno CEA humano soluble. El antígeno CEA humano soluble (AbCAM Ltd. Cambridge, Reino Unido) usado se aisló de un carcinoma colónico metastásico del hígado de un único paciente. Experimentalmente, el ensayo de competición se llevó a cabo por preincubación de una cantidad dada del anticuerpo monocatenario biespecífico con el incremento en las cantidades de antígeno CEA humano soluble (0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 1 µg/ml, o bien 0 µg/ml; 0,004 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C antes de la adición de las células. El resto del ensayo se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 4. Los resultados de estos experimentos de competición se muestran en las figuras 5 a 11.

La actividad citotóxica de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVH (SEQ ID NO. 10; véanse las figuras 7 y 9 a 11) con la parte anti-CEA derivada del mA b T84.66, y CEAI VLVHxSEQ ID NO. 77 VHVH (SEQ ID NO. 12; véase la figura 8) con la región anti-CEA derivada del mA b MFE-23, frente a células diana positivas para CEA humano se inhibió drásticamente por el incremento en las cantidades de antígeno CEA humano soluble. Como se ha expuesto anteriormente, dichas construcciones se unen al antígeno CEA tanto unido a membrana como CEA humano soluble; véanse por ejemplo, los ejemplos 2 y 3 y las figuras 1 y 2. Por tanto, lo más probablemente, el CEA humano soluble evita que dicha parte anti-CEA de dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos se una al CEA unido a membrana humano en las células diana, por ejemplo, células tumorales CHO-CEA<sup>+</sup> o Kato III, inhibiendo de este modo la actividad citotóxica mediada por dichas construcciones de anticuerpos.

Por el contrario, sorprendentemente se ha descubierto que los anticuerpos monocatenarios biespecíficos con una parte anti-CEA derivada del mA b A5B7 son resistentes a CEA humano soluble: Por ejemplo, la actividad citotóxica mediada por CEAI VLVHxSEQ ID NO.77 VHVH (SEQ ID NO. 6; véase la figura 5), CEAI VHVLxSEQ ID NO.77 VHVH (SEQ ID NO. 8; véanse las figuras 5, 8 y 10), SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VHVH (SEQ ID NO. 4; véase la figura 6) y SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VLVH (SEQ ID NO. 2; véase la figura 6) no se inhibe por el incremento en las cantidades de CEA humano soluble, ni tampoco por concentraciones altas (1 µg/ml). Esto no se podía esperar en vista del hecho de que la parte anti-CEA de dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos se unen a CEA humano soluble (figura 2). Más bien, se podía haber esperado la inhibición de la actividad citotóxica frente a células diana positivas para CEA por el incremento en las cantidades de CEA humano soluble, como era el caso para construcciones derivadas de T84.66- y MFE-23; véase anteriormente.

Por tanto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas con actividad antitumoral citotóxica incluso en presencia de niveles altos de antígeno CEA soluble. Por lo tanto, estas composiciones farmacéuticas son

particularmente adecuadas para el tratamiento de pacientes con tumores con concentraciones de antígeno CEA soluble altas en su plasma, tales como pacientes con tumores progresivos epiteliales, tumores epiteliales metastásicos, carga/masa tumoral alta, tumores en estadio tardío epiteliales o pacientes con tumores con una concentración sérica de CEA mayor de 100 ng/ml, como se determina por ELISA.

## 5 EJEMPLO 6: Selección de regiones VL humanas

Para proporcionar composiciones farmacéuticas con una reducción en la inmunogenicidad cuando se administran a pacientes con cáncer, se han generado anticuerpos monocatenarios biespecíficos humanos con resistencia a antígeno CEA soluble. En una primera etapa, se han aislado regiones VL humanas con resistencia a CEA soluble. Por tanto, el objetivo de este experimento es la selección de regiones VL humanas que se puedan emparejar con la VH murina materna del anticuerpo monoclonal (mAb) A5B7.

### 1. Biotinilación del antígeno CEA humano soluble

Para la selección de la colección de fagos, se biotiniló el antígeno CEA soluble. La biotinilación se llevó a cabo PBS que contenía DMSO al 5 % (Sigma) con un exceso molar de quince veces de EZ-Link Sulfo NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) durante 1 hora a temperatura ambiente en un mezclador de muestras (Dyna). Para la separación de la biotina libre y el antígeno CEA biotinilado, el ensayo se dializó en exceso frente a PBS de acuerdo con protocolos estándar. La bioactividad mantenida del CEA marcado con biotina se confirmó en experimentos de unión de ELISA.

### 2. Aislamiento de ARN de linfocitos B humanos

Se extrajeron 100 ml de sangre de cinco donantes humanos sanos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por un gradiente de Ficoll de acuerdo con procedimientos estándar. El ARN total se aisló de las células aisladas usando el kit RNeasy® Midi Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó de acuerdo con procedimientos estándar (Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989,2001).

### 3. Amplificación por PCR de regiones de cadena ligera variables (regiones VL)

Para el aislamiento de ADN con región V de cadena ligera, se llevó a cabo una RT-PCR usando los conjuntos de cebadores V-kappa- (5'-huVK1-Sacl-2001 (5'-GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CCAGATGACC 30 CAGTCTCC-3') (SEQ ID NO. 78), 5'-huVK2/4-Sacl-2001 (5'-GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATGACY CAGTCTCC-3') (SEQ ID NO. 79), 5'-huVK3-Sacl-2001 (5'-GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGWTGACR CAGTCTCC-3') (SEQ ID NO. 80), 5'-huVK5-Sacl-2001 (5'-GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CACTACTCAG CAGTCTCC-3') (SEQ ID NO. 81), 5'-huVK6-Sacl-2001 (5'-GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGCTGACT CAGTCTCC-3') (SEQ ID NO. 82), 3'-hu-Vk-J1-Spel-BsiWI (5'-GACGACACTA GTTGCAGCCA CCGTACGTTT GATTCCACC TTGGTCC-3') (SEQ ID NO. 83), 3'-hu-Vk-J2/4-Spel-BsiWI (5'-GACGACACTA GTTGCAGCCA CCGTACGTTT GATCTCCASC TTGGTCC-3') (SEQ ID NO. 84), 3'-hu-Vk-J3-Spel-BsiWI (5'-GACGACACT A GTTGCAGCCA CCGTACGTTT GATATCCACT TTGGTCC-3') (SEQ ID NO. 85), 3'-hu-Vk-J5-Spel-BsiWI (5'-GACGACACTA GTTGCAGCCA CCGTACGTTT AATCTCCAGT CGTGTCC-3') (SEQ ID NO. 86)) y V lambda (5'-huVL1a-Sacl-2001 (GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC GTG TTG ACG CAG CCG CCC TC) (SEQ ID NO. 87), 5'-huVL1b-Sacl-2001 (GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC GTG CTG ACT CAG CCA CCC TC) (SEQ ID NO. 88), 5'-huVL2-Sacl-2001 (GAG CCG CAG GAG CCC GAG CTC GCC CTG ACT CAG CCT SCC TCC GT) (SEQ ID NO. 89), 5'-huVL4-Sacl-2001 (ACC TGC GAG CTC GTG CTG ACT CAR YCM YCC TCT GC) (SEQ ID NO. 90), 5'-huVL5-Sacl-2001 (ACC TGC GAG CTC GTG CTG ACT CAG CCR SCT TCC) (SEQ ID NO. 91), 5'-huVL6-Sacl-2001 (ACC TGC GAG CTC ATG CTG ACT CAG CCC CAC TC) (SEQ ID NO. 92), 5'-huVL3/9-Sacl-2001 (GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC GWG CTG ACT CAG CCA CCY TC) (SEQ ID NO. 93), 5'-huVL7/8-Sacl-2001 (GAG CCG CAC GAG CCC GAG CTC GTG ACY CAG GAG CCM TC) (SEQ ID NO. 94), 3'-hu-Vlam-Blnl-Spel-2001 (CGT GGG ACT AGT CTT GGG CTG ACC TAG GAC GGT) (SEQ ID NO. 95), 3'-hu-Vlam2-Blnl-Spel-2002: CGT GGG ACT AGT CTT GGG CTG ACC GAG GAC GGT) (SEQ ID NO. 96).

El ARN de linfocitos B humanos se transcribió en ADNc (como se describe anteriormente) y se usó como ADN molde en las reacciones de PCR. Por reacción de PCR, se combinó un cebador en 5' con un cebador en 3'. El número de diferentes reacciones de PCR se determinó por el número de combinaciones posibles de cebadores en 5' y 3'. El siguiente programa de PCR se usó para la amplificación: la desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación de cebadores a 52°C durante 50 segundos y extensión de cebadores a 72°C durante 90 segundos se realizaron durante 40 ciclos, seguido de extensión final a 72°C durante 10 minutos. A continuación, los fragmentos V de ADN de cadena ligera se aislaron de acuerdo con protocolos estándar.

### 4. Construcción de la colección - clonación de la fracción VL humana

En general, se construyó una colección de presentación en fagos basada en procedimientos estándar, como se divulga, por ejemplo, en "Phage Display: A Laboratory Manual"; Ed. Barbas, Burton, Scott & Silverman; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Los cebadores elegidos para la amplificación de PCR dieron lugar a los sitios de reconocimiento 5'-Sacl y 3'-SpeI para los fragmentos V de cadena ligera. Se establecieron cuatro reacciones de unión, consistiendo cada una en 400 ng de fragmentos de cadena ligera (digerido Sacl-Spel, 2 x kappa y 2 x lambda) y 1400 ng del fagémido

pComb3H5BHis (digerido SacI-SpeI; fragmento grande; este vector se describe en la tesis doctoral del Dr. Ralf Lutterbuse. Las cuatro fracciones de cadena ligera V de anticuerpo resultantes se transformaron cada una en 300 µl de XL1 Blue de Escherichia coli electrocompetentes por electroporación (2,5 kV, cubeta de 0,2 cm de paso, 25 mF, 200 Ohm, Biorad Gene Pulser) dando como resultado tamaños de colecciones de

5 kappa1:  $2 \times 10^8$

kappa2:  $6 \times 10^7$

lambda1:  $9 \times 10^7$

lambda2:  $6 \times 10^7$

clones independientes.

- 10 Los fragmentos de ADN kappa (cadena ligera) de las diferentes amplificaciones de PCR se pesaron para cada unión como sigue: Cada cebador en 5' define un grupo específico. Dentro de estos grupos, los cebadores en 3' definen los subgrupos. Los subgrupos kappa se pesaron 1:2:1:1 correspondientes a los cebadores 3'-hu-Vk-J1-SpeI-BsiWI : 3'-hu-Vk-J2/4-SpeI-BsiWI : 3'-hu-Vk-J3-SpeI-BsiWI : 3'-hu-Vk-J5-SpeI-BsiWI. Los grupos se pesaron de acuerdo con su distribución de línea germinal 1:1:1:0.2:0.2 correspondiente a los cebadores 5'-huVK1-Sac-2001 : 5'-huVK3-Sac-2001 : 5'-huVK2/4-Sac-2001 : 5'-huVK5-Sac-2001 : 5'-huVK6-Sac-2001.

Los fragmentos de ADN lambda (cadena ligera) de las diferentes amplificaciones de PCR se pesaron para cada unión como sigue: Cada cebador en 5' define un grupo específico. Dentro de estos grupos, los cebadores en 3' definen los subgrupos. Los subgrupos lambda se pesaron 3:1 correspondientes a los cebadores 3'-hu-Vlam-BlnI-SpeI-2001: 3'-hu-Vlam2-BlnI-SpeI-2002.

- 20 Los grupos se pesaron de acuerdo con su distribución de línea germinal 1:1:2:2:2:3 correspondiente a los cebadores 5'-huVL1a-SacI-2001: 5'-huVL1b-SacI-2001 : 5'-huVL2-SacI-2001: 5'-huVL4-SacI-2001 + 5'-huVL5-SacI-2001 : 5'-huVL6-SacI-2001 + 5'-huVL7/8-SacI-2001 : 5'-huVL3/9-SacI-2001.

- 25 Después de la electroporación, cada reacción se incubó en caldo SOC (Fluka) para la expresión del fenotipo. Los dos cultivos de kappa se combinaron así como los dos cultivos de lambda. El cultivo de kappa resultante y el cultivo de lambda resultante se incubaron a continuación cada uno en 500 ml de medio de selección SB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y un 2 % p/v de glucosa durante la noche. El día siguiente, las células se recogen por centrifugación y se llevó a cabo la preparación de plásmidos usando un kit de preparación de plásmidos comercialmente disponible (Qiagen).

#### 5. Construcción de la colección de anticuerpos - VL humana - VH materna

- 30 Se realizó una PCR para amplificar la VH materna del mAb A5B7 a partir de un vector que contenía dicha VH materna. Para la amplificación, se siguió un protocolo de PCR de acuerdo con procedimientos estándar usando el cebador en 5' 5'-AVH-XhoI (5'-GTC ACA CTC GAG TCA GGA GGC TTG GTA C-3') (SEQ ID NO. 97) y el cebador en 3' 3'-AVH-BstEII (5'-GTC ACA GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA G-3') (SEQ ID NO. 98). Después de la purificación del producto de amplificación de aproximadamente 350 pb a partir de un gel de agarosa analítico, el fragmento de ADN se cortó con las enzimas de restricción BstEII y XhoI. El fagémido pComb3H5BHis (este vector se describe en la tesis doctoral del Dr. Ralf Lutterbiise) se digirió en consecuencia y el fragmento grande se unió con el fragmento mencionado anteriormente. Después de la transformación en XL1 blue de E. coli, se cultivó un único clon en 100 ml de medio SB (que contenía 50 µg/ml de carbenicilina) y el plásmido se preparó de acuerdo con protocolos estándar. La clonación exitosa se confirmó secuenciando la inserción (Sequiserve, Múnich).
- 40 Este vector pComb3H5BHis/maternalVH del mAb A5B7 se restringió con las enzimas de restricción SacI y SpeI. El fragmento de vector grande se aisló. El ADN plasmídico que contenía la colección de Vkappa y de Vlambda se restringió con las enzimas de restricción SacI y SpeI. El fragmento pequeño Vkappa - y el Vlambda respectivo (cada uno de aproximadamente 350 pb) se aislaron de acuerdo con protocolos estándar. Se unieron 1200 ng del fragmento de vector con una mezcla de cada uno de 200 ng de ambos fragmentos de Vkappa y Vlambda. La reacción de unión se transformó en 300 µl de XL1 Blue de E. coli electrocompetente por electroporación (2,5 kV, cubeta de 0,2 cm de paso, 25 mF, 200 Ohm) dando como resultado un tamaño de colección de scFv total de  $1.2 \times 10^8$  clones independientes.

- 50 Después de la expresión del fenotipo y la adaptación lenta a la carbenicilina, se transfirió la colección de anticuerpos a medio de selección SB-carbenicilina (50 µg/ml). A continuación, la colección de anticuerpos se infectó con una dosis infecciosa de  $1 \times 10^{12}$  partículas de fago colaborador VCSM13, dando como resultado la producción y secreción de fago filamentosos M13, en el que cada partícula de fago contenía pComb3H5BHis-ADN monocatenario que codifica un fragmento scFv semihumano y presentó la proteína scFv correspondiente como una fusión traduccional a la proteína de cubierta del fago III.

#### 6. Selección de presentación en fagos de una VL humana

- Las partículas de fagos que llevan el repertorio de scFv se recogieron del sobrenadante de cultivo por precipitación con PEG8000/NaCl y centrifugación. A continuación, aproximadamente de  $1 \times 10^{11}$  a  $1 \times 10^{12}$  partículas de fago scFv se resuspendieron en 0,5 ml de TBS/1 % BSA y se incubaron con CEA soluble biotinilado, que se inmovilizó en pocillos recubiertos con estreptavidina de una placa de ELISA (Nunc) durante 1 h. Una solución de 10  $\mu$ g antígeno/ml PBS (50  $\mu$ l) se incubó durante la noche a 4°C en los pocillos recubiertos con estreptavidina, se lavó una vez con agua, seguido de bloqueo durante 1 hora a 37°C con 200  $\mu$ l de BSA al 3 % en TBS, que se retiró después de la incubación.
- Los fagos scFv que no se unieron específicamente al antígeno diana se eliminaron por etapas de lavado con TBS/0,05 % Tween. Este procedimiento de lavado se repitió hasta 10 veces en rondas adicionales.
- Después de lavado, las entidades de unión se eluyeron usando HCl-glicina, pH 2,2. Después de la neutralización con Tris 2 M, pH 12, el eluato se usó para la infección de un cultivo XL1 Blue de *E. coli* no infectado recién preparado.
- Para eluir las restantes entidades de unión alta, se añadieron 50  $\mu$ l de un cultivo de XL1 blue de *E. coli* recién preparado (DO600  $\geq$  0,5) a los pocillos y se incubó durante 15 minutos. Ambos cultivos se mezclaron a continuación y las células transducidas exitosamente con una copia de fagémido, que codifica un fragmento scFv humano, se seleccionaron de nuevo por su resistencia a carbenicilina y se infectaron posteriormente con el fago colaborador VCMS13 para comenzar el segundo ciclo de presentación de anticuerpos y selección *in vitro*.
- El ADN plasmídico correspondiente a 4 ciclos de fijación se aisló a de los cultivos de *E. coli*. Para la producción de proteína scFv soluble, los fragmentos de ADN VH-VL se extrajeron de los plásmidos (XhoI-SpeI), y se clonaron por medio de los mismos sitios de restricción en el plásmido pComb3H5BFlag/His, en el que la construcción de expresión (por ejemplo, scFv) incluye una marca Flag (TGDYKDDDDK) (SEQ ID NO. 99) entre el scFv y la marca His6 y las proteínas de fago adicionales se eliminan.
- Después de la unión, se transformó cada fracción (diferentes ciclos de fijación) de ADN plasmídico en 100  $\mu$ l de TG1 de *E. coli* competente para choque térmico y se plaqueó sobre medio con carbenicilina LB-agar. Se recogieron colonias individuales y se inocularon en 120  $\mu$ l de LB carb (50  $\mu$ g/ml) glucosa al 1 % en placas de 96 pocillos (Greiner). Los pocillos se sellaron con una membrana semipermeable (Greiner) y las placas se incubaron durante la noche a 37 °C en un incubador con agitación (placa madre). A continuación, se transfirieron 10  $\mu$ l los cultivos de la placa madre en una segunda placa de 96 pocillos (placa de trabajo) que contenía 90  $\mu$ l de LB carb (50  $\mu$ g/ml) y glucosa al 0,1 % por pocillo. Después de la incubación durante 4 h en un incubador de agitación a 37 °C, la producción de scFv se indujo añadiendo 20  $\mu$ l de LB carb e IPTG 6 mM a cada pocillo. Después de otra etapa de incubación durante la noche a 30 °C con agitación, las células se lisaron en una incubación de 1 h a temperatura ambiente con 40  $\mu$ l de tampón lisis (ácido bórico 400 mM, NaCl 320 mM, EDTA 4 mM pH 8, 2,5 mg/ml de lisozima). Las células residuales y los restos celulares se separaron por centrifugación durante 12 minutos a 1.900 x g (Hettich).
- Los sobrenadantes que contenían las moléculas scFv se sometieron a prueba a continuación para determinar la unión en ensayos de unión por citometría de flujo. Las células CHO transfectadas con CEA humano se usaron como línea celular positiva para CEA. Los ensayos de unión celular se llevaron a cabo incubando inicialmente entre 100.000 y 200.000 células con preparación periplásmica que contenía scFv humano o controles relevantes. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS/1 % FCS (suero fetal bovino) y se incubaron adicionalmente con 5-10  $\mu$ g/ml de anticuerpos anti-FLAG M2 (Sigma). Después de que se hayan lavado de nuevo las células, se incubaron con anticuerpos antimurinos marcados con PE policlonales (Dianova) y posteriormente se analizaron por citometría de flujo. Se sometieron a prueba aproximadamente 600 clones para determinar señales de unión en células CHO positivas para CEA. Se obtuvieron 27 clones positivos. Después de la secuenciación del respectivo ADN scFv, se obtuvieron un total de 9 secuencias diferentes.
- La figura 12 representa la unión de las nueve construcciones de scFv semihumanas diferentes (es decir, VH A5B7 murina-VL humana) para varias líneas celulares como se mide por análisis por citometría de flujo. La figura contiene múltiples diagramas, uno para cada construcción sometida a prueba. En cualquier diagrama dado, la distribución en color negro muestra la intensidad de fluorescencia para células incubadas solo con PBS solo en ausencia de cualquier construcción pero con todos los agentes de detección apropiados como se usa para la detección de los scFv. De esta forma, cualquier desplazamiento de fluorescencia observado se puede atribuir definitivamente a la construcción scFv en lugar de a agentes de detección o al tampón. Los desplazamientos en fluorescencia que son indicativos de unión de construcción a la respectiva línea celular se representan por una línea gris en cada diagrama. En general, un desplazamiento de mayor magnitud lejos de, es decir, más allá del control (negro) indica una unión más fuerte, mientras que un desplazamiento de menor magnitud lejos de, es decir, más próximo al control (negro) indica una unión más débil.
- Se puede observar de la figura 12 que las construcciones A-121, A-183, A-240, A-313, A-290, A-315, A4-35, A4-52, MP2-A5 muestran desplazamientos claramente apreciables en la intensidad de fluorescencia en comparación con el control respectivo, indicativo de unión de los scFv a CEA unido a membrana en las células diana CHO. A continuación, la región VL humana de scFv A-240 (SEQ ID NO. 48) se ha seleccionados y usado para el aislamiento

de una región VH humana. Dicha región VL humana se representa en las SEQ ID NO. 63 (secuencia de nucleótidos) y 64 (secuencia de aminoácidos).

**EJEMPLO 7: Construcción de las colecciones de anticuerpos y selección de presentación en fagos de regiones VH humanas resistentes al antígeno CEA soluble**

5 El objetivo de los siguientes experimentos es la selección de un conjunto de regiones VH humanas resistentes al antígeno CEA soluble que se empareja con la región VL humana de scFv A-240, seleccionada como se describe en el ejemplo 6. Dicha región VL humana se representa en las SEQ ID NO. 63 (secuencia de nucleótidos) y 64 (secuencia de aminoácidos).

1. Aislamiento de ARN a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

10 Se extrajeron 100 ml de sangre de cinco donantes humanos sanos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por un gradiente de Ficoll de acuerdo con procedimientos estándar. El ARN total se aisló de PBMC usando el kit RNeasy® Midi Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó de acuerdo con procedimientos estándar (Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 2001).

2. Amplificación por PCR de regiones de cadena pesada variables (regiones VH)

15 La colección de VH se construyó y se denominó Lib 134-VH. Esta colección de VH consiste en el repertorio humano de FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 de las regiones VH amplificadas con PCR de la fracción de PBMC descrita anteriormente, unidas de forma funcional al VH CDR3 del anticuerpo materno seguido de una secuencia de línea germinal FR4 humana.

20 Para el aislamiento de las regiones VH de molde humanas, se llevó a cabo una RT-PCR usando un conjunto de cebadores específicos de VH en 5' (5'-huVH1,3,5-Xhol-2001 (5'-AGG TGC AGC TGC TCG AGT CTG G-3') (SEQ ID NO. 100), 5'-huVH4-Xhol-2001 (5'-CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG-3') (SEQ ID NO. 101), 5'-huVH4B-Xhol-2001 (5'-CAG GTG CAG CTA CTC GAG TGG GG-3') (SEQ ID NO. 102)) y un conjunto de dos cebadores específicos de VH en 3' (3'-hu-VH-BstEII-2001 (5'-CTG AGG AGA CGG TGA CC-3') (SEQ ID NO. 103), 3'-hu-VH-J3-BstEII-2001 (5'-CTG AAG AGA CGG TGA CC-3') (SEQ ID NO. 104)). Por reacción PCR, un cebador en 5' se combinó con un cebador en 3'; el número de reacciones PCR diferentes se determinó por el número de posibles combinaciones de cebadores en 5' y 3'. El ADNc de PBMC de cinco donantes se usó como fuente de genes VH. El siguiente programa de PCR se usó para la amplificación: la desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación de cebadores a 52°C durante 50 segundos y extensión de cebadores a 72°C durante 60 segundos se realizó durante 40 ciclos, seguido de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de amplificación con un tamaño de aproximadamente 350 pb se aislaron de acuerdo con procedimientos estándar.

35 Para el aislamiento de regiones Lib 134-VH, se llevó a cabo una RT-PCR en dos etapas. En primer lugar, los segmentos VH de cadena pesada humanos (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3) se amplificaron con PCR a partir de los fragmentos VH de molde aislados usando el mismo conjunto de cebadores específicos de VH en 5' como se describe anteriormente (5'-huVH1,3,5-Xhol-2001, 5'-huVH4-Xhol-2001, 5'-huVH4B-Xhol-2001; SEQ ID NO. 100-102) y un conjunto de cebadores específicos en 3' (3'-A134-VH1A (5'-GTA GTC AAA GTA GAA CCG TAG CCC CCT ATC TCT YGC ACA GTA ATA CAC GGC-3') (SEQ ID NO. 105), 3'-A134-VH1B (5'-GTA GTC AAA GTA GAA CCG TAG CCC CCT ATC TCT YGC ACA GTA ATA CAY RGC -3') (SEQ ID NO. 106), 3'-A134-VH3A (5'-GTA GTC AAA GTA GAA CCG TAG CCC CCT ATC TCT TGY ACA GTA ATA CAC RGC -3') (SEQ ID NO. 107), donde la "T" indicada también se puede reemplazar por "A", "C" o "G", 3'-A134-VH3B (5'-GTA GTC AAA GTA GAA CCG TAG CCC CCT ATC TCT TGC ACA GTA ATA CAA RGC -3') (SEQ ID NO. 108), donde la "T" indicada también se puede reemplazar por "A", "C" o "G", 3'-A134-VH4 (5'-GTA GTC AAA GTA GAA CCG TAG CCC CCT ATC TCT SGC ACA GTA ATA CAC RGC -3') (SEQ ID NO. 109)) para las subfamilias VH humanas 1, 3 y 4 que coinciden en la región más terminal de FR3.

Se usaron las siguientes combinaciones de cebadores:

- 45 a) 5'-huVH1,3,5-Xhol-2001 x 3'-A134-VH1A  
 b) 5'-huVH1,3,5-Xhol-2001 x 3'-A134-VH1B  
 c) 5'-huVH1,3,5-Xhol-2001 x 3'-A134-VH3A  
 d) 5'-huVH1,3,5-Xhol-2001 x 3'-A134-VH3B  
 e) 5'-huVH4-Xhol-2001 x 3-A134-VH4  
 50 f) 5'-huVH4B-Xhol-2001 x 3'-A134-VH4

Por reacción PCR, un cebador en 5' se combinó con el cebador en 3'; el número de reacciones PCR diferentes se determinó por el número de posibles combinaciones de cebador en 5' y en 3'. El siguiente programa de PCR se usó para la amplificación: la desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación de cebadores a 52°C durante 50



segundos y extensión de cebadores a 72°C durante 90 segundos se realizó durante 40 ciclos, seguido de extensión final a 72°C durante 10 minutos. A través de esta etapa de PCR y la respectiva secuencia de cebador en 3', los segmentos VH humanos se prolongan para una parte del VH CDR3 materno, que luego, a su vez, es el sitio de cebado para el cebador en 3' en la PCR de la segunda etapa. Estos fragmentos de ADN de VH-(FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3) se usaron a continuación como moldes en una segunda reacción PCR usando de nuevo el respectivo cebador específico de VH en 5' y un cebador en 3' universal que coincide con el extremo 3'-terminal universal de los fragmentos de ADN amplificados (3' A134-JH6-BstEII. 5'- CGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA GTA GTC AAA GTA GAA CCG TAG CC -3') (SEQ ID NO. 110).

El siguiente programa de PCR se usó para la amplificación:

- 10 la desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación de cebadores a 52°C durante 50 segundos y extensión de cebadores a 72°C durante 60 segundos se realizaron durante 40 ciclos, seguido de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los fragmentos V de ADN se aislaron de acuerdo con protocolos estándar.

### 3. Construcción de la colección - clonación de la fracción VH humana

- 15 En un segundo ciclo del procedimiento anterior, la VL humana de scFv A-240 identificada en la primera selección previa (véase el ejemplo 6) se eligió, y posteriormente se combinó con la colección de fragmentos de VH humana con el objetivo de generar un scFv humano. En general, se construyó una colección de presentación en fagos basada en procedimientos estándar, como se divulga, por ejemplo, en "Phage Display: A Laboratory Manual"; Ed. Barbas, Burton, Scott & Silverman; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Los fragmentos de ADN de cadena pesada de las diferentes amplificaciones de PCR se pesaron para cada unión como sigue:

- 20 a:b:c:d:e:f = 3:1:3:1:1:1, donde a-f tienen los siguientes significados:

a) 5'-huVH1,3,5-XhoI-2001 x 3'-A134-VH1A

b) 5'-huVH1,3,5-XhoI-2001 x 3'-A134-VH1B

c) 5'-huVH1,3,5-XhoI-2001 x 3'-A134-VH3A

d) 5'-huVH1,3,5-XhoI-2001 x 3'-A134-VH3B

- 25 e) 5'-huVH4-XhoI-2001 x 3'-A134-VH4

f) 5'-huVH4B-XhoI-2001 x 3'-A134-VH4

Se estableció una reacción de unión que consistía en 400 ng de fracción de fragmentos Lib 134-VH (digerido con XhoI-BstEII) y 1200 ng del plásmido pComb3H5BHis/A-240 VL (el ADN que codifica la región VL de scFv A-240 se clonó por medio de los sitios de restricción SacI y SpeI en pComb3H5BHis de acuerdo con procedimientos estándar). La fracción de VH humana de anticuerpo resultante se transformó a continuación en 300 µl de XL1 Blue de Escherichia coli electrocompetente por electroporación (2,5 kV, cubeta de 0,2 cm de paso, 25 mF, 200 Ohm, Biorad Gene Pulser) dando como resultado un tamaño de colección de  $0,8 \times 10^8$  clones independientes en total.

- 30 Después de la electroporación, el ensayo se incubó en caldo SOC (Fluka) para determinar la expresión del fenotipo. Los cultivos se incubaron a continuación cada uno en 500 ml de medio de selección SB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y glucosa al 2 % v/v durante la noche. El día siguiente, las células de los cultivos se recogen por centrifugación y se llevó a cabo la preparación de plásmidos usando un kit de preparación de plásmidos comercialmente disponible (Qiagen) para preservar la colección de ADN.

- 40 A continuación, se electroporaron 1,5 µg de esta fracción de plásmido que codifica la respectiva fracción de scFv en XLI blue de E. coli (2,5 kV, cubeta de 0,2 cm de paso, 25 mF, 200 Ohm, Biorad Gene Pulser) dando como resultado un tamaño de colección de  $2,4 \times 10^9$  clones independientes en total. Después de la expresión del fenotipo y la adaptación lenta a la carbenicilina, se transfirió la colección de anticuerpos a medio de selección SB-carbenicilina (50 µg/ml). A continuación, la colección de anticuerpos se infectó con una dosis infecciosa de  $1 \times 10^{12}$  partículas de fago colaborador VCSM13, dando como resultado la producción y secreción de fago filamentoso M13, en el que cada partícula de fago contenía pComb3H5BHis-ADN monocatenario que codifica un fragmento scFv humano y presentó la proteína scFv correspondiente como una fusión traduccional a la proteína de cubierta del fago III.

### 4. Selección de presentación en fagos de una VH humana

- 50 Las partículas de fagos que llevan el repertorio de scFv humano se recogieron del sobrenadante de cultivo por precipitación con PEG8000/NaCl y centrifugación. A continuación, aproximadamente de  $1 \times 10^{11}$  a  $1 \times 10^{12}$  partículas de fago scFv se resuspendieron en 0,5 ml de TBS/1 % BSA y se incubaron con CEA soluble biotinilado, que se inmovilizó en pocillos recubiertos con estreptavidina de una placa de ELISA (Nunc) durante 1 h. Una solución de 10 µg antígeno/ml PBS (50 µl) se incubó durante la noche a 4°C en los pocillos con estreptavidina, se lavó una vez con agua, seguido de bloqueo durante 1 hora a 37°C con 200 µl de BSA al 3 % en TBS, que se retiró después de la incubación.

Los fagos scFv que no se unieron específicamente al antígeno diana se eliminaron por etapas de lavado con TBS/0,05 % Tween. Este procedimiento de lavado se repitió hasta 10 veces en rondas adicionales.

Después de lavado, las entidades de unión se eluyeron usando HCl-glicina, pH 2,2. Después de la neutralización con Tris 2 M, pH 12, el eluato se usó para la infección de un cultivo XL1 Blue de *E. coli* no infectado recién preparado.

Para eluir las restantes entidades de unión alta, se añadieron 50 µl de un cultivo de XL1 blue de *E. coli* recién preparado ( $DO_{600} \geq 0,5$ ) a los pocillos y se incubó durante 15 minutos. Ambos cultivos se mezclaron a continuación y las células transducidas exitosamente con una copia de fagémido, que codifica un fragmento scFv humano, se seleccionaron de nuevo por su resistencia a carbenicilina y se infectaron posteriormente con el fago colaborador VCMS13 para comenzar el segundo ciclo de presentación de anticuerpos y selección *in vitro*.

El ADN plasmídico correspondiente a 4 ciclos de fijación se aisló a de los cultivos de *E. coli*. Para la producción de proteína scFv soluble, los fragmentos de ADN VH-VL se extrajeron de los plásmidos (XhoI-SpeI), y se clonaron por medio de los mismos sitios de restricción en el plásmido pComb3H5BFlag/His, en el que la construcción de expresión (por ejemplo, scFv) incluye una marca Flag (TG DYKDDDDK; SEQ ID NO. 99) entre el scFv y la marca His6 y las proteínas de fago adicionales se eliminan.

Después de la unión, se transformó cada fracción (diferentes ciclos de fijación) de ADN plasmídico en 100 µl de TG1 de *E. coli* competente para choque térmico y se plaqueó sobre medio con carbenicilina LB-agar. Se recogieron colonias individuales y se inocularon en 120 µl de LB carb (50 µg/ml) glucosa al 1 % en placas de 96 pocillos (Greiner). Los pocillos se sellaron con una membrana semipermeable (Greiner) y las placas se incubaron durante la noche a 37 °C en un incubador con agitación (placa madre). A continuación, se transfirieron 10 µl los cultivos de la placa madre en una segunda placa de 96 pocillos (placa de trabajo) que contenía 90 µl de LB carb (50 µg/ml) y glucosa al 0,1 % por pocillo. Después de la incubación durante 4 h en un incubador de agitación a 37 °C, la producción de scFv se indujo añadiendo 20 µl de LB carb e IPTG 6 mM a cada pocillo. Después de otra etapa de incubación durante la noche a 30 °C con agitación, las células se lisaron en una incubación de 1 h a temperatura ambiente con 40 µl de tampón lisis (ácido bórico 400 mM, NaCl 320 mM, EDTA 4 mM pH 8, 2,5 mg/ml de lisozima). Las células residuales y los restos celulares se separaron por centrifugación durante 12 minutos a 1.900 x g (Hettich).

Los sobrenadantes que contenían las moléculas scFv se sometieron a prueba a continuación para determinar la unión en ensayos de unión por citometría de flujo.

Las células CHO transfectadas con CEA humano se usaron como línea celular positiva para CEA. Los ensayos de unión celular se llevaron a cabo incubando inicialmente entre 100.000 y 200.000 células con preparación periplásmica que contenía scFv humano o controles relevantes. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS/1 % FCS (suero fetal bovino) y se incubaron adicionalmente con 5-10 µg/ml de anticuerpos anti-FLAG M2. Después de que se hayan lavado de nuevo las células, se incubaron con anticuerpos antimurinos marcados con PE policlonales (Dianova) y posteriormente se analizaron por citometría de flujo. Se sometieron a prueba 46 clones para determinar señales de unión en células CHO positivas para CEA. Todos mostraron señales positivas. Después de la secuenciación del respectivo ADN scFv, se obtuvieron un total de 9 secuencias diferentes, de las que ocho presentaron un alto grado de homología. Las construcciones humanas MP510\_3-A5.3 (MP510-A5; SEQ ID NO. 50), MP510\_3-B9.1 (MP511-B9; SEQ ID NO. 52), MP510\_3-D8.1 (MP511-D8; SEQ ID NO. 54) se han seleccionado para caracterización adicional. Las correspondientes secuencias de aminoácidos se muestran en el listado de secuencias.

Los extractos periplásmicos de dichas construcciones humanas MP510-A5, MP511-B9, MP511-D8 así como la construcción semihumana A-240 Vlambda.3 (VH A5B7 murina/VL A240 humana; SEQ ID NO. 48) se analizaron adicionalmente en experimentos de citometría de flujo con líneas celulares positivas y negativas para CEA. Se puede observar de la figura 13, que las construcciones humanas MP510-A5 (SEQ ID NO. 50), MP511-B9 (SEQ ID NO. 52), MP511-D8 (SEQ ID NO. 54) muestran desplazamientos claramente apreciables en la intensidad de fluorescencia en comparación con el respectivo control semihumano A-240 Vlambda.3 (VH A5B7 murina/VL A240 humana; SEQ ID NO. 48). Por tanto, las construcciones scFv humanas muestran una actividad de unión más fuerte a CEA unido a membrana humano que la construcción semihumana A-240 Vlambda.3. Además, todas las construcciones humanas mostraron unión distinta a células KATO III humanas positivas para CEA (línea celular de cáncer gástrico humano), mientras que ninguna de ellas mostró unión a células CHO no transfectadas negativas para CEA así como a células NALM 6 humanas negativas para CEA (línea de linfocitos B humanos) (datos no mostrados).

## **EJEMPLO 8: Generación y actividad citotóxica de anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAxCD3 humanos**

### 1. Disposiciones

En la siguiente etapa, se han generado varias disposiciones de dominios de moléculas humanas de anticuerpos monocatenarios biespecíficos. Estas moléculas comprenden el dominio de unión a anti-CEA humano (del que su

5 generación se ha descrito en el ejemplo 7, *supra*) y el dominio de unión desinmunizado con especificidad por el antígeno de CD3 humano mostrado en SEQ ID NO.77 VHVL se diseñaron como se expone en la tabla 1; véase también el ejemplo 2, *supra*. Todas las construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos con los dominios de unión anti-CEA humanos descritos en el presente documento se unen (aparentemente) al antígeno CEA humano soluble puesto que se han aislado después de cuatro ciclos de selección de presentación en fagos en el antígeno CEA soluble inmovilizado en placa de ELISA.

En particular, se han generado las siguientes disposiciones:

(a) parte anti-CEA humana situada de forma N-terminal:

(i) orientación VH-VL de anti-CEA:

10 A5 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 24),  
 A5 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 126),  
 B9 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 32),  
 B9 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 130),  
 D8 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 40)  
 15 D8 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 134), y  
 CEAI VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 16).

(ii) orientación VL-VH de anti-CEA:

A240 VL-A5 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 26),  
 A240 VL-B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34),  
 20 A240 VL-D8 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 42),  
 y A240 VL-CEAI VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 18).

(b) parte anti-CEA humana situada de forma C-terminal:

(i) orientación VH-VL de anti-CEA:

SEQ ID NO.77 VHVLxA5 VH-A240VL (SEQ ID NO. 30),  
 25 SEQ ID NO.77 VHVLxA5 VH-A240VL# (SEQ ID NO. 128),  
 SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240VL (SEQ ID NO. 36),  
 SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240VL (SEQ ID NO. 143),  
 SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240VL# (SEQ ID NO. 132), SEQ ID NO.77 VHVLxD8 VH-A240VL (SEQ ID NO. 44),  
 SEQ ID NO.77 VHVLxD8 VH-A240VL# (SEQ ID NO. 136),  
 30 y SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VH-A240VL (SEQ ID NO. 20).

(ii) orientación VL-VH de anti-CEA:

SEQ ID NO.77 VHVLxA240VL-A5 VH (SEQ ID NO. 28),  
 SEQ ID NO.77 VHVLxA240VL-B9VH (SEQ ID NO. 38),  
 SEQ ID NO.77 VHVLxA240VL-D8VH (SEQ ID NO. 46), y  
 35 SEQ ID NO.77 VHVLxA240VL-CEAI VH (SEQ ID NO. 22).

40 CEAI VH (SEQ ID NO. 56) indica una región VH derivada del mAb murino A5B7, mientras que CEAI VHVL o CEAI VLVH se refieren a un dominio VH-VL y un dominio VL-VH, respectivamente, derivado del mAb A5B7. A240 corresponde a una región VL humana (véase SEQ ID NO. 64 y ejemplo 7). En consecuencia, por ejemplo, CEAI VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 16) corresponde a una construcción biespecífica con una con un dominio de unión a CEA semihumano que tiene una región VH murina de mAb7 y una región VL humana de A240. Para la clonación de la colección de anticuerpos humanos, las secuencias de nucleótidos que codifican los extremos

N-terminales originales de la región A240 VL tuvieron que convertirse en sitios de restricción. En A5 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 126), SEQ ID NO.77 VHVLxA5 VH-A240VL# (SEQ ID NO. 128), B9 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 130), SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240VL# (SEQ ID NO. 132), D8 VH-A240 VL# x SEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 134), y SEQ ID NO.77 VHVLxD8 VH-A240VL# (SEQ ID NO. 136), se han reintroducido los extremos N-terminales originales.

La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240VL (SEQ ID NO. 143) difiere de la construcción SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240VL (SEQ ID NO. 36) solo en un residuo aminoacídico: La secuencia de CDR-H2 en E12 VH dice "FILNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 145), mientras que en B9 VH dice "FIRNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 67). La región E12 VH humana se ha aislado como se expone en el ejemplo 7.

## 2. Expresión, purificación y análisis por citometría de flujo

La expresión, purificación y análisis por citometría de flujo de estos anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAXCD3 humanos se han llevado a cabo por procedimientos descritos en el ejemplo 2, *supra*.

## 3. Actividad de unión

Como se ejemplifica en la figura 14, las construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos humanos A5 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 24), B9 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 32), D8 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 40) y CEAI VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 16) se unen a células Kato III humanas positivas para CEA y a células HPB-ALL positivas para CD3.

## 4. Actividad citotóxica en ausencia de antígeno CEA soluble

La actividad citotóxica frente a células diana CHO-CEA+ se ha demostrado para las siguientes disposiciones de dominios de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos humanos:

Para construcciones con la parte anti-CEA situada de forma N-terminal y una orientación VH-VL de la parte anti-CEA, la figura 15 muestra la actividad citotóxica para A5 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 24), B9 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 32), D8 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 40) y CEAI VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 16). La figura 16 demuestra actividad citotóxica para la orientación VL-VH del dominio anti-CEA (situado de forma N-terminal) para A240 VL-A5 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 26), A240 VL-B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34), A240 VL-D8 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 42), y A240 VL-CEAI VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 18).

Para construcciones con la parte anti-CEA situada de forma C-terminal y una orientación VH-VL de la parte anti-CEA, la figura 17 presenta citotoxicidad frente a células diana CEA+ para SEQ ID NO.77 VHVLxA5 VH-A240VL (SEQ ID NO. 30), SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240VL (SEQ ID NO. 36), SEQ ID NO.77 VHVLxD8 VH-A240VL (SEQ ID NO. 44), y SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VH-A240VL (SEQ ID NO. 20). SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI LH se usó as a positive control. La figura 18 muestra actividad citotóxica de las construcciones con orientación VL-VH del dominio anti-CEA (situado de forma C-terminal) para SEQ ID NO.77 VHVLxA240VL-A5 VH (SEQ ID NO. 28), SEQ ID NO.77 VHVLxA240VL-B9VH (SEQ ID NO. 38), SEQ ID NO.77 VHVLxA240VL-D8VH (SEQ ID NO. 46), y SEQ ID NO.77 VHVLx A240VL-CEAIVH (SEQ ID NO. 22). SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI LH (SEQ ID NO. 2) se usó como control positivo.

La figura 21 muestra actividad citotóxica de las construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos que comprende la región B9 VH humana y la región A240 VL humana en diferentes disposiciones: A240 VL-B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34), SEQ ID NO.77 VHVLxA240 VL-B9 VH (SEQ ID NO. 38), SEQ ID NO.77 VHVLxB9 VH-A240 VL (SEQ ID NO. 36), y B9 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 32) revelaron actividad citotóxica frente a células CHO transfectadas con CEA humano.

## 5. Resistencia de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos CEAXCD3 humanos al antígeno CEA soluble

Se han realizado ensayos de competición en presencia del antígeno CEA humano soluble para anticuerpos monocatenarios biespecíficos humanos como se expone en el ejemplo 5, *supra*. Las figuras 19 y 20 demuestran la resistencia a antígeno CEA soluble de actividad citotóxica también para construcciones humanas, como se ejemplifica para las construcciones A5 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 24), B9 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 32), D8 VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 40) y CEAI VH-A240 VLxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 16); para la resistencia a CEA soluble de anticuerpos monocatenarios biespecíficos derivados de murino, véase el ejemplo 5. Además, la figura 22 muestra que la construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA A240 VL-B9 VHx SEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34) redirigió linfocitos T para lisar células CHO-CEA+ en presencia de un incremento en las cantidades de antígeno CEA soluble. Este experimento demuestra que también la actividad citotóxica mediada por A240 VL-B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL es resistente a CEA soluble. Finalmente, como se puede derivar de la figura 27, la actividad citotóxica mediada por la construcción monocatenaria biespecífica SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240 VL (SEQ ID NO. 143) es resistente a CEA soluble.

Por tanto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas con actividad antitumoral citotóxica incluso en presencia de niveles altos de antígeno CEA soluble. Como se ha expuesto anteriormente, concentraciones de CEA séricas altas en pacientes con tumores epiteliales reduce el éxito de las opciones terapéuticas basadas en anticuerpo anti-CEA. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de pacientes con tumores progresivos epiteliales (por ejemplo, tumores metastásicos secundarios después de la retirada quirúrgica del/de los tumor(es) primario(s)), tumores epiteliales malignos, carga tumoral alta (epitelial) y tumores epiteliales en estadio tardío caracterizados por concentraciones de antígeno CEA soluble altas en el suero/plasma de dichos pacientes. Además, también se espera que las composiciones farmacéuticas de la invención se administren en dosificaciones bajas. Además, no es probable que dichas composiciones farmacéuticas sean inmunógenas cuando se administran a los pacientes debido al origen humano de la parte anti-CEA y la parte anti-CD3 desinmunizada de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos en las composiciones farmacéuticas de la invención. Además, se espera que las composiciones farmacéuticas de la invención proporcionen una penetración tumoral alta debido al peso molecular bajo y tamaño pequeño de las construcciones monocatenarias biespecíficas. Adicionalmente, para el tratamiento tumoral, se usarán cantidades bajas de anticuerpos monocatenarios biespecíficos debido a la actividad citotóxica alta de dichas moléculas. Debido a que se espera que se administren cantidades bajas a los pacientes, también se espera que los efectos adversos para los pacientes se reduzcan. Finalmente, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos sin resistencia a CEA soluble serían altamente sensibles incluso a concentraciones bajas de antígeno CEA soluble en el plasma de pacientes con tumores puesto que se administrarían en concentraciones bajas, como se expone anteriormente. Este problema también se supera por las composiciones farmacéuticas de la invención.

**EJEMPLO 9: Evaluación de la homogeneidad de proteína del monómero purificado de A240 VL - B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34) por cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución**

Para caracterizar adicionalmente la homogeneidad de la construcción purificada A240 VL – B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34), la fracción de monómero aislado se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución. La cromatografía se realizó en una columna MiniS (Mini S PE 4,6/50 CatX 0,8 ml; GE Healthcare 17-5005-01), equilibrada con tampón MES 20 mM pH 5,5. La muestra se diluyó 1:3 con el mismo tampón antes de cargarla en la columna. La proteína unida se eluyó con un gradiente de tampón de equilibrio que contenía NaCl 1 M: 0-30 % en 60 volúmenes de columna. La proteína restante se eluyó en 3 volúmenes de columna de NaCl 1 M. El cromatograma resultante se muestra en la figura 23 y presenta una fracción de proteína homogénea con un único máximo principal.

**EJEMPLO 10: Estabilidad en plasma de A240 VL–B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34)**

La estabilidad en plasma de la construcción A240 VL – B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34) se sometió a prueba en diferentes condiciones de incubación seguido de un ensayo de citotoxicidad basado en la liberación de 51-cromo estándar como se describe en el ejemplo 4.

Se generó una mezcla de plasma humano con la sangre de cinco donantes sanos extrayendo sangre jeringuillas recubiertas con EDTA. Los componentes celulares se retiraron por centrifugación y la fase de plasma superior se recogió y posteriormente se mezcló. La construcción A240 VL – B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34) se incubó a 37 °C o bien a 4°C en presencia o ausencia de plasma. Como controles, la construcción se diluyó de inmediato antes del ensayo de citotoxicidad en plasma o medio RPMI 1640, respectivamente. Las CHO-CEA+ sirvieron como células diana; los linfocitos T CD8+ estimulados se usaron como células efectoras. La proporción efector:diana (E:T) fue de 10:1. La duración del ensayo fue de 18 horas.

Como se muestra en la figura 24, se probó que la construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA A240 VL – B9 VHxSEQ ID NO.77 VHVL (SEQ ID NO. 34) era muy estable; no se pudo detectar pérdida de actividad citotóxica después de la incubación en plasma humano durante 24 horas a 37 °C.

**EJEMPLO 11: Evaluación de la homogeneidad de proteína del monómero purificado de SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240 VL (SEQ ID NO. 143) por cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución**

El experimento se llevó a cabo en analogía con el ejemplo 9, excepto que se analizó SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240 VL (SEQ ID NO. 143). El cromatograma resultante se muestra en la figura 25 y presenta una fracción de proteína homogénea con un único máximo principal.

**EJEMPLO 12: Estabilidad en plasma de SEQ ID NO.77 VHVLxE12 VH-A240 VL (SEQ ID NO. 143)**

El experimento se llevó a cabo en analogía con el ejemplo 10, excepto que se analizó SEQ ID NO.77 VHVL x E12 VH-A240 VL (SEQ ID NO. 143). Como se presenta en la figura 26, la construcción monocatenaria biespecífica reactiva para CEA SEQ ID NO.77 VHVL x E12 VH-A240 VL (SEQ ID NO. 143) era muy estable; no se pudo detectar pérdida de actividad citotóxica después de la incubación en plasma humano durante 24 horas a 37 °C.

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Micromet AG
- 5 <120> Composiciones farmacéuticas con resistencia a CEA soluble
- <130> L1652 PCT 53
- 10 <150> EP 05 02 8064.3  
<151> 21-12-2005
- <150> US 60/751.963  
<151> 21-12-2005
- 15 <150> US 60/780.861  
<151> 3-10-2006
- <160> 147
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1  
<211> 1476  
<212> ADN
- 25 <213> secuencia artificial
- <220>  
<223> SEQ ID NO: 77 VHVL x CEA I VLVH; anticuerpo monocatenario biespecífico
- 30 <400> 1
- |             |            |            |            |            |             |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| gacgtccaac  | tggtgcagtc | aggggctgaa | gtgaaaaaac | ctggggcctc | agtgaagggtg | 60  |
| tctctgcaagg | cttctggcta | caccttact  | aggtacacga | tgactgggt  | aaggcaggca  | 120 |
| cctggacagg  | gtctggaatg | gattggatac | attaatccta | gccgtggtta | tactaattac  | 180 |
| gcagacagcg  | tcaagggccg | cttcacaatc | actacagaca | aatccaccag | cacagcctac  | 240 |
| atggaactga  | gcagcctgcg | ttctgaggac | actgcaacct | attactgtgc | aagatattat  | 300 |
| gatgatcatt  | actgccttga | ctactggggc | caaggcacca | cggtcaccgt | ctcctcaggc  | 360 |
| gaaggtaacta | gtactggttc | tggtggaagt | ggaggttcag | gtggagcaga | cgacattgta  | 420 |
| ctgaccagtc  | ctccagcaac | tctgtctctg | tctccagggg | agcgtgccac | cctgagctgc  | 480 |
| agagccagtc  | aaagtgtaag | ttacatgaac | tggtaccagc | agaagccggg | caaggcacc   | 540 |
| aaaagatgga  | tttatgacac | atccaaagtg | gcttctggag | tccctgctcg | cttcagtggc  | 600 |
| agtgggtctg  | ggaccgacta | ctctctcaca | atcaacagct | tggaggctga | agatgctgcc  | 660 |
| acttattact  | gccaacagtg | gagtagtaac | ccgctcacgt | tcggtggcgg | gaccaagggtg | 720 |
| gagatcaaat  | ccggagggtg | tggatccgac | attgagctca | cccagtctcc | agcaatcctg  | 780 |
| tctgcatctc  | caggggagaa | ggtcacaatg | acttgcaggg | ccagctcaag | tgtaacttac  | 840 |
| attcactgggt | accagcagaa | gccaggatcc | tccccaaat  | cctggattta | tgccacatcc  | 900 |

ES 2 595 091 T3

aacctggctt ctggagtccc tgctcgcttc agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct 960  
 ctcaaatca gcagagtgga ggctgaagat gctgccactt attactgcca acattggagt 1020  
 agtaaaccac cgacgttcgg tggagggacc aagctcgaga tcaaaggtgg tggtaggttct 1080  
 ggcggcgcg gctccggtgg tggtaggttct caggtccaac tgcaggagtc aggaggaggc 1140  
 ttggtacagc ctggggggttc tctgagactc tcctgtgcaa cttctggggtt caccttact 1200  
 gattactaca tgaactgggt cgcgcagcct ccaggaaagg cacttgagtg gttggggttt 1260  
 attggaaca aagctaagtg ttacacaaca gagtacagtg catctgtgaa gggtaggttc 1320  
 accatctcca gagataaatc ccaaagcatc ctctatcttc aatgaacac cctgagagct 1380  
 gaggacagtg ccacttatta ctgtaccaga gatagggggc tacggttcta ctttgactac 1440  
 tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tctag 1476

<210> 2  
 <211> 491  
 5 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x CEA I VLVH; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 2

Asp 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 Arg Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

ES 2 595 091 T3

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 195 200 205

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser  
 245 250 255

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

Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 275 280 285

Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 290 295 300

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser  
 305 310 315 320

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

Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 340 345 350



ES 2 595 091 T3

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 370 375 380

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr  
 385 390 395 400

Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 405 410 415

Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr  
 420 425 430

Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln  
 435 440 445

Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala  
 450 455 460

Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 465 470 475 480

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 485 490

<210> 3  
 <211> 1476  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x CEA I VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 3  
 gacgtccaac tggcgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggcgc cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
 atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
 gaaggtacta gtactggttc tggcgaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420

ES 2 595 091 T3

```

ctgacccagt ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480
agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tggtagcagc agaagccggg caaggcacc 540
aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccttgctcg cttcagtggc 600
agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660
acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaaggtg 720
gagatcaaat ccggaggtgg tggatcccag gtccaactgc aggagtcaag aggaggcttg 780
gtacagcctg ggggttctct gagactctcc tgtgcaactt ctgggttcac cttcactgat 840
tactacatga actgggtcgc ccagcctcca ggaaaggcac ttgagtgggt gggttttatt 900
ggaaacaaag ctaatggtta cacaacagag tacagtgcac ctgtgaaggg tcggttcacc 960
atctccagag ataaatccca aagcatcctc tatcttcaaa tgaacacct gagagctgag 1020
gacagtgcc cttattactg taccagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 1080
ggccaagga ccacggtcac cgtctctctc ggtggtggtg gttctggcgg cggcggtcc 1140
ggtggtggtg gttctgacat tgagctcacc cagtctccag caatcctgtc tgcactctca 1200
ggggagaagg tcacaatgac ttgcagggcc agctcaagtg taacttacat tcaactgtac 1260
cagcagaagc caggatcctc ccccaaatcc tggatttatg ccacatccaa cctggcttct 1320
ggagtcctct ctcgcttcag tggcagtggg tctgggacct cttactctct cacaatcagc 1380
agagtggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgccaac attggagtag taaaccaccg 1440
acgttcggtg gagggaccaa gctcgagatc aaatag 1476

```

<210> 4

<211> 491

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x CEA I VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 4

```

Asp 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 Arg Tyr
20           25           30

```

```

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

```

ES 2 595 091 T3

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
195 200 205

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
225 230 235 240

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

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
260 265 270

Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln  
275 280 285

ES 2 595 091 T3

Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala  
 290 295 300

Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr  
 305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr  
 325 330 335

Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly  
 340 345 350

Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 355 360 365

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 370 375 380

Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro  
 385 390 395 400

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr  
 405 410 415

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile  
 420 425 430

Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 435 440 445

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala  
 450 455 460

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro  
 465 470 475 480

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 485 490

<210> 5  
 <211> 1473  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> CEA I VL VH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 5

ES 2 595 091 T3

gacattgagc tcaccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60  
 atgacttgca gggccagctc aagtgtaact tacattcact ggtaccagca gaagccagga 120  
 tcctccccc aatcctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccttgcctgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagagt ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccaacattgg agtagtaaac caccgacgtt cgggtggagg 300  
 accaagctcg agatcaaagg tgggtgtggt tctggcggcg gcggctccgg tgggtgtggt 360  
 tctcaggtcc aactgcagga gtcaggagga ggcttggtac agcctggggg ttctctgaga 420  
 ctctctctg caacttctgg gttcacctc actgattact acatgaactg ggtccgccag 480  
 cctccaggaa aggcacttga gtggttgggt tttattggaa acaaagctaa tggttacaca 540  
 acagagtaca gtgcatctgt gaagggtcgg ttcaccatct ccagagataa atcccaaagc 600  
 atcctctatc ttcaaagaa caccctgaga gctgaggaca gtgccactta ttactgtacc 660  
 agagataggg ggctacgggt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 720  
 tcctccggag gtggtggatc cgacgtccaa ctggtgcagt caggggctga agtgaaaaaa 780  
 cctggggcct cagtgaagggt gtccctgcaag gcttctggct acacctttac taggtacacg 840  
 atgcaactgg taaggcaggc acctggacag ggtctggaat ggattggata cattaatcct 900  
 agccgtgggt atactaatta cgagacagc gtcaagggcc gcttcacaat cactacagac 960  
 aaatccacca gcacagccta catggaactg agcagcctgc gttctgagga cactgcaacc 1020  
 tattactgtg caagatatta tgatgatcat tactgccttg actactgggg ccaaggcacc 1080  
 acggtcaccg tctctcagg cgaaggctact agtactggtt ctggtggaag tggaggttca 1140  
 ggtggagcag acgacattgt actgaccag tctccagcaa ctctgtctct gtctccaggg 1200  
 gagcgtgcca cctgagctg cagagccagt caaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag 1260  
 cagaagccgg gcaaggcacc caaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga 1320  
 gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct gggaccgact actctctcac aatcaacagc 1380  
 ttggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg 1440  
 ttcggtggcg ggaccaaggt ggagatcaaa tag 1473

5 <210> 6  
 <211> 490  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> CEA I VLVH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 6

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 225 230 235 240

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

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

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 275 280 285

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr  
 290 295 300

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

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

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys  
 340 345 350

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu  
 355 360 365

Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp  
 370 375 380

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 385 390 395 400

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met  
 405 410 415

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 420 425 430

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 435 440 445

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu  
 450 455 460

ES 2 595 091 T3

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
 465 470 475 480

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 485 490

5 <210> 7  
 <211> 1476  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> CEA I VHVL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 7  
 cagggtccaac tgcaggagtc aggaggagtc ttggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60  
 tcctgtgcaa cttctgggtt caccttcact gattactaca tgaactgggt ccgccagcct 120  
 ccaggaaagg cacttgagtg gttgggtttt attggaaca aagctaattg ttacacaaca 180  
 gagtacagtg catctgtgaa gggtcgggtc accatctcca gagataaatc ccaaagcatc 240  
 ctctatcttc aaatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtaccaga 300  
 gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 tccggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctga cattgagctc 420  
 acccagtctc cagcaatcct gtctgcatct ccaggggaga aggtcacaat gacttgacagg 480  
 gccagctcaa gtgtaactta cattcaactg taccagcaga agccaggatc ctccccaaa 540  
 tcctggattt atgccacatc caacctggct tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt 600  
 ggggtctggga cctcttactc tctcacaatc agcagagtgg aggtgaaga tgctgccact 660  
 tattactgcc aacattggag tagtaaacca ccgacgttcg gtggagggac caagctcgag 720  
 atcaaatccg gaggtggtgg atccgacgtc caactggtgc agtcaggggc tgaagtgaaa 780  
 aaacctgggg cctcagtgaa ggtgtcctgc aaggcttctg gctacacctt tactaggtac 840  
 acgatgcact ggtaaggca ggcacctgga cagggtctgg aatggattgg atacattaat 900  
 cctagccgtg gtataactaa ttacgcagac agcgtcaagg gccgcttcac aatcactaca 960  
 gacaaatcca ccagcacagc ctacatggaa ctgagcagcc tgcgttctga ggacactgca 1020  
 acctattact gtgcaagata ttatgatgat cattactgcc ttgactactg gggccaaggc 1080  
 accacggtca ccgtctctc aggcgaagg actagtactg gttctggtgg aagtggaggt 1140  
 tcaggtggag cagacgacat tgtactgacc cagtctccag caactctgtc tctgtctcca 1200



ES 2 595 091 T3

ggggagcgtg ccaccctgag ctgcagagcc agtcaaagtg taagttacat gaactggtac 1260  
 cagcagaagc cgggcaaggc acccaaaaga tggatttatg acacatccaa agtggcttct 1320  
 ggagtcctcg ctgccttcag tggcagtggg tctgggaccg actactctct cacaatcaac 1380  
 agcttgagg ctgaagatgc tgccacttat tactgccaac agtggagtag taaccgcgctc 1440  
 acgttcggtg gcgggaccaa ggtggagatc aaatag 1476

<210> 8

<211> 491

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CEA I VHVL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 8

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

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

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

Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro  
 130 135 140

Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg

ES 2 595 091 T3

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

# ES 2 595 091 T3

385	390	395	400												
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Tyr
				405					410					415	
Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile
			420					425					430		
Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
		435					440					445			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala
	450					455					460				
Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu
465					470					475					480
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
				485					490						

<210> 9  
 <211> 1491  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> CEA II VHVL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 9

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtggagc caggggcctc agtcaagttg	60
tctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgactgggt gaagcagagg	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tagtaaatat	180
gtcccgaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctcaa cacagcctac	240
ctgcagctca ccagcctgac atctgaggac actgccgtct attattgtgc tccgtttggt	300
tactacgtgt ctgactatgc tatggcctac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc	360
tccggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctga cattgtgctg	420
accaatctc cagcttcttt ggctgtgtct cttgggcaga gggccaccat gtcctgcaga	480
gccggtgaaa gtgtgatat ttttggcggt gggtttttgc actggtacca gcagaaacca	540
ggacagccac ccaaactcct catctatcgt gcatccaacc tagaatctgg gatccctgtc	600
aggttcagtg gcactgggtc taggacagac ttcacccctca tcattgatcc tgtggaggct	660
gatgatgttg ccacctatta ctgtcagcaa actaatgagg atccgtacac gttcggaggg	720

ES 2 595 091 T3

gggaccaagc tcgagataaa atccggaggt ggtggatccg acgtccaact ggtgcagtca 780  
 ggggctgaag tgaaaaaacc tggggcctca gtgaagggtgt cctgcaaggc ttctggctac 840  
 acctttacta ggtacacgat gcaactgggta aggcaggcac ctggacaggg tctggaatgg 900  
 attggataca ttaatcctag ccgtgggttat actaattacg cagacagcgt caagggccgc 960  
 ttcacaatca ctacagacaa atccaccagc acagcctaca tggaactgag cagcctgcgt 1020  
 tctgaggaca ctgcaaccta ttactgtgca agatattatg atgatcatta ctgccttgac 1080  
 tactggggcc aaggcaccac ggtcaccgtc tcctcaggcg aaggtactag tactggttct 1140  
 ggtggaagtg gaggttcagg tggagcagac gacattgtac tgaccagtc tccagcaact 1200  
 ctgtctctgt ctccagggga gcggtgccacc ctgagctgca gagccagtca aagtgtaagt 1260  
 tacatgaact ggtaccagca gaagccgggc aaggcaccca aaagatggat ttatgacaca 1320  
 tccaaagtgg cttctggagt ccctgctcgc ttcagtggca gtgggtctgg gaccgactac 1380  
 tctctcacia tcaacagctt ggaggtgaa gatgctgcca cttattactg ccaacagtgg 1440  
 agtagtaacc cgctcacggt cgggtggcggg accaaggtgg agatcaaata g 1491

<210> 10

<211> 496

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> CEA II VHVL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 10

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys



# ES 2 595 091 T3

325                                  330                                  335

```
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr
      340                      345                      350

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
      355                      360                      365

Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly
      370                      375                      380

Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr
      385                      390                      395                      400

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
      405                      410                      415

Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
      420                      425                      430

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
      435                      440                      445

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
      450                      455                      460

Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
      465                      470                      475                      480

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      485                      490                      495
```

```
5 <210> 11
   <211> 1470
   <212> ADN
   <213> secuencia artificial

10 <220>
    <223> CEA III VHVL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

    <400> 11
        gagaacggtc tcaccagctc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      60
        atcaactgca gtgccagctc aagcgtcagc tacatgcaact ggttcagca gaagccaggc      120
        acctccccca aactctggat ttattctaca tccaacctgg cttctggagt cctgtctcgc      180
        ttctctggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagaat ggaggctgaa      240
```

ES 2 595 091 T3

gatgctgcca cttattactg ccagcagaga agtagttacc cactcacggt cggtgctggg 300  
 accaagctcg agctgaaagg tgggtgggtggt tctggcggcg gcggctccgg tgggtgggtggt 360  
 tctcaggtta agctgcagca gtctggggca gagcttgtga gatcagggac atcagtcaag 420  
 ttgtcctgca cagcttctgg cttcaacatt aaagactcct atatgcactg gctgaggcag 480  
 gggcctgaac agggcctgga gtggattgga tggattgatc ctgagaatgg tgatactgaa 540  
 tatgccccga agttccaggg caaggccact ttcactactg acacatcctc caacacagcc 600  
 tacctgcagc tcagcagcct gacatctgag gacactgccg totattactg taacgagggc 660  
 acacctacag ggccttacta ctttgactac tggggccaag gcaccactgt cacagtctcc 720  
 tccggagggtg gtggatccga cgtccaactg gtgcagtcag gggctgaagt gaaaaaacct 780  
 ggggcctcag tgaaggtgtc ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg 840  
 cactgggtaa ggcaggcacc tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc 900  
 cgtggttata ctaattacgc agacagcgtc aagggccgct tcacaatcac tacagacaaa 960  
 tccaccagca cagcctacat ggaactgagc agcctgcggt ctgaggacac tgcaacctat 1020  
 tactgtgcaa gatattatga tgatcattac tgcttgact actggggcca aggcaccacg 1080  
 gtcaccgtct cctcaggoga aggtactagt actggttctg gtggaagtgg aggttcaggt 1140  
 ggagcagacg acattgtact gaccagctc ccagcaactc tgtctctgtc tccaggggag 1200  
 cgtgccacc tgagctgcag agccagtcaa agtgaagtt acatgaactg gtaccagcag 1260  
 aagccgggca aggcaccaa aagatggatt tatgacacat ccaaagtggc ttctggagtc 1320  
 cctgctcgct tcagtggcag tgggtctggg accgactact ctctcacaat caacagcttg 1380  
 gaggctgaag atgctgccac ttattactgc caacagtgga gtagtaacc gctcacgttc 1440  
 ggtggcggga ccaaggtgga gatcaaatag 1470

<210> 12  
 <211> 489  
 5 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 10 <223> CEA III VLVH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 12  
 Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

ES 2 595 091 T3

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



ES 2 595 091 T3

260 265 270

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 275 280 285

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr  
 290 295 300

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

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

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu  
 340 345 350

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly  
 355 360 365

Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp  
 370 375 380

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu  
 385 390 395 400

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn  
 405 410 415

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp  
 420 425 430

Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 435 440 445

Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp  
 450 455 460

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe  
 465 470 475 480

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 485

<210> 13  
 <211> 1473  
 <212> ADN

ES 2 595 091 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CEA III VHVL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

5

<400> 13

```

cagggtaagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgagat cagggacatc agtcaagttg      60
tcoctgcacag cttctggctt caacattaaa gactcctata tgcactggct gaggcagggg      120
cctgaacagc  gcctggagtg gattggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatat      180
gccccgaagt  tccagggcaa ggccacttcc actactgaca catcctccaa cacagcctac      240
ctgcagctca  gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtaa cgagggcaca      300
cctacagggc  cttactactt tgactactgg ggccaaggca cactgtcac agtctcctcc      360
ggggtggtg  gttctggcgg cggcggctcc ggtgggtggtg gttctgagaa cgttctcacc      420
cagtctccag  caatcatgtc tgcactcca ggggagaagg tcaccatcac ctgcagtgcc      480
agctcaagcg  tcagctacat gcactggttc cagcagaagc caggcacctc ccccaaactc      540
tggatttatt  ctacatccaa cctggcttct ggagtcctct ctgcttctc tggcagtggtg      600
tctgggacct  cttactctct cacaatcagc agaatggagg ctgaagatgc tgccacttat      660
tactgccagc  agagaagtag ttaccactc acgttcggtg ctgggaccaa gctcgagctg      720
aaatccggag  gtggtggatc cgacgtccaa ctggtgcagt caggggctga agtgaaaaaa      780
cctggggcct  cagtgaaggt gtctgcaag gcttctggct acacctttac taggtacaag      840
atgcaactgg  taaggcaggg acctggacag ggtctggaat ggattggata cattaatcct      900
agccgtggtt  atactaatta cgcagacagc gtcaagggcc gcttcacaat cactacagac      960
aaatccacca  gcacagccta catggaactg agcagcctgc gttctgagga cactgcaacc      1020
tattactgtg  caagatatta tgatgatcat tactgccttg actactgggg ccaaggcacc      1080
acggtcaccg  tctctcagg cgaaggtact agtactggtt ctggtggaag tggaggttca      1140
gggtgagcag  acgacattgt actgaccag tctccagcaa ctctgtctct gtctccaggg      1200
gagcgtgcc  ccctgagctg cagagccagt caaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag      1260
cagaagccgg  gcaaggcacc caaaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga      1320
gtccctgctc  gcttcagtg cagtgggtct gggaccgact actctctcac aatcaacagc      1380
ttggaggctg  aagatgctgc cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg      1440
ttcggtggtg  ggaccaaggt ggagatcaaa tag      1473

```

<210> 14

<211> 490

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10

ES 2 595 091 T3

<223> CEA III VHVL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecífico

<400> 14

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser  
 20 25 30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Asn Glu Gly Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala  
 130 135 140

Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala  
 145 150 155 160

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr  
 165 170 175

Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val  
 180 185 190

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

435

440

445

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu  
 450 455 460

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
 465 470 475 480

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 485 490

<210> 15  
 <211> 1506  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> CEA I VH-240VL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 15  
 gaggtgcagc tggctgagtc aggaggagc ttggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60  
 tctctgtgcaa cttctggggtt caccttcact gattactaca tgaactgggt ccgccagcct 120  
 ccaggaaagg cacttgagtg gttgggtttt attggaaaca aagctaattg ttacacaaca 180  
 gagtacagtg catctgtgaa gggctcggttc accatctcca gagataaatc ccaaagcatc 240  
 ctctatcttc aaatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtaccaga 300  
 gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 tcaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctca ggccgtgctg 420  
 actcagccgg cttccctctc tgcctctcct ggagcatcag ccagtctcac ctgcacctg 480  
 cgcaggggca tcaatggttg tgcttacagt atatactggt accagcagaa gccagggagt 540  
 cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 600  
 tccagccgct tctctgcatc caaagatgct tcggccaatg cagggatctt actcatctct 660  
 gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cggcgcttct 720  
 gcgggtgttcg gcggagggac caagttgacc gtccctatccg gaggtggtgg atccgacgtc 780  
 caactggtgc agtcaggggc tgaagtgaaa aaacctgggg cctcagtgaa ggtgtcctgc 840  
 aaggcttctg gctacacctt tactaggtac acgatgcaact gggtaaggca ggcacctgga 900  
 caggtctggt aatggattgg atacattaat cctagccgtg gttatactaa ttacgcagac 960  
 agcgtcaagg gccgcttcac aatcactaca gacaaatcca ccagcacagc ctacatggaa 1020

ES 2 595 091 T3

ctgagcagcc tgcgttctga ggacactgca acctattact gtgcaagata ttatgatgat 1080  
 cattactgcc ttgactactg gggccaaggc accacgggtca ccgtctcctc aggccaaggt 1140  
 actagtactg gttctggtgg aagtggaggt tcaggtggag cagacgacat tgtactgacc 1200  
 cagtctccag caactctgtc tctgtctcca ggggagcgtg ccacctgag ctgcagagcc 1260  
 agtcaaagtg taagttacat gaactggtac cagcagaagc cgggcaaggc acccaaaaga 1320  
 tggatttatg acacatccaa agtggcttct ggagtccttg ctcgcttcag tggcagtggg 1380  
 tctgggaccg actactctct cacaatcaac agcttggagg ctgaagatgc tgccacttat 1440  
 tactgccaac agtggagtag taaccgctc acgttcggtg gcgggaccaa ggtggagatc 1500  
 aaatag 1506

<210> 16  
 <211> 501  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> CEA I VH-A240VL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 16

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

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

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

Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

ES 2 595 091 T3

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

# ES 2 595 091 T3

355	360	365
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly 370		
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr 385		
Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu 405		
Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln 420		
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val 435		
Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp 450		
Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr 465		
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr 485		
Lys Val Glu Ile Lys 500		

5 <210> 17  
 <211> 1503  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> A240VL - CEA I VH- x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 17

caggccgtgc tgactcagcc ggcttcctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc	60
acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag	120
aagccagggg gtctcccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag	180
ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt	240
ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac	300
agcggcgctt ctgcggtgtt cggcggagg accaagttga ccgtcctagg tggtggtggt	360



ES 2 595 091 T3

tctggcggcg gcggtcccgg tgggtgggtggt tctgaggtgc agctggtcga gtcaggagga 420  
 ggcttgggtac agcctggggg ttctctgaga ctctcctgtg caacttctgg gttcaccttc 480  
 actgattact acatgaactg ggtccgccag cctccaggaa aggcacttga gtgggttgggt 540  
 tttattggaa acaaagctaa tggttacaca acagagtaca gtgcatctgt gaagggtcgg 600  
 ttcaccatct ccagagataa atcccaaagc atcctctatc ttcaaataaa caccctgaga 660  
 gctgaggaca gtgccactta ttactgtacc agagataggg ggctacggtt ctactttgac 720  
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctccggag gtgggtggatc cgacgtccaa 780  
 ctgggtgcagt caggggctga agtgaaaaaa cctggggcct cagtgaaggt gtctctgcaag 840  
 gcttctggct acacctttac taggtacacg atgcaactggg taaggcaggc acctggacag 900  
 ggtctggaat ggattggata cattaatcct agccgtgggt atactaatta cgcagacagc 960  
 gtcaagggcc gcttcacaat cactacagac aaatccacca gcacagccta catggaactg 1020  
 agcagcctgc gttctgagga cactgcaacc tattactgtg caagatatta tgatgatcat 1080  
 tactgccttg actactgggg ccaaggcacc acggtcaccg tctcctcagg cgaaggtact 1140  
 agtactgggt ctgggtggaag tggaggttca ggtggagcag acgacattgt actgaccag 1200  
 tctccagcaa ctctgtctct gtctccaggg gagcgtgcca cctgagctg cagagccagt 1260  
 caaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag cagaagccgg gcaaggcacc caaagatgg 1320  
 atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtccctgctc gttcagtgg cagtgggtct 1380  
 gggaccgact actctctcac aatcaacagc ttggaggctg aagatgctgc cacttattac 1440  
 tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcagc ttcgggtggcg ggaccaaggt ggagatcaaa 1500  
 tag 1503

<210> 18  
 <211> 500  
 5 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 10 <223> A240VL - CEA I VH- x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 18  
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala  
 20 25 30

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg  
 275 280 285

Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 290 295 300

Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser  
 305 310 315 320

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

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 340 345 350

Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 355 360 365

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser  
 370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln  
 385 390 395 400

Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 405 410 415

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys  
 420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala  
 435 440 445

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr  
 450 455 460

Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr  
 465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 485 490 495

Val Glu Ile Lys  
 500

<210> 19  
 <211> 1506  
 <212> ADN

ES 2 595 091 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO: 77 VHVL x CEA I VH – A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

5

<400> 19

```

gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaaggtg      60
tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaggcaggca      120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac      180
gcagacagcg tcaagggccg cttcacaate actacagaca aatccaccag cacagcctac      240
atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat      300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc      360
gaaggtacta gtactgggtc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta      420
ctgaccagtc ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc      480
agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcacc      540
aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc      600
agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc      660
acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcgggtggcg gaccaagggtg      720
gagatcaaat ccggagggtg tggatccgag gtgcagctgg tcgagtcagg aggaggcttg      780
gtacagcctg ggggttctct gagactctcc tgtgcaactt ctgggttcac cttcactgat      840
tactacatga actgggtccg ccagcctcca ggaaaggcac ttgagtgggt gggttttatt      900
ggaaacaaag ctaatgggta cacaacagag tacagtgcac ctgtgaaggg tcggttcacc      960
atctccagag ataaatccca aagcatcctc tatcttcaaa tgaacaccct gagagctgag     1020
gacagtgcc a ttattactg taccagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg     1080
ggccaaggg a ccacggtcac cgtctcctca ggtgggtggg gttctggcg cggcggctcc     1140
gggtgggtg gttctgagct cgtgctgact cagccggctt cctctctgc atctcctgga     1200
gcatcagcca gtctcacctg caccttgcgc aggggcatca atggtgggtc ctacagtata     1260
tactggtagc agcagaagcc agggagtct cccagtatc tctgaggta caaatcagac     1320
tcagataagc agcagggctc tggagtctcc agccgcttct ctgcatcaa agatgcttcg     1380
gccaatgcag ggattttact catctctggg ctccagtctg aggatgaggc tgactattac     1440
tgtatgattt ggcacagcgg cgcttctgcg gtgttcggcg gagggaccaa gttgaccgtc     1500
ctatag                                           1506
    
```

10

<210> 20

<211> 501

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 595 091 T3

<220>

<223> SEQ ID NO: 77 VHVL x CEA I VH – A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

5 <400> 20

Asp 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 Arg Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln  
 420 425 430

Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly  
 435 440 445

Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly  
 450 455 460

Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
 465 470 475 480

Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr  
 485 490 495

Lys Leu Thr Val Leu  
 500

<210> 21  
 <211> 1506  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A240 VL - CEA I VH; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 21  
 gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60  
 tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattgatac attaatccta gccgtggtta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
 atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
 gaaggtacta gtactggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
 ctgaccagtc ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
 agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcaccc 540  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc 600  
 agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660  
 acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaaggtg 720  
 gagatcaaat ccggaggtgg tggatcccag gccgtgctga ctcagccggc ttcctctct 780

ES 2 595 091 T3

gcattctcctg gagcatcagc cagtctcacc tgcaccttgc gcaggggcat caatgttgg 840  
 gcctacagta tatactggta ccagcagaag ccagggagtc ctccccagta tctcctgagg 900  
 taaaaatcag actcagataa gcagcagggc tctggagtct ccagccgctt ctctgcatcc 960  
 aaagatgctt cggccaatgc agggatttta ctcatctctg ggctccagtc tgaggatgag 1020  
 gctgactatt actgtatgat ttggcacagc ggcgcttctg cgggtgttcgg cggagggacc 1080  
 aagttgaccg tcctaggtgg tgggtggttct ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggttct 1140  
 gaggtgcagc tggtcagatc aggaggaggc ttggtacagc ctggggggttc tctgagactc 1200  
 tcctgtgcaa cttctgggtt caccttcaact gattactaca tgaactgggt ccgccagcct 1260  
 ccaggaaagg cacttgagtg gttgggtttt attggaaaca aagctaattg ttacacaaca 1320  
 gagtacagtg catctgtgaa gggtcggttc accatctcca gagataaatc ccaaagcatc 1380  
 ctctatcttc aaatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtaccaga 1440  
 gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 1500  
 tcctag 1506

<210> 22  
 <211> 501  
 5 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A240 VL - CEA I VH; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 22  
 Asp 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 Arg Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys



ES 2 595 091 T3

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

# ES 2 595 091 T3

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

<210> 23  
 <211> 1500  
 5 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> A5 VH – A240 VL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10 <400> 23  
 gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt acctatgcc tgcactgggt cgcaggct 120

ES 2 595 091 T3

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatcaaag atggaagcaa taaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatagg 300  
gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt 360  
ggtggtggtt ctggcggcgg cggctccggt ggtggtggtt ctgagctcgt gctgactcag 420  
ccggcttccc tctctgcatc tcttggagca tcagccagtc tcacctgac cttgcgcagg 480  
ggcatcaatg ttggtgcta cagtataac tgggtaccagc agaagccagg gagtctccc 540  
cagtatctcc tgaggtacaa atcagactca gataagcagc agggctctgg agtctccagc 600  
cgcttctctg catccaaaga tgcttcggcc aatgcagggg ttttactcat ctctgggctc 660  
cagtctgagg atgaggctga ctattactgt atgatttggc acagcggcgc ttctgcggtg 720  
ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta tccggagggt gtggatccga cgtccaactg 780  
gtgcagtcag gggctgaagt gaaaaaacct ggggcctcag tgaaggtgtc ctgcaaggct 840  
tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa ggcaggcacc tggacagggt 900

ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacgc agacagcgtc 960  
aagggccgct tcacaatcac tacagacaaa tccaccagca cagcctacat ggaactgagc 1020  
agcctgcggt ctgaggacac tgcaacctat tactgtgcaa gatattatga tgatcattac 1080  
tgcttgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctcaggcga aggtactagt 1140  
actggttctg gtggaagtgg aggttcaggt ggagcagacg acattgtact gaccagctct 1200  
ccagcaactc tgtctctgtc tccaggggag cgtgccacc ctagctgcag agccagtcaa 1260  
agtgtaagtt acatgaactg gtaccagcag aagccgggca aggcacccaa aagatggatt 1320  
tatgacacat ccaaagtggc ttctggagtc cctgctcgtc tcagtggcag tgggtctggg 1380  
accgactact ctctcacaat caacagcttg gaggtgaag atgctgccac ttattactgc 1440  
caacagtgga gtagtaacc gctcacgttc ggtggcggga ccaaggtgga gatcaaatag 1500

<210> 24  
<211> 499  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> A5 VH – A240 VL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 24

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 245 250 255

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 260 265 270

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 275 280 285

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 290 295 300

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 325 330 335

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 340 345 350

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 385 390 395 400

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 405 410 415

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 420 425 430

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 435 440 445

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 450 455 460

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 465 470 475 480

ES 2 595 091 T3

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 485 490 495

Glu Ile Lys

5 <210> 25  
 <211> 1497  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> A240 VL - A5 VH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 25  
 cagggccgtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc 60  
 acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120  
 aagccagggg gtcctcccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180  
 ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggcca tgcagggatt 240  
 ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300  
 agcggcgctt ctgcggtgtt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtgt 360  
 tctggcggcg gcggctccgg tgggtggtgt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420  
 ggctgtgtcc agcctgggag gtcctgaga ctctcctgtg cagcctctgg attcaccctc 480  
 agtacctatg ccattgactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 540  
 cttatatcaa atgatggaag caataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 600  
 atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagctgag 660  
 gacacggccg tgtattactg tgcgagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 720  
 ggccaagggg ccacggtcac cgtctcctcc ggaggtggtg gatccgacgt ccaactggtg 780  
 cagtcagggg ctgaagtgaa aaaacctggg gcctcagtga aggtgtcctg caaggcttct 840  
 ggctacacct ttactaggta cacgatgcac tgggtaaggc aggcacctgg acagggctctg 900  
 gaatggattg gatacattaa tcctagccgt ggttatacta attacgcaga cagcgtcaag 960  
 ggccgcttca caatcactac agacaaatcc accagcacag cctacatgga actgagcagc 1020  
 ctgcgttctg aggacactgc aacctattac tgtgcaagat attatgatga tcattactgc 1080  
 cttgactact ggggccaagg caccacggtc accgtctcct caggcgaagg tactagtact 1140  
 ggttctggtg gaagtggagg ttcaggtgga gcagacgaca ttgtactgac ccagtctcca 1200  
 gcaactctgt ctctgtctcc aggggagcgt gccaccctga gctgcagagc cagtcaaagt 1260

ES 2 595 091 T3

gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag cggggaagg cacccaaaag atggatttat 1320  
gacacatcca aagtggcttc tggagtcctt gctcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc 1380  
gactactctc tcacaatcaa cagcttggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccaa 1440  
cagtggagta gtaacccgct cacgttcggt ggcgggacca aggtggagat caaatag 1497

<210> 26  
<211> 498  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> A240 VL - A5 VH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 26

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

ES 2 595 091 T3

Ser Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 165 170 175

Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala  
 180 185 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 195 200 205

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 225 230 235 240

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

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser  
 260 265 270

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr  
 275 280 285

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 290 295 300

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 305 310 315 320

Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
 325 330 335

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 340 345 350

Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 355 360 365

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly  
 370 375 380

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro  
 385 390 395 400



ES 2 595 091 T3

Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg  
 405 410 415

Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 420 425 430

Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly  
 435 440 445

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu  
 450 455 460

Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 465 470 475 480

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 485 490 495

Ile Lys

- <210> 27
- <211> 1500
- 5 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A240 VL – A5 VH; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 27  
 gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaagggtg 60  
 tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
 atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
 gaaggtacta gtactggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
 ctgaccagtc ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
 agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tggtagcagc agaagccggg caaggcaccc 540  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tcctgctcg cttcagtggc 600  
 agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660

ES 2 595 091 T3

acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaaggtg 720  
gagatcaaat ccggaggtgg tggatcccag gccgtgctga ctgagccggc ttccctctct 780  
gcactctctg gagcatcagc cagtctcacc tgcaccttgc gcaggggcat caatgttggt 840  
gcctacagta tatactggta ccagcagaag ccagggagtc ctccccagta tctcctgagg 900  
tacaaatcag actcagataa gcagcagggc tctggagtct ccagccgctt ctctgcatcc 960  
aaagatgctt cggccaatgc agggatttta ctcatctctg ggctccagtc tgaggatgag 1020  
gctgactatt actgtatgat ttggcacagc ggcgcttctg cgggtgttcgg cggagggacc 1080  
aagttgaccg tcctaggtgg tgggtggtct ggcggcggcg gctccgggtg tgggtggtct 1140  
gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 1200  
tctgtgagc cctctggatt caccctcagt acctatgcca tgcactgggt ccgccaggt 1260  
ccaggcaagg ggtggagtg ggtggcactt atatcaaatg atggaagcaa taaatactat 1320  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 1380  
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatagg 1440  
gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcacctg ctctcctag 1500

<210> 28  
<211> 499  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A240 VL – A5 VH; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 28

Asp 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 Arg Tyr  
20 25 30

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

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

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

ES 2 595 091 T3

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
195 200 205

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
225 230 235 240

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

Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr  
260 265 270

Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln  
275 280 285

Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp  
290 295 300

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

ES 2 595 091 T3

Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln  
 325 330 335

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala  
 340 345 350

Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 370 375 380

Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu  
 385 390 395 400

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Tyr Ala Met His Trp  
 405 410 415

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser  
 420 425 430

Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
 435 440 445

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
 450 455 460

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg  
 465 470 475 480

Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 485 490 495

Val Ser Ser

- <210> 29
- <211> 1500
- 5 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A5 VH – A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico
- <400> 29

ES 2 595 091 T3

gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaagggtg 60  
tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcaactgggt aaggcaggca 120  
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180  
gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
gaaggtaacta gtactggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
ctgacccagt ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcaccc 540  
aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccttctctg cttcagtggc 600  
agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgtctgc 660  
acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaagggtg 720  
gagatcaaat ccggagggtg tggatccgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcgtg 780  
gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc tgtgcagcct ctggattcac cctcagtacc 840  
tatgccatgc actgggtccg ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcacttata 900  
tcaaatgatg gaagcaataa aactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc 960  
agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg 1020  
gccgtgtatt actgtgagag agataggggg ctacggttct actttgacta ctggggccaa 1080  
gggaccacgg tcaccgtctc ctccaggtgtt ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggt 1140  
ggtggttctg agctcgtgct gactcagccg gcttccctct ctgcatctcc tggagcatca 1200  
gccagtctca cctgcacctt gcgcaggggc atcaatggtg gtgcctacag tatatactgg 1260  
taccagcaga agccagggag tcctccccag tatctcctga ggtacaaatc agactcagat 1320  
aagcagcagg gctctggagt ctccagccgc ttctctgcat ccaaagatgc ttggccaat 1380  
gcagggattt tactcatctc tgggctccag tctgaggatg aggctgacta ttactgtatg 1440  
atgtggcaca gcggcgcttc tgcggtgttc ggccggaggga ccaagttgac cgtcctatag 1500

<210> 30  
<211> 499  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A5 VH - A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 30

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

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

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
 260 265 270

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

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly  
 290 295 300

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

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 325 330 335

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg  
 340 345 350

Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 370 375 380

Leu Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser  
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr  
 405 410 415

Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu  
 420 425 430

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

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu  
 450 455 460

Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met  
 465 470 475 480

ES 2 595 091 T3

Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 485 490 495

Thr Val Leu

<210> 31  
 <211> 1506  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> B9 VH - A240 VL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 31  
 gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccgtcagt agctactgga tgcactgggt ccgccaagct 120  
 ccaggggaagg ggctggaatg ggtaggtttc attagaaaca aagctaattg tgggacaaca 180  
 gaatacgcgg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caagaacacg 240  
 ctgtatcttc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaaga 300  
 gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 tcaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctga gctcgtgctg 420  
 actcagccgg ctccctctc tgcctctcct ggagcatcag ccagtctcac ctgcacctg 480  
 cgcaggggca tcaatggttg tgcctacagt atatactggt accagcagaa gccagggagt 540  
 cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 600  
 tccagccgct tctctgcac caaagatgct tcggccaatg cagggathtt actcatctct 660  
 gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cggcgcttct 720  
 gcggtgttcg gcggagggac caagttgacc gtcctatccg gaggtggtgg atccgacgtc 780  
 caactggtgc agtcaggggc tgaagtgaaa aaacctgggg cctcagtgaa ggtgtcctgc 840  
 aaggcttctg gctacacctt tactaggtac acgatgcact gggtaaggca ggcacctgga 900  
 cagggctctg aatggattgg atacattaat cctagccgtg gttatactaa ttacgcagac 960  
 agcgtcaagg gccgcttcac aatcactaca gacaaatcca ccagcacagc ctacatggaa 1020  
 ctgagcagcc tgcgttctga ggacactgca acctattact gtgcaagata ttatgatgat 1080  
 cactactgcc ttgactactg gggccaaggc accacgggtc ccgtctcctc aggcgaaggt 1140  
 actagtactg gttctggtgg aagtggaggt tcaggtggag cagacgacat tgtactgacc 1200



ES 2 595 091 T3

cagtctccag caactctgtc tctgtctcca ggggagcgtg ccaccctgag ctgcagagcc 1260  
 agtcaaagtg taagttacat gaactggtac cagcagaagc cgggcaaggc acccaaaaga 1320  
 tggatttatg acacatccaa agtggettct ggagtccttg ctctgttcag tggcagtggg 1380  
 tctgggaccg actactctct cacaatcaac agcttgagg ctgaagatgc tgccacttat 1440  
 tactgccaac agtggagtag taaccgctc acgttcggtg gcgggacca ggtggagatc 1500  
 aaatag 1506

<210> 32  
 <211> 501  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> B9 VH - A240 VL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 32

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

ES 2 595 091 T3

Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu  
145 150 155 160

Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln  
165 170 175

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser  
180 185 190

Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys  
195 200 205

Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser  
210 215 220

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser  
225 230 235 240

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly  
245 250 255

Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro  
260 265 270

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
275 280 285

Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
290 295 300

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp  
305 310 315 320

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

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
340 345 350

Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly  
355 360 365

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly  
370 375 380

ES 2 595 091 T3

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr  
385 390 395 400

Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu  
405 410 415

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln  
420 425 430

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val  
435 440 445

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
450 455 460

Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr  
465 470 475 480

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
485 490 495

Lys Val Glu Ile Lys  
500

<210> 33  
<211> 1503  
5 <212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> A240 VL - B9 VH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 33  
caggccgtgc tgactcagcc ggcttcctc tctgcattc ctggagcacc agccagtctc 60  
acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120  
aagccagggg gtctctccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180  
ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240  
ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300  
agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtggt 360  
tctggcggcg gcggctccgg tgggtggtggt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420  
ggcttgggcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccgtc 480  
agtagctact ggatgcactg ggtccgcca gctccagga aggggctgga atgggtaggt 540

ES 2 595 091 T3

ttcattagaa acaaagctaa tgggtgggaca acagaatacg ccgctgtctgt gaaaggcaga 600  
 ttcaccatct caagagatga ttccaagaac acgctgtatc ttcaaatgaa cagcctgaga 660  
 gccgaggaca cggccgtgta ttactgtgca agagataggg ggctacgggt ctactttgac 720  
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctccggag gtgggtggatc cgacgtccaa 780  
 ctggtgcagt caggggctga agtgaaaaa cctggggcct cagtgaaggt gtccctgcaag 840  
 gcttctggct acacctttac taggtacacg atgcaactggg taaggcaggc acctggacag 900  
 ggtctggaat ggattggata cattaatcct agccgtgggt atactaatta cgcagacagc 960  
 gtcaagggcc gcttcacaat cactacagac aaatccacca gcacagccta catggaactg 1020  
 agcagcctgc gttctgagga cactgcaacc tattactgtg caagatatta tgatgatcat 1080  
 tactgccttg actactgggg ccaaggcacc acggtcaccg tctcctcagg cgaagggtact 1140  
 agtactgggt ctggtggaag tggagggtca ggtggagcag acgacattgt actgaccag 1200  
 tctccagcaa ctctgtctct gtctccaggg gagcgtgcca ccctgagctg cagagccagt 1260  
 caaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag cagaagccgg gcaaggcacc caaaagatgg 1320  
 atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtccctgctc gcttcagtgg cagtgggtct 1380  
 gggaccgact actctctcac aatcaacagc ttggaggctg aagatgctgc cacttattac 1440  
 tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcagc ttcggtggcg ggaccaaggt ggagatcaaa 1500  
 tag 1503

<210> 34  
 <211> 500  
 5 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> A240 VL - B9 VH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10 <400> 34

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

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala  
 20 25 30

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr  
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val

ES 2 595 091 T3

50 55 60

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

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
100 105 110

Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val  
145 150 155 160

Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
165 170 175

Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu  
180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
195 200 205

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp  
225 230 235 240

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
245 250 255

Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly  
260 265 270

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg  
275 280 285

Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

ES 2 595 091 T3

290 295 300

Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser  
 305 310 315 320

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

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 340 345 350

Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 355 360 365

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser  
 370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln  
 385 390 395 400

Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 405 410 415

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys  
 420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala  
 435 440 445

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr  
 450 455 460

Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr  
 465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 485 490 495

Val Glu Ile Lys  
 500

<210> 35  
 <211> 1506  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x B9 VH - A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

5

10

ES 2 595 091 T3

<400> 35  
gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60  
tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaggcaggca 120  
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180  
gcagacagcg tcaagggcog cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
gaaggtacta gtactggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
ctgaccagcgt ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcaccc 540  
aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc 600  
agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660  
acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaaggtg 720  
gagatcaaat ccggagggtgg tggatccgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcttg 780  
gtccagcctg ggagggtccct gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cgtcagtagc 840  
tactggatgc actgggtccg ccaagctcca gggaaagggc tggaatgggt aggtttcatt 900  
agaaacaaag ctaatggtgg gacaacagaa tacgccgcgt ctgtgaaagg cagattcacc 960  
atctcaagag atgattccaa gaacacgctg tatcttcaaa tgaacagcct gagagccgag 1020  
gacacggccg tgtattactg tgcaagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 1080  
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca ggtggtggtg gttctggcgg cggcggctcc 1140  
ggtggtggtg gttctgagct cgtgctgact cagccggctt ccctctctgc atctcctgga 1200  
gcatcagcca gtctcacctg caccttgccg aggggcatca atgttgggtc ctacagtata 1260  
tactggtacc agcagaagcc agggagtcct cccagtatc tcctgaggta caaatcagac 1320  
tcagataagc agcagggctc tggagtctcc agccgcttct ctgcatcaa agatgcttcg 1380  
gccaatgcag ggattttact catctctggg ctccagtctg aggatgaggc tgactattac 1440  
tgtatgattt ggcacagcgg cgcttctgcg gtgttcggcg gagggaccaa gttgaccgtc 1500  
ctatag 1506

5 <210> 36  
<211> 501  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> SEQ ID NO: 77 VHVL x B9 VH - A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 36

ES 2 595 091 T3

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



ES 2 595 091 T3

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 225 230 235 240

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

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
 260 265 270

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

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala  
 290 295 300

Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr  
 305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
 325 330 335

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly  
 340 345 350

Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 355 360 365

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 370 375 380

Ser Glu Leu Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly  
 405 410 415

Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln  
 420 425 430

Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly  
 435 440 445

# ES 2 595 091 T3

Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly  
 450 455 460

Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
 465 470 475 480

Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr  
 485 490 495

Lys Leu Thr Val Leu  
 500

<210> 37  
 <211> 1506  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A240 VL - B9 VH; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 37  
 gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatocta gccgtgggta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
 atggaactga gcagcctgog ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctctcaggc 360  
 gaaggtacta gtactggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
 ctgaccagct ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
 agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcaccc 540  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tcctctgctcg cttcagtggc 600  
 agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660  
 acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tgggtggcgg gaccaaggtg 720  
 gagatcaaat ccggaggtgg tggatcccag gccgtgctga ctgagccggc ttccctctct 780  
 gcatctctg gagcatcagc cagtctcacc tgcaccttgc gcaggggcat caatgttggt 840  
 gcctacagta tatactggta ccagcagaag ccagggagtc ctcccagta tctctgagg 900  
 tacaatcag actcagataa gcagcagggc tctggagtct ccagccgctt ctctgcatcc 960

ES 2 595 091 T3

aaagatgctt cggccaatgc agggatttta ctcatctctg ggctccagtc tgaggatgag 1020  
gctgactatt actgtatgat ttggcacagc ggcgcttctg cgggtgttcgg cggagggacc 1080  
aagttgaccg tcctaggtgg tgggtggttct ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggttct 1140  
gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 1200  
tcctgtgcag cgtctggatt caccgtcagt agctaactgga tgcaactgggt ccgccaagct 1260  
ccaggaagg ggctggaatg ggtaggtttc attagaaaca aagctaattg tgggacaaca 1320  
gaatacgccg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caagaacagc 1380  
ctgtatcttc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaaga 1440  
gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 1500  
tcctag 1506

<210> 38  
<211> 501  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A240 VL - B9 VH; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 38

Asp	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	Arg	Tyr	20	25	30	
Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	

ES 2 595 091 T3

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 195 200 205

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 225 230 235 240

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

Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr  
 260 265 270

Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln  
 275 280 285

Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp  
 290 295 300

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

Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln  
 325 330 335

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala  
 340 345 350

ES 2 595 091 T3

Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 370 375 380

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu  
 385 390 395 400

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Trp Met His Trp  
 405 410 415

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg  
 420 425 430

Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly  
 435 440 445

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 450 455 460

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 465 470 475 480

Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 485 490 495

Val Thr Val Ser Ser  
 500

<210> 39  
 <211> 1500  
 5 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> D8 VH – A240 VL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10 <400> 39  
 gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt acctatgcca tgcactgggt cgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatcaaatg atggaagcaa taatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtac tagagatagg 300

ES 2 595 091 T3

gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt 360  
 ggtggtggtt ctggcggcgg cggctccggt ggtggtggtt ctgagctcgt gctgactcag 420  
 ccggettccc tctctgcata tcctggagca tcagccagtc tcacctgcac cttgcgagg 480  
 ggcataaatg ttggtgccta cagtatatac tggtagcagc agaagccagg gagtcctccc 540  
 cagtatctcc tgaggtaaaa atcagactca gataagcagc agggctctgg agtctccagc 600  
 cgcttctctg catccaaaaga tgcttgggcc aatgcaggga ttttactcat ctctgggctc 660  
 cagtctgagg atgaggctga ctattactgt atgatttggc acagcggcgc ttctgagggtg 720  
 ttccggcggag ggaccaagt gaccgtccta tccggagggtg gtggatccga cgtccaactg 780  
 gtgcagtcag gggctgaagt gaaaaaacct ggggcctcag tgaagtgctc ctgcaaggct 840  
 tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa ggcaggcacc tggacagggt 900  
 ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtgggtata ctaattacgc agacagcgtc 960  
 aagggccgct tcacaatcac tacagacaaa tccaccagca cagcctacat ggaactgagc 1020  
 agcctgcggt ctgaggacac tgcaacctat tactgtgcaa gatattatga tgatcattac 1080  
 tgccttgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctcaggcga aggtactagt 1140  
 actggttctg gtggaagtgg aggttcaggt ggagcagacg acattgtact gaccagctct 1200  
 ccagcaactc tgtctctgct tccagggggag cgtgccaccc tgagctgcag agccagtcaa 1260  
 agtghtaagt acatgaactg gtaccagcag aagccgggca aggcaccaa aagatggatt 1320  
 tatgacacat ccaaagtggc ttctggagtc cctgctcgtc tcagtggcag tgggtctggg 1380  
 accgactact ctctcacaat caacagcttg gaggtgaag atgctgccac ttattactgc 1440  
 caacagtgga gtagtaacct gctcacgttc ggtggcggga ccaagtgga gatcaaatag 1500

<210> 40  
 <211> 499  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> D8 VH – A240 VL x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 40

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

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

ES 2 595 091 T3

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

Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu  
 130 135 140

Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg  
 145 150 155 160

Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys  
 180 185 190

Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala  
 195 200 205

Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp  
 210 215 220

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val  
 225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 245 250 255

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 260 265 270

ES 2 595 091 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
275 280 285

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
290 295 300

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
325 330 335

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
340 345 350

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
355 360 365

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
370 375 380

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
385 390 395 400

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
405 410 415

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
420 425 430

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
435 440 445

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
450 455 460

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
465 470 475 480

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
485 490 495

Glu Ile Lys

<210> 41  
<211> 1497  
<212> ADN



ES 2 595 091 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> A240 VL - D8 VH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

5

<400> 41

```

caggccgtgc tgactcagcc ggcttcctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc      60
acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag     120
aagccagggg gtccctccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag     180
ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt     240
ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac     300
agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagtga ccgctcctagg tggtggtggt     360
tctggcggcg gcggtccgg tggtggtggt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga     420
ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg attcacctc     480
agtacctatg ccatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca     540
cttatatcaa atgatggaag caataaatac tatgcagact ccgatgaagg cogattcacc     600
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaa tgaacagcct gagagctgag     660
gacacggctg tgtattactg tactagagat aggggctac ggttctactt tgactactgg     720
ggccaagggg ccacggtcac cgtctcctcc ggaggtggtg gatccgacgt ccaactggtg     780
cagtcagggg ctgaagtgaa aaaacctggg gcctcagtga aggtgtcctg caaggcttct     840
ggctacacct ttactaggta cacgatgcac tgggtaaggc aggcacctgg acagggctctg     900
gaatggattg gatacatata tccctagccgt ggttatacta attacgcaga cagcgtcaag     960
ggccgcttca caatcactac agacaaatcc accagcacag cctacatgga actgagcagc    1020
ctgcgttctg aggacactgc aaacctattac tgtgcaagat attatgatga tcattactgc    1080
cttgactact ggggccaagg caccacggtc accgtctcct caggcgaagg tactagtact    1140
ggttctggtg gaagtggagg ttcaggtgga gcagacgaca ttgtactgac ccagtctcca    1200
gcaactctgt ctctgtctcc aggggagcgt gccaccctga gctgcagagc cagtcaaagt    1260
gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag ccgggcaagg cacccaaaag atggatttat    1320
gacacatcca aagtggcttc tggagtcctt gctcgttca gtggcagtgg gtctgggacc    1380
gactactctc tcacaatcaa cagcttggag gctgaagatg ctgccactta ttactgcca    1440
cagtgagta gtaaccgct cacgttcggt ggcgggacca aggtggagat caaatag      1497

```

<210> 42

<211> 498

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10

<220>

ES 2 595 091 T3

<223> A240 VL - D8 VH x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 42

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

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala  
 20 25 30

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr  
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val  
 50 55 60

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

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 100 105 110

Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 130 135 140

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu  
 145 150 155 160

Ser Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 165 170 175

Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala  
 180 185 190

ES 2 595 091 T3

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 195 200 205

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 225 230 235 240

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

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser  
 260 265 270

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr  
 275 280 285

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 290 295 300

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 305 310 315 320

Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
 325 330 335

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 340 345 350

Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 355 360 365

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly  
 370 375 380

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro  
 385 390 395 400

Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg  
 405 410 415

Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 420 425 430

ES 2 595 091 T3

Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly  
 435 440 445

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu  
 450 455 460

Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 465 470 475 480

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 485 490 495

Ile Lys

<210> 43  
 <211> 1500  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x D8 VH – A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 43  
 gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaagggtg 60  
 tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
 atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
 gaaggtacta gtactggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
 ctgacccagt ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
 agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcacc 540  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc 600  
 agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgtgcc 660  
 acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaagggtg 720  
 gagatcaaat ccggagggtg tggatccgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcgtg 780  
 gtccagcctg ggaggtoctt gagactctcc tgtgcagcct ctggattcac cctcagtacc 840

ES 2 595 091 T3

tatgccatgc actgggtccg ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcacttata 900  
 tcaaatgatg gaagcaataa atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc 960  
 agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg 1020  
 gctgtgtatt actgtactag agataggggg ctacggttct actttgacta ctggggccaa 1080  
 gggaccaacg tcaccgtctc ctccaggtggg ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggg 1140  
 ggtggttctg agctcgtgct gactcagccg gcttccctct ctgcatctcc tggagcatca 1200  
 gccagtctca cctgcacctt gcgcaggggc atcaatggtg gtgcctacag tataactgg 1260  
 taccagcaga agccagggag tcctccccag tatctcctga ggtacaaatc agactcagat 1320  
 aagcagcagg gctctggagt ctccagccgc ttctctgcat ccaaagatgc ttcggccaat 1380  
 gcagggattt tactcatctc tgggctccag tctgaggatg aggctgacta ttactgtatg 1440  
 atttggcaca gcggcgcttc tgcggtgttc ggcggagggg ccaagttgac cgtcctatag 1500

<210> 44

<211> 499

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO: 77 VHVL x D8 VH – A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 44

Asp 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 Arg Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

ES 2 595 091 T3

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 195 200 205

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 225 230 235 240

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

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
 260 265 270

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

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly  
 290 295 300

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

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 325 330 335

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg  
 340 345 350

ES 2 595 091 T3

Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 370 375 380

Leu Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser  
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr  
 405 410 415

Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu  
 420 425 430

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

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu  
 450 455 460

Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met  
 465 470 475 480

Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 485 490 495

Thr Val Leu

- <210> 45
- <211> 1500
- 5 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A240 VL - D8 VH; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 45  
 gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaagggtg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaactcta gccgtgggta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggcog cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240

ES 2 595 091 T3

atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
gaaggtacta gtactggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
ctgacccagt ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcaccc 540  
aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccttgctcg cttcagtggc 600  
agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660  
acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaagggtg 720  
gagatcaaat ccggagggtgg tggatcccag gccgtgctga ctcagccggc ttccctctct 780  
gcatctctg gagcatcagc cagtctcacc tgcacctgac gcaggggcat caatgttggt 840  
gectacagta tatactggta ccagcagaag ccagggagtc ctccccagta tctcctgagg 900  
tacaaatcag actcagataa gcagcagggc tctggagtct ccagccgctt ctctgcatcc 960  
aaagatgctt cggccaatgc agggatttta ctcatctctg ggctccagtc tgaggatgag 1020  
gctgactatt actgtatgat ttggcacagc ggcgcttctg cgggtgttcgg cggagggacc 1080  
aagttgaccg tcctaggtgg tgggtggttct ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggttct 1140  
gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 1200  
tctgtgcag cctctggatt caccctcagt acctatgcca tgcaactgggt ccgccaggct 1260  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatcaaatg atggaagcaa taaatactat 1320  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 1380  
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtac tagagatagg 1440  
gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcctag 1500

<210> 46  
<211> 499  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A240 VL - D8 VH; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 46  
Asp 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 Arg Tyr



ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr  
 260 265 270

Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln  
 275 280 285

Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp  
 290 295 300

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

Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln  
 325 330 335

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala  
 340 345 350

Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
 355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 370 375 380

Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu  
 385 390 395 400

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Tyr Ala Met His Trp  
 405 410 415

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser  
 420 425 430

Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
 435 440 445

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
 450 455 460

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg  
 465 470 475 480

Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 485 490 495

Val Ser Ser

ES 2 595 091 T3

<210> 47  
 <211> 756  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> A5B7 VH – A240 VL; Fv monocatenario

<400> 47  
 gaggtgcagc tggtcgagtc aggaggaggc ttggtacagc ctggggggttc tctgagactc 60  
 tcctgtgcaa cttctggggtt caccttcact gattactaca tgaactgggt cgcaccagcct 120  
 ccaggaaagg cacttgagtg gttggggtttt attggaaaca aagctaattg ttacacaaca 180  
 gagtacagtg catctgtgaa gggtcgggttc accatctcca gagataaatc ccaaagcatc 240  
 ctctatcttc aatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtaccaga 300  
 gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt cacogtctcc 360  
 tcaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctca ggccgtgctg 420  
 actcagccgg ctccctctc tgcctctcct ggagcatcag ccagtctcac ctgcaccttg 480  
 cgcaggggca tcaatgttg tgcctacagt atatactggt accagcagaa gccagggagt 540  
 cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 600  
 tccagccgct tctctgcatc caaagatgct tcggccaatg cagggatctt actcatctct 660  
 gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cggcgcttct 720  
 gcggtgttcg gcggagggac caagttgacc gtccta 756

10

<210> 48  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

15

<220>  
 <223> A5B7 VH – A240 VL; Fv monocatenario

20 <400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

ES 2 595 091 T3

Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala  
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala  
130 135 140

Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu  
145 150 155 160

Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln  
165 170 175

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser  
180 185 190

Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys  
195 200 205

Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser  
210 215 220

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser  
225 230 235 240

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
245 250

<210> 49  
<211> 753  
5 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

10 <223> A5 VH – A240 VL; Fv monocatenario

<400> 49

ES 2 595 091 T3

```

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tctgtgcag cctctggatt caccctcagt acctatgcc a tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatcaa atg atggaagcaa taaatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatagg      300
gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt      360
ggtggtggtt ctggcggcgg cggctccggt ggtggtggtt ctcaggccgt gctgactcag      420
ccggcttccc tctctgcac tctctggagca tcagccagtc tcacctgcac cttgcgagg      480
ggcatcaatg ttggtgccta cagtatatac tgggtaccagc agaagccagg gagtcctccc      540
cagtatctcc tgagggtacaa atcagactca gataagcagc agggctctgg agtctccagc      600
cgcttctctg catccaaaga tgcttcggcc aatgcagggg ttttactcat ctctgggctc      660
cagtctgagg atgaggctga ctattactgt atgatttggc acagcggcgc ttctgcggtg      720
ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta tag                                     753

```

<210> 50  
 <211> 250  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <223> A5 VH – A240 VL; Fv monocatenario

<400> 50

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Leu	Ile	Ser	Asn	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

ES 2 595 091 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu  
130 135 140

Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg  
145 150 155 160

Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
165 170 175

Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys  
180 185 190

Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala  
195 200 205

Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp  
210 215 220

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val  
225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
245 250

<210> 51  
<211> 759  
5 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
10 <223> B9 VH – A240 VL; Fv monocatenario

<400> 51

ES 2 595 091 T3

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tectgtgcag cgtctggatt caccgtcagt agctactgga tgcaactgggt ccgccaagct 120  
 ccaggggaagg ggctggaatg ggtaggtttc attagaaaca aagctaattg tgggacaaca 180  
 gaatacgccg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caagaacacg 240  
 ctgtatcttc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaaga 300  
 gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 tcaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctca ggcctgctg 420  
 actcagccgg ctccctctc tgcatctcct ggagcatcag ccagtctcac ctgcacctg 480  
 cgcaggggca tcaatggtgg tgcctacagt atatactggt accagcagaa gccagggagt 540  
 cctccccagt atctctcgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 600  
 tccagccgct tctctgcac caaagatgct toggccaatg cagggatttt actcatctct 660  
 gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga ttggcacag cggcgcttct 720  
 gcggtgttcg gcggagggac caagttgacc gtccatag 759

<210> 52  
 <211> 252  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <223> B9 VH – A240VL; Fv monocatenario

<400> 52  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

ES 2 595 091 T3

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala  
 130 135 140

Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu  
 145 150 155 160

Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser  
 180 185 190

Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys  
 195 200 205

Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser  
 210 215 220

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser  
 225 230 235 240

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 245 250

5 <210> 53  
 <211> 753  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> D8 VH – A240VL; Fv monocatenario

<400> 53  
 gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt acctatgcca tgcactgggt cgcaccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatcaaatg atggaagcaa taaatactat 180



ES 2 595 091 T3

```

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtac tagagatagg      300
gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt      360
ggtggtggtt ctggcggcgg cggctccggt ggtggtggtt ctcaggccgt gctgactcag      420
ccggcttccc tctctgcata tcctggagca tcagccagtc tcacctgcac cttgcgcagg      480
ggcatcaatg ttggtgocata cagtatatac tgggtaccagc agaagccagg gagtctctcc      540
cagtatctcc tgagggtacaa atcagactca gataagcagc agggctctgg agtctccagc      600
cgcttctctg catccaaaga tgcttcggcc aatgcagggga ttttactcat ctctgggctc      660
cagtctgagg atgaggctga ctattactgt atgatttggc acagcggcgc ttctgcgggtg      720
ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta tag                                     753

```

<210> 54

<211> 250

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> D8 VH - A240VL; Fv monocatenario

<400> 54

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

```

```

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

```

ES 2 595 091 T3

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu  
 130 135 140

Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg  
 145 150 155 160

Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys  
 180 185 190

Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala  
 195 200 205

Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp  
 210 215 220

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val  
 225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 245 250

<210> 55  
 <211> 363  
 5 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <223> A5B7 VH; región VH

<400> 55  
 gaggtgcagc tggtcgagtc aggaggagc ttggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60  
 tcctgtgcaa cttctggggt caccttcaact gattactaca tgaactgggt ccgccagcct 120  
 ccaggaaagg cacttgagtg gttgggtttt attggaaaca aagctaattg ttacacaaca 180  
 gagtacagtg catctgtgaa gggtcgggtc accatctcca gagataaatc ccaaagcatc 240  
 ctctatcttc aaatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtaccaga 300  
 gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 tca 363

15 <210> 56  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

ES 2 595 091 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> A5B7 VH; región VH

5  
 <400> 56

```

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

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

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

Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50           55           60

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

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

Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100          105          110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115           120
    
```

<210> 57  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> A5 VH; región VH

<400> 57

```

gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt acctatgccca tgcactgggt cgcaggct      120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatcaaatg atggaagcaa taaatactat      180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatagg      300

gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca      357
    
```

20  
 <210> 58  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 595 091 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> A5 VH; región VH

5

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 59  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> B9 VH; región VH

15

<400> 59

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccgtcagt agctactgga tgactgggt ccgccaagct 120  
 ccaggaagg ggctggaatg ggtaggtttc attagaaaca aagctaattg tgggacaaca 180  
 gaatacgccg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caagaacacg 240  
 ctgtatcttc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaaga 300  
 gatagggggc tacggttcta cttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 tca 363

20

<210> 60

ES 2 595 091 T3

<211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> B9 VH; región VH

<400> 60

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

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

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

10 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 61  
 <211> 357  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <223> D8 VH; región VH

<400> 61

gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tctctgtgcag cctctggatt caccctcagt acctatgccca tgcactgggt cgcaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatcaaatg atggaagcaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtac tagagatagg 300

gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca 357

25 <210> 62  
 <211> 119

ES 2 595 091 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> D8 VH; región VH

<400> 62

```

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```

10

<210> 63  
<211> 348  
<212> ADN  
15 <213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> A240 VL; región VL

20

<400> 63

```

caggccgtgc tgactcagcc ggcttcctc tctgcatctc ctggagcacc agccagtctc      60
acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag      120
aagccagggg gtcctcccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag      180
ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt      240
ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac      300
agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagttga ccgtccta      348

```

25 <210> 64  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 595 091 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> A240VL; región VL  
 5 <400> 64  
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala  
 20 25 30  
 Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr  
 35 40 45  
 Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 100 105 110  
 Leu Thr Val Leu  
 115  
 10 <210> 65  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-H3\* A5B7 CDR-3 más corta de VH del A5B7, con D que corresponde a la posición de Kabat 95; las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, 102 corresponden a FYFDY, respectivamente  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> con "X1", "X2", "X3" y "X4" que corresponden a las posiciones de Kabat 96 ("X1"), 97 ("X2"), 98 ("X3") y 99 ("X4"), respectivamente, de CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 y en las que "X" representa cualquier residuo aminoacídico. "X1" es preferentemente "R"  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural  
 30 <400> 65  
 Asp Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 35 <210> 66  
 <211> 10  
 <212> PRT

ES 2 595 091 T3

<213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <223> CDR-H3 A5B7 CDR-3 de VH del A5B7 que corresponde a las posiciones de Kabat 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 100b, 101, 102

<400> 66  
 Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

10 <210> 67  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-H2 B9; CDR-2 de VH B9

20 <400> 67  
 Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 68  
 <211> 5  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <223> CDR-H1 B9; CDR1 de VH B9

<400> 68  
 Ser Tyr Trp Met His  
 1 5

35 <210> 69  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-H2 A5/D8; CDR-2 de VH A5/D8

<400> 69  
 Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

45 Gly

<210> 70  
 <211> 5  
 50 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 55 <223> CDR-H1 A5/D8; CDR-1 de VH A5/D8



<400> 70  
 Thr Tyr Ala Met His  
 1 5

5 <210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-L3 A240; CDR-3 de VL A240

<400> 71  
 Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val  
 1 5 10

15 <210> 72  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-L2 A240; CDR-2 de VL A240

25 <400> 72  
 Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser  
 1 5 10

30 <210> 73  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-L1 A240; CDR-1 de VL A240

<400> 73  
 Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr  
 1 5 10

40 <210> 74  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

45 <220>  
 <223> 5' CEACAM5 EcoRI; oligonucleótido

<400> 74  
 gaattcgcca ccatggagtc tccctcggcc cc 32

50 <210> 75  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 55 <213> secuencia artificial

<220>

ES 2 595 091 T3

<223> 3' CEACAM5 Sall; oligonucleótido

<400> 75

gtcgacctat atcagagcaa cccc

24

5

<210> 76

<211> 702

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> CEACAM5 (NM\_004363); proteína

15

<400> 76

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln  
1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr  
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly  
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly  
50 55 60

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn  
545 550 555 560

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

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly  
580 585 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly  
595 600 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln  
610 615 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu  
625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe  
645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile  
660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr  
675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile  
690 695 700

<210> 77  
<211> 243  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> Fv monocatenario con VHVL anti-CD3 desinmunizado como se describe en el documento WO2005/040220

10 <400> 77

Asp 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 Arg Tyr  
20 25 30

ES 2 595 091 T3

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 195 200 205

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 78  
 <211> 38  
 5 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> 5'-huVK1-Sacl-2001; oligonucleótido

10 <400> 78

		gagccgcacg agcccgagct ccagatgacc cagtctcc	38
5		<210> 79 <211> 38 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10		<220> <223> 5'-huVK2/4-Sacl-2001; oligonucleótido	
		<400> 79 gagccgcacg agcccgagct cgtgatgacy cagtctcc	38
15		<210> 80 <211> 38 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20		<220> <223> 5'-huVK3-Sacl-2001; oligonucleótido	
		<400> 80 gagccgcacg agcccgagct cgtgwtgacr cagtctcc	38
25		<210> 81 <211> 38 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30		<220> <223> 5'-huVK5-Sacl-2001; oligonucleótido	
		<400> 81 gagccgcacg agcccgagct cacactcacg cagtctcc	38
35		<210> 82 <211> 38 <212> ADN <213> SECUENCIA ARTIFICIAL	
40		<220> <223> 5'-huVK6-Sacl-2001; oligonucleótido	
45		<400> 82 gagccgcacg agcccgagct cgtgctgact cagtctcc	38
50		<210> 83 <211> 47 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55		<220> <223> 3'-hu-Vk-J1-Spel-BsiWI; oligonucleótido	
		<400> 83 gacgacacta gttgcagcca ccgtacgttt gatttccacc ttgtcc	47
60		<210> 84 <211> 47 <212> ADN <213> secuencia artificial	

ES 2 595 091 T3

<220>  
 <223> 3'-hu-Vk-J2/4-Spel-BsiWI; oligonucleótido

5 <400> 84  
 gacgacacta gttgcagcca ccgtacgttt gatctccasc ttggtcc 47

<210> 85  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10

<220>  
 <223> 3'-hu-Vk-J3-Spel-BsiWI; oligonucleótido

15 <400> 85  
 gacgacacta gttgcagcca ccgtacgttt gatataccact ttggtcc 47

<210> 86  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20

<220>  
 <223> 3'-hu-Vk-J5-Spel-BsiWI; oligonucleótido

25 <400> 86  
 gacgacacta gttgcagcca ccgtacgttt aatctccagt cgtgtcc 47

<210> 87  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

30

<220>  
 <223> 5'-huVL1a-Sacl-2001; oligonucleótido

35 <400> 87  
 gagccgcacg agcccagct cgtggtgacg cagccgcct c 41

40

<210> 88  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

45

<220>  
 <223> 5'-huVL1b-Sacl-2001; oligonucleótido

50 <400> 88  
 gagccgcacg agcccagct cgtgctgact cagccacct c 41

<210> 89  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

55

<220>  
 <223> 5'-huVL2-Sacl-2001; oligonucleótido

60 <400> 89



	gagccgcagg agcccgagct cgcctgact cagcctscct ccgt	44
5	<210> 90 <211> 35 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> 5'-huVL4-Sacl-2001; oligonucleótido	
	<400> 90 acctgcgagc tcgtgctgac tcarycmycc tctgc	35
15	<210> 91 <211> 33 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> 5'-huVL5-Sacl-2001; oligonucleótido	
	<400> 91 acctgcgagc tcgtgctgac tcagccrsct tcc	33
25	<210> 92 <211> 32 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> 5'-huVL6-Sacl-2001; oligonucleótido	
35	<400> 92 acctgcgagc tcatgctgac tcagccccac tc	32
40	<210> 93 <211> 41 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> 5'-huVL3/9-Sacl-2001; oligonucleótido	
	<400> 93 gagccgcacg agcccgagct cgggctgact cagccaccyt c	41
50	<210> 94 <211> 41 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> 5'-huVL7/8-Sacl-2001; oligonucleótido	
	<400> 94 gagccgcacg agcccgagct cgtggtgacy caggagccmt c	41
60	<210> 95 <211> 33 <212> ADN <213> secuencia artificial	

	<220> <223> 3'-hu-Vlam-BlnI-SpeI-2001; oligonucleótido	
5	<400> 95 cgtgggacta gtcttgggct gacctaggac ggt	33
	<210> 96 <211> 33 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10		
	<220> <223> 3'-hu-Vlam2-BlnI-SpeI-2002; oligonucleótido	
15	<400> 96 cgtgggacta gtcttgggct gaccgaggac ggt	33
	<210> 97 <211> 31 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20		
	<220> <223> cebador en 5' 5'-AVH-XhoI; oligonucleótido	
25	<400> 97 gtcacactcg agtcaggagg aggcttgga c	31
	<210> 98 <211> 31 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30		
	<220> <223> cebador en 3' 3'-AVH-BstEII; oligonucleótido	
35	<400> 98 gtcacaggtg accgtggtcc cttggcccca g	31
40		
	<210> 99 <211> 10 <212> PRT <213> secuencia artificial	
45		
	<220> <223> marca Flag	
	<400> 99 Thr Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys 1                    5                    10	
50		
	<210> 100 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55		
	<220> <223> 5'-huVH1, 3, 5-XhoI-2001; oligonucleótido	
60	<400> 100	

	aggtgcagct gctcgagtct gg	22
5	<210> 101 <211> 23 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> 5'-huVH4-XhoI-2001; oligonucleótido	
	<400> 101 caggtgcagc tgctcgagtc ggg	23
15	<210> 102 <211> 23 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> 5'-huVH4B-XhoI-2001; oligonucleótido	
	<400> 102 caggtgcagc tactcgagtg ggg	23
25	<210> 103 <211> 17 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> 3'-hu-VH-BstEII-2001; oligonucleótido	
	<400> 103 ctgaggagac ggtgacc	17
35	<210> 104 <211> 17 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> 3'-hu-VH-J3-BstEII-2001; oligonucleótido	
45	<400> 104 ctgaagagac ggtgacc	17
50	<210> 105 <211> 51 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> 3'-A134-VH1A; oligonucleótido	
	<400> 105 gtagtcaaag tagaaccgta gcccctatc tctygcacag taatacacgg c	51
60	<210> 106 <211> 51 <212> ADN	

ES 2 595 091 T3

<213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> 3'-A134-VH1B; oligonucleótido  
 5 <400> 106  
 gtagtcaaag tagaaccgta gccccctatc tctygcacag taatacayrg c 51

<210> 107  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> 3'-A134-VH3A; oligonucleótido  
 15 <220>  
 <221> variación  
 <222> (34)..(34)  
 20 <223> /reemplazar = "a"  
 /reemplazar = "c"  
 /reemplazar = "g"  
 25 <400> 107  
 gtagtcaaag tagaaccgta gccccctatc tcttgyacag taatacacrg c 51

<210> 108  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> 3' -A134-VH3B; oligonucleótido  
 35 <220>  
 <221> variación  
 <222> (34)..(34)  
 40 <223> /reemplazar = "a"  
 /reemplazar = "c"  
 /reemplazar = "g"  
 45 <400> 108  
 gtagtcaaag tagaaccgta gccccctatc tcttgcacag taatacaarg c 51

<210> 109  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> 3'-A134-VH4; oligonucleótido  
 55 <400> 109  
 gtagtcaaag tagaaccgta gccccctatc tctsgcacag taatacacrg c 51

<210> 110  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 60

# ES 2 595 091 T3

<220>

<223> 3' A134-JH6-BstEI; oligonucleótido

5

<400> 110

cgagacggtg accgtggtcc cttggcccca gtagtcaaag tagaaccgta gcc

53

<210> 111

<211> 207

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15

<223> CD3 épsilon (NM\_000733); proteína

<400> 111

ES 2 595 091 T3

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser  
 1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr  
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr  
 35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys  
 50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp  
 65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr  
 85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu  
 100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met  
 115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu  
 130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys  
 145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn  
 165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg  
 180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile  
 195 200 205

<210> 112  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <223> CDR-H3 A5B7 CDR-3 más corta de VH del A5B7 con D correspondiente a las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, 102

<400> 112

ES 2 595 091 T3

Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 113  
 <211> 6  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <223> CDR-H3 A5B7 CDR-3 más corta de VH del A5B7 correspondiente a las posiciones de Kabat 99, 100, 100a, 100b, 101, 102

<400> 113  
 Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

15 <210> 114  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-H3 A5B7 CDR-3 más corta de VH del A5B7 correspondiente a las posiciones de Kabat 98, 99, 100, 100a, 100b, 101, 102

25 <400> 114  
 Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

30 <210> 115  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-H3 A5B7 CDR-3 más corta de VH del A5B7 correspondiente a las posiciones de Kabat 97, 98, 99, 100, 100a, 100b, 101, 102

<400> 115  
 Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

40 <210> 116  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 45 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> DR-H3 A5B7 CDR-3 más corta de VH del A5B7 correspondiente a las posiciones de Kabat 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 100b, 101, 102

50 <400> 116  
 Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

55 <210> 117  
 <211> 759

# ES 2 595 091 T3

<212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 5 <223> A240 VL-A5B7 VH; Fv monocatenario

<400> 117  
 caggccgtgc tgactcagcc ggcttcctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc 60  
 acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120  
 aagccagggg gtcctcccca gtatctctctg aggtacaaat cagaactcaga taagcagcag 180  
 ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240  
 ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300  
 agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtggt 360  
 tetggcggcg geggetccgg tgggtggtggt tctgaggtgc agctggtcga gtcaggagga 420  
 ggcttggtac agcctggggg ttctctgaga ctctcctgtg caacttctgg gttcaccttc 480  
 actgattact acatgaactg ggtccgccag cctccaggaa aggcacttga gtggttgggt 540  
 ttatttgaa acaaagctaa tggttacaca acagagtaca gtgcatctgt gaagggtcgg 600  
 ttcaccatct ccagagataa atcccaaagc atcctctatc ttcaaatgaa caccctgaga 660  
 gctgaggaca gtgccactta ttactgtacc agagataggg ggctacggtt ctactttgac 720  
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctcctga 759

10 <210> 118  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

15 <220>  
 <223> A240 VL -A5B7 VH; Fv monocatenario

<400> 118



ES 2 595 091 T3

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

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala  
 20 25 30

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr  
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val  
 50 55 60

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

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 100 105 110

Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe  
 145 150 155 160

Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu  
 165 170 175

Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu  
 180 185 190

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser  
 195 200 205

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser  
 210 215 220

Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp  
 225 230 235 240

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

ES 2 595 091 T3

<211> 753  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> A240VL -A5 VH; Fv monocatenario

<400> 119  
 caggccgtgc tgactcagcc ggcttcctc tctgcatctc ctggagcacc agccagtctc 60  
 acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120  
 aagccaggga gtccctccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180  
 ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240  
 ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300  
 agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtgt 360  
 tctggcggcg gcggctccgg tgggtggtgt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420  
 ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg attcaccctc 480  
 agtacctatg ccatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 540  
 cttatatcaa atgatggaag caataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 600  
 atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagctgag 660  
 gacacggccg tgtattactg tgcgagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 720  
 10 ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctcc tga 753

<210> 120  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> A240VL -A5 VH; Fv monocatenario

20 <400> 120

ES 2 595 091 T3

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

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala  
20 25 30

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr  
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val  
50 55 60

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

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
100 105 110

Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
130 135 140

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu  
145 150 155 160

Ser Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
165 170 175

Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala  
180 185 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
195 200 205

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp  
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
245 250

ES 2 595 091 T3

<210> 121  
 <211> 759  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> A240VL- B9 VH; Fv monocatenario

10

<400> 121  
 caggccgtgc tgactcagcc ggcttcacctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc 60  
 acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120  
 aagccagggg gtctctccca gtatctctctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180  
 ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240  
 ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggtgact attactgtat gatttggcac 300  
 agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtggt 360  
 tctggcggcg gcggtccgg tgggtggtggt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420  
 ggcttgggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccgtc 480  
 agtagctact ggatgcactg ggtccgcca gctccagggg aggggctgga atgggtaggt 540  
 ttcattagaa acaaagctaa tgggtgggaca acagaatagc ccgcgtctgt gaaaggcaga 600  
 ttcaccatct caagagatga ttccaagaac acgctgtatc ttcaaatgaa cagcctgaga 660  
 gccgaggaca cggccgtgta ttactgtgca agagataggg ggctacgggt ctactttgac 720  
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctcctga 759

<210> 122  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> A240VL- B9 VH; Fv monocatenario

20

<400> 122

ES 2 595 091 T3

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

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala  
 20 25 30

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr  
 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val  
 50 55 60

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

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 100 105 110

Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 130 135 140

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val  
 145 150 155 160

Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 165 170 175

Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu  
 180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
 195 200 205

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
 210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp  
 225 230 235 240

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

ES 2 595 091 T3

<210> 123  
 <211> 753  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> A240VL -D8 VH; Fv monocatenario  
 10  
 <400> 123  
 cagggcgtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgcatctc ctggagcacc agccagtctc 60  
 acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120  
 aagccagggg gtccctccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180  
 ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240  
 ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggtgact attactgtat gatttggcac 300  
 agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtggt 360  
 tctggcgggc gcggtcccg tggtggtggt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420  
 ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg attcaccctc 480  
 agtacctatg ccatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca 540  
 cttatatcaa atgatggaag caataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc 600  
 atctccagag acaattccaa gaacacgtg tatctgcaaa tgaacagcct gagagctgag 660  
 gacacggctg tgtattactg tactagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 720  
 ggccaagggg ccacggtcac cgtctcctcc tga 753

<210> 124  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> A240VL -D8 VH; Fv monocatenario  
 20  
 <400> 124  
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
  
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala



ES 2 595 091 T3

<212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>

5 <221> A5 VH - A240 VL# x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 125

```

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt acctatgcc a tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatcaaatg atggaagcaa taaatactat      180
gcagactccg tgaagggcog attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatagg      300
gggctacggt tctactttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt      360
ggtggtggtt ctggcggcgg eggctccggt ggtggtggtt ctcaggccgt gctgactcag      420
ccggcttccc tctctgcate tcctggagca tcagccagtc tcacctgac cttgcgagg      480
ggcatcaatg ttggtgccta cagtatatac tgggtaccagc agaagccagg gagtctctcc      540
cagtatctcc tgaggtaaa atcagactca gataagcagc agggctctgg agtctccagc      600
cgcttctctg catcaaaga tgcttcggcc aatgcaggga ttttactcat ctctgggctc      660
cagtctgagg atgaggctga ctattactgt atgatttggc acagcggcgc ttctgcggtg      720
ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta tcoggagggtg gtggatccga cgtccaactg      780
gtgcagtcag gggctgaagt gaaaaaacct ggggcctcag tgaagggtgc ctgcaaggct      840
tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa ggcaggcacc tggacagggt      900
ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacgc agacagcgtc      960
aagggccgct tcacaatcac tacagacaaa tccaccagca cagcctacat ggaactgagc     1020
agcctgcggt ctgaggacac tgcaacctat tactgtgcaa gatattatga tgatcattac     1080
tgcocttgact actggggcca aggcaccagc gtcaaccgtc cctcaggcga aggtactagt     1140
actggttctg gtggaagtgg aggttcaggt ggagcagacg acattgtact gaccagctct     1200
ccagcaactc tgtctctgtc tccaggggag cgtgccaccc tgagctgcag agccagtcaa     1260
agtgtaagtt acatgaactg gtaccagcag aagccgggca aggcacccaa aagatggatt     1320
tatgacacat ccaaagtggc ttctggagtc cctgctcgct tcagtggcag tgggtctggg     1380
accgactact ctctcacaat caacagcttg gaggtgaag atgctgccac ttattactgc     1440
caacagtgga gtagtaacct gctcacgttc ggtggcggga ccaaggtgga gatcaaatag     1500
    
```

10

<210> 126  
 <211> 499  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial



ES 2 595 091 T3

<220>

<223> A5 VH - A240 VL# x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

5 <400> 126

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu  
 130 135 140

Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg  
 145 150 155 160

Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys  
 180 185 190

ES 2 595 091 T3

Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala  
 195 200 205

Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp  
 210 215 220

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val  
 225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 245 250 255

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 260 265 270

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 275 280 285

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 290 295 300

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 325 330 335

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 340 345 350

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 385 390 395 400

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 405 410 415

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 420 425 430

ES 2 595 091 T3

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 435 440 445

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 450 455 460

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 465 470 475 480

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 485 490 495

Glu Ile Lys

<210> 127  
 <211> 1500  
 5 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A5 VH – A240 VL#; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 127  
 gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaagggtg 60  
 tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatocta gccgtgggta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
 atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
 gaaggtacta gtactggttc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
 ctgaccagct ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
 agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcacc 540  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc 600  
 agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660  
 acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcgggtggcg gaccaagggtg 720  
 gagatcaaat ccggagggtg tggatccgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcgtg 780  
 gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc tgtgcagcct ctggattcac cctcagtacc 840  
 tatgccatgc actgggtccg ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcacttata 900

ES 2 595 091 T3

tcaaatgatg gaagcaataa atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc 960  
 agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg 1020  
 gcogtgtatt actgtgcgag agataggggg ctacggttct actttgacta ctggggccaa 1080  
 gggaccacgg tcaccgtctc ctccaggtggt ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggt 1140  
 ggtggttctc aggccgtgct gactcagccg gcttccctct ctgcatctcc tggagcatca 1200  
 gccagtctca cctgcacctt gcgcaggggc atcaatgttg gtgcctacag tatatactgg 1260  
 taccagcaga agccagggag tcctccccag tatctctga ggtacaaatc agactcagat 1320  
 aagcagcagg gctctggagt ctccagccgc ttctctgcat ccaaatgatgc ttcggccaat 1380  
 gcagggattt tactcatctc tgggctccag tctgaggatg aggetgacta ttactgtatg 1440  
 atttggcaca gcggcgcttc tgcggtgttc ggccggagggga ccaagttgac cgtcctatag 1500

<210> 128  
 <211> 499  
 5 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x A5 VH – A240 VL#; anticuerpo monocatenario biespecifico

10 <400> 128

Asp	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	Arg	Tyr
			20					25						30	
Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		

ES 2 595 091 T3

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 130 135 140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 195 200 205

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 225 230 235 240

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

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
 260 265 270

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

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly  
 290 295 300

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

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 325 330 335

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg  
 340 345 350

ES 2 595 091 T3

Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 370 375 380

Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser  
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr  
 405 410 415

Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu  
 420 425 430

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

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu  
 450 455 460

Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met  
 465 470 475 480

Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 485 490 495

Thr Val Leu

- <210> 129
- <211> 1506
- 5 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> B9 VH -A240 VL# x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 129  
 gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccgtcagt agctactgga tgcactgggt ccgccaagct 120  
 ccaggggaagg ggctggaatg ggtaggtttc attagaaaca aagctaattg tgggacaaca 180  
 gaatacgccg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caagaacacg 240

ES 2 595 091 T3

ctgtatcttc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaaga 300  
gatagggggc tacggttcta ctttgactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360  
tcagggtggtg gtggttctgg cggcggcgcc tccgggtggtg gtggttctca ggccgtgctg 420  
actcagccgg cttccctctc tgcatctcct ggagcatcag ccagtctcac ctgcacctg 480  
cgcaggggca tcaatgttgg tgcctacagt atatactggt accagcagaa gccagggagt 540  
cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 600  
tccagccgct tctctgcac caaagatgct tcggccaatg cagggatttt actcatctct 660  
gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cggcgcttct 720  
goggtgttcg gcggaggggc caagttgacc gtccatccg gaggtggtgg atccgacgtc 780  
caactggtgc agtcaggggc tgaagtgaaa aaacctgggg cctcagtga ggtgtcctgc 840  
aaggcttctg gctacacctt tactaggtac acgatgcact ggtaaggca ggcacctgga 900  
cagggctctgg aatggattgg atacattaat cctagccgtg gttatactaa ttacgcagac 960  
agcgtcaagg gccgcttcac aatcactaca gacaaatcca ccagcacagc ctacatggaa 1020  
ctgagcagcc tgcgttctga ggacactgca acctattact gtgcaagata ttatgatgat 1080  
cattactgcc ttgactactg gggccaaggc accacggcca ccgtctctc aggcgaaggt 1140  
actagtactg gttctggtgg aagtggaggt tcaggtggag cagacgacat tgtactgacc 1200  
cagtctccag caactctgtc tctgtctcca ggggagcgtg ccacctgag ctgcagagcc 1260  
agtcaaagt taagttacat gaactggtac cagcagaagc cgggcaaggc acccaaaaga 1320  
tggatttatg acacatocaa agtggcttct ggagtcctg ctcgcttcag tggcagtggg 1380  
tctgggaccg actactctct cacaatcaac agcttgagg ctgaagatgc tgccacttat 1440  
tactgccaac agtggagtag taaccgctc acgttcggtg gcgggaccaa ggtggagatc 1500  
aatag 1506

<210> 130  
<211> 501  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> B9 VH -A240 VL# x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 130

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

ES 2 595 091 T3

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

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala  
 130 135 140

Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu  
 145 150 155 160

Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser  
 180 185 190

Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys  
 195 200 205

Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser  
 210 215 220

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser  
 225 230 235 240

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly  
 245 250 255



ES 2 595 091 T3

Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro  
 260 265 270

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 275 280 285

Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
 290 295 300

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp  
 305 310 315 320

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

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
 340 345 350

Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly  
 355 360 365

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly  
 370 375 380

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr  
 385 390 395 400

Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu  
 405 410 415

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln  
 420 425 430

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val  
 435 440 445

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 450 455 460

Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr  
 465 470 475 480

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 485 490 495

Lys Val Glu Ile Lys  
 500

ES 2 595 091 T3

<210> 131  
 <211> 1506  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x B9 VH - A240 VL#; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 131  
 gacgtccaac tggatgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggcgc cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
 atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
 gaaggtacta gtactgggtc tggatggaagt ggagggtcag gtggagcaga cgacattgta 420  
 ctgaccagtc ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
 agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tggatccagc agaagccggg caaggcacc 540  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc 600  
 agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660  
 acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaaggtg 720  
 gagatcaaat ccggagggtg tggatccgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcttg 780  
 gtccagcctg ggaggctcct gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cgtcagtagc 840  
 tactggatgc actgggtccg ccaagctcca ggggaagggc tggatgggt aggtttcatt 900  
 agaaacaaag ctaatgggtg gacaacagaa tacgccgcgt ctgtgaaagg cagattcacc 960  
 atctcaagag atgattccaa gaacacgctg tatcttcaa tgaacagcct gagagccgag 1020  
 gacacggcgc tgtattactg tgcaagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 1080  
 ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca ggtgggtggtg gttctggcgg cggcggctcc 1140  
 ggtgggtggtg gttctcaggc cgtgctgact cagccggctt cctctctgct atctcctgga 1200  
 gcatcagcca gtctcaoctg caccttgccg aggggcatca atgttgggtc ctacagtata 1260  
 tactggtacc agcagaagcc agggagtcct cccagtatc tcctgaggta caaatcagac 1320  
 tcagataagc agcagggctc tggagtctcc agccgcttct ctgcatocaa agatgcttcg 1380  
 gccaatgcag ggattttact catctctggg ctccagctctg aggatgaggc tgactattac 1440  
 tgtatgattt ggcacagcgg cgcttctgcg gtgttcggcg gagggaccaa gttgaccgtc 1500  
 ctatag 1506

10

<210> 132  
 <211> 501

ES 2 595 091 T3

<212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>

5 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x B9 VH - A240 VL#; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 132

```

Asp 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 Arg Tyr
20          25          30

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100         105         110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly
115         120         125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
130         135         140

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
145         150         155         160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    
```

ES 2 595 091 T3

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

ES 2 595 091 T3

			405						410					415	
Ala	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Gln
			420					425					430		
Tyr	Leu	Leu	Arg	Tyr	Lys	Ser	Asp	Ser	Asp	Lys	Gln	Gln	Gly	Ser	Gly
			435				440					445			
Val	Ser	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Ser	Ala	Asn	Ala	Gly
	450					455					460				
Ile	Leu	Leu	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr
465					470					475					480
Cys	Met	Ile	Trp	His	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
				485					490					495	
Lys	Leu	Thr	Val	Leu											
				500											

<210> 133  
 <211> 1500  
 5 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> D8 VH - A240 VL# x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10 <400> 133

gaggtgcagc	tggtcgagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tctgtgagc	cctctggatt	caccctcagt	acctatgcca	tgcaactggg	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcactt	atatcaaatg	atggaagcaa	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agctgaggac	acggctgtgt	attactgtac	tagagatagg	300
gggctacggt	tctactttga	ctactggggc	caagggacca	cggtcaccgt	ctcctcaggt	360
ggtggtggtt	ctggcggcgg	cggtccggt	ggtggtggtt	ctcaggccgt	gctgactcag	420
ccggcttccc	tctctgcate	tcttgagca	tcagccagtc	tcacctgcac	cttgccgagg	480
ggcatcaatg	ttggtgccta	cagtatatac	tggtaccagc	agaagccagg	gagtcctccc	540
cagtatctcc	tgaggtaaaa	atcagactca	gataagcagc	agggtctctg	agtctccagc	600
cgcttctctg	catccaaaga	tgcttcggcc	aatgcagggg	ttttactcat	ctctgggctc	660
cagtctgagg	atgaggctga	ctattactgt	atgatttggc	acagcggcgc	ttctgcggtg	720

ES 2 595 091 T3

ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta tccggagggtg gtggatccga cgtccaactg 780  
 gtgcagtcag gggctgaagt gaaaaaacct ggggcctcag tgaagggtgc ctgcaaggct 840  
 tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa ggcaggcacc tggacagggt 900  
 ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacgc agacagcgtc 960  
 aagggccgct tcacaatcac tacagacaaa tccaccagca cagcctacat ggaactgagc 1020  
 agcctgcggt ctgaggacac tgcaacctat tactgtgcaa gatattatga tgatcattac 1080  
 tgccttgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctcaggcga aggtactagt 1140  
 actggttctg gtggaagtgg aggttcaggt ggagcagacg acattgtact gaccagctct 1200  
 ccagcaactc tgtctctgtc tccaggggag cgtgccaccc tgagctgcag agccagtcaa 1260  
 agtghtaagtt acatgaactg gtaccagcag aagccgggca aggcacccaa aagatggatt 1320  
 tatgacacat ccaaagtggc ttctggagtc cctgctcgct tcagtggcag tgggtctggg 1380  
 accgactact ctctcacaat caacagcttg gaggtgaag atgctgccac ttattactgc 1440  
 caacagtgga gtagtaaccc gctcacgttc ggtggcggga ccaaggtgga gatcaaatag 1500

<210> 134  
 <211> 499  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> D8 VH - A240 VL# x SEQ ID NO: 77 VHVL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 134

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

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

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

Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

ES 2 595 091 T3

85 90 95

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu  
 130 135 140

Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg  
 145 150 155 160

Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys  
 180 185 190

Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala  
 195 200 205

Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp  
 210 215 220

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val  
 225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 245 250 255

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 260 265 270

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 275 280 285

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 290 295 300

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

ES 2 595 091 T3

325 330 335

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 340 345 350

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 355 360 365

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 385 390 395 400

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 405 410 415

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 420 425 430

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 435 440 445

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
 450 455 460

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 465 470 475 480

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 485 490 495

Glu Ile Lys

- <210> 135
- <211> 1500
- 5 <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x D8 VH – A240 VL#; anticuerpo monocatenario biespecifico
- 10 <400> 135
- gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60
- tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcaactgggt aaggcaggca 120



ES 2 595 091 T3

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180  
gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
gaaggtacta gtactgggtc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
ctgaccagct ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcacc 540  
aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tcctgctcg cttcagtggc 600  
agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660  
acttattact gccaacagtg gagtagtaac ccgctcacgt tcggtggcgg gaccaagtg 720  
gagatcaaat ccggaggtgg tggatccgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcgtg 780  
gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc tgtgcagcct ctggattcac cctcagtacc 840  
tatgccatgc actgggtccg ccaggtcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcacttata 900  
tcaaatgatg gaagcaataa atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc 960  
agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg 1020  
gctgtgtatt actgtactag agataggggg ctacggttct actttgacta ctggggccaa 1080  
gggaccacgg tcaccgtctc ctccaggtgg tgggttctc gcggcggcgg ctccggtgg 1140  
gggtggttctc aggcctgct gactcagccg gcttccctct ctgcatctcc tggagcatca 1200  
gccagtctca cctgcacctt gcgcaggggc atcaatggtg gtgcctacag tatatactgg 1260  
taccagcaga agccagggag tcctccccag tatctctga ggtacaaatc agactcagat 1320  
aagcagcagg gctctggagt ctccagccg ttctctgcat ccaaagatgc ttcggccaat 1380  
gcagggattt tactcatctc tgggtccag totgaggatg aggctgacta ttactgtatg 1440  
atltggcaca gcggcgcttc tgcggtgttc ggcggaggga ccaagttgac cgtcctatag 1500

<210> 136  
<211> 499  
5 <212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x D8 VH – A240 VL#; anticuerpo monocatenario biespecifico

<400> 136

Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

## ES 2 595 091 T3

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

# ES 2 595 091 T3

```

                245                           250                           255

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
      260                           265                           270

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

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Ser Asn Asp Gly
      290                           295                           300

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

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
      325                           330                           335

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg
      340                           345                           350

Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
355                           360                           365

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
370                           375                           380

Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser
385                           390                           395                           400

Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr
      405                           410                           415

Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu
420                           425                           430

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

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu
450                           455                           460

Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met
465                           470                           475                           480

```

ES 2 595 091 T3

Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 485 490 495

Thr Val Leu

5 <210> 137  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> 5'CEAI LH; oligonucleótido

<400> 137  
 aggtgtacac tccgacattg agctcaccca g 31

15 <210> 138  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> 3'CEAI VL Enlazador; oligonucleótido

<400> 138  
 ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc ttgatctcg agcttgg 47

25 <210> 139  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

30 <220>  
 <223> 5'CEAI VH Enlazador; oligonucleótido

<400> 139  
 ggcgggcgcg gctccggtgg tgggtggttct caggtccaac tgcaggag 48

35 <210> 140  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

40 <220>  
 <223> 3'CEAI LH; oligonucleótido

<400> 140  
 aatccggagg agacggtgac cg 22

45 <210> 141  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

50 <220>  
 <223> enlazador polipeptídico desimmunizado

55 <400> 141

ES 2 595 091 T3

Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ala Asp  
 1 5 10

5 <210> 142  
 <211> 1524  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> SEQ ID NO: 77 VHVL x E12 VH – A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10 <400> 142  
 gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaagggtg 60  
 tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaggcaggca 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180  
 gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240  
 atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300  
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctcaggc 360  
 gaaggtacta gtactgggtc tgggtggaagt ggaggttcag gtggagcaga cgacattgta 420  
 ctgacccagt ctccagcaac tctgtctctg tctccagggg agcgtgccac cctgagctgc 480  
 agagccagtc aaagtgtaag ttacatgaac tgggtaccagc agaagccggg caaggcaccc 540  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg gcttctggag tccttgctcg cttcagtggc 600  
 agtgggtctg ggaccgacta ctctctcaca atcaacagct tggaggctga agatgctgcc 660  
 acttattact gccaacagtg gagtagtaac cogctcacgt tcggtggcgg gaccaagggtg 720  
 gagatcaaat ccggagggtg tggatccgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcttg 780  
 gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cgtcagtagc 840  
 tactggatgt actgggtccg ccaagctcca gggaaagggc tggaatgggt aggtttcatt 900  
 ctcaacaaag ctaatggtgg aacaacagaa tacgccgcgt ctgtgaaagg cagattcacc 960  
 atctcaagag atgattccaa gaacacgctg tatcttcaaa tgaacagcct gagagccgag 1020  
 gacacggccg tgtattactg tgcaagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 1080  
 ggccaagggg ccacggtcac cgtctcctca ggtgggtggg gttctggcgg cggcggctcc 1140  
 ggtggtgggt gttctgagct cgtgctgact cagccggctt cctctctgc atctctgga 1200

ES 2 595 091 T3

gcatcagcca gtctcacctg caccttgccg aggggcatca atgttggtgc ctacagtata 1260  
 tactgggtacc agcagaagcc agggagtccct ccccagtatc tcttgaggta caaatcagac 1320  
 tcagataagc agcagggctc tggagtctcc agccgcttct ctgcatcaa agatgcttcg 1380  
 gccaatgcag ggattttact catctctggg ctccagtctg aggatgaggc tgactattac 1440  
 tgtatgattt ggcacagcgg cgcttctgcg gtgttcggcg gagggaccaa gttgaccgtc 1500  
 ctacatcatc accatcatca ttag 1524

<210> 143

<211> 507

5 <212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> SEQ ID NO: 77 VHVL x E12 VH – A240 VL; anticuerpo monocatenario biespecifico

10

<400> 143

Asp 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 Arg Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 130 135 140

ES 2 595 091 T3

Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
145 150 155 160

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
180 185 190

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser  
195 200 205

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
210 215 220

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
225 230 235 240

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

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
260 265 270

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

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Leu Asn Lys Ala  
290 295 300

Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr  
305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
325 330 335

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly  
340 345 350

Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
355 360 365

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
370 375 380

ES 2 595 091 T3

Ser Glu Leu Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly  
 405 410 415

Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln  
 420 425 430

Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly  
 435 440 445

Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly  
 450 455 460

Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr  
 465 470 475 480

Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr  
 485 490 495

Lys Leu Thr Val Leu His His His His His His  
 500 505

5 <210> 144  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> HOMO SAPIENS

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-H1 E12; CDR1 de VH E12

<400> 144  
 Ser Tyr Trp Met His  
 1 5

15 <210> 145  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CDR-H2 E12; CDR2 de VH E12

25 <400> 145  
 Phe Ile Leu Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 146



ES 2 595 091 T3

<211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> E12 VH; región VH

<400> 146  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Phe Ile Leu Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

10 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 147  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 15 <213> HOMO SAPIENS

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> E12 VH – A240 VL; Fv monocatenario

20 <400> 147

ES 2 595 091 T3

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

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor epitelial en un ser humano, comprendiendo dicha composición farmacéutica un anticuerpo monocatenario biespecífico que tiene
  - (a) un primer dominio de unión que se une específicamente a CD3 humano, y
  - 5 (b) un segundo dominio de unión que se une específicamente a CEA humano, en el que dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano comprende
    - (i) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "SYWMH" (SEQ ID NO. 68), una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "FIRNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 67), una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TLRRGINVGAYSIY" (SEQ ID NO. 73), una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos "YKSDSDKQQGS" (SEQ ID NO. 72) y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos "MIWHSGASAV" (SEQ ID NO. 71);
    - 10 (ii) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "SYWMH" (SEQ ID NO. 68), una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "FILNKANGGTTEYAASVKG" (SEQ ID NO. 145), una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TLRRGINVGAYSIY" (SEQ ID NO. 73), una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos "YKSDSDKQQGS" (SEQ ID NO. 72) y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos "MIWHSGASAV" (SEQ ID NO. 71); o
    - 15 (iii) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TYAMH" (SEQ ID NO. 70), una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos "LISNDGSNKYYADSVKG" (SEQ ID NO. 69), una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos "TLRRGINVGAYSIY" (SEQ ID NO. 73), una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos "YKSDSDKQQGS" (SEQ ID NO. 72) y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos "MIWHSGASAV" (SEQ ID NO. 71); y
    - 20 en el que dicho segundo dominio de unión comprende al menos la secuencia de aminoácidos "DX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>FYFDY" (SEQ ID NO. 65), en la que "X<sub>2</sub>", "X<sub>3</sub>" o "X<sub>4</sub>" representa cualquier residuo aminoacídico, y el residuo aminoacídico "D" corresponde a la posición de Kabat 95 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7 y los residuos aminoacídicos "FYFDY" corresponden a las posiciones de Kabat 100, 100a, 100b, 101, y 102, respectivamente, de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que
  - "X<sub>1</sub>" representa "R" (arginina), "F" (fenilalanina), "M" (metionina), "E" (ácido glutámico), o "T" (treonina);
  - "X<sub>2</sub>" representa "G" (glicina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), o "S" (serina);
  - 30 - "X<sub>3</sub>" representa "L" (leucina), "F" (fenilalanina), "M" (metionina), "E" (ácido glutámico), o "T" (treonina); y
  - "X<sub>4</sub>" representa "R" (arginina), "Y" (tirosina), "A" (alanina), "D" (ácido aspártico), o "S" (serina).
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho segundo dominio de unión específico para CEA humano comprende al menos la secuencia de aminoácidos "DRGLRFYFDY" (SEQ ID NO. 66) correspondiente a las posiciones de Kabat 95 – 102 de la CDR-H3 del anticuerpo monoclonal murino A5B7.
- 35 4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho primer dominio de unión específico para CD3 está situado de forma C-terminal.
5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dichos dominios de unión están dispuestos en el orden VH<sub>CEA</sub>-VL<sub>CEA</sub>-VH<sub>CD3</sub>-VL<sub>CD3</sub> o VL<sub>CEA</sub>-VH<sub>CEA</sub>-VH<sub>CD3</sub>-VL<sub>CD3</sub>.
- 40 6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia de aminoácidos de la región VH del segundo dominio de unión específico para CEA humano es SEQ ID NO. 60 o 146.
7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia de aminoácidos de la región VH del segundo dominio de unión específico para CEA humano es SEQ ID NO. 58 o SEQ ID NO.62.
- 45 8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la secuencia de aminoácidos de la región VL del segundo dominio de unión específico para CEA humano es SEQ ID NO. 64.
9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que las regiones V del segundo dominio de unión específico para CEA se seleccionan del grupo que consiste en:
  - (a) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 60 y la región VL

- consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64;
- (b) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 146 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64
- 5 (c) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 58 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64;
- (d) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 62 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64; y
- (e) la región VH consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 56 y la región VL consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO. 64.
- 10 10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho anticuerpo monocatenario biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de las SEQ ID NO. 6, 8, 16, 18, 24, 32, 34, 40, 42, 126, 130, 134 o 143;
- 15 (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en las SEQ ID NO. 5, 7, 15, 17, 23, 25, 31, 33, 39, 41, 125, 129, 133 o 142; y
- (c) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético a una secuencia de nucleótidos de (b).
11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicho anticuerpo monocatenario biespecífico comprende una marca His.
- 20 12. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicho tumor epitelial es un adenocarcinoma gastrointestinal, un adenocarcinoma de mama o un adenocarcinoma pulmonar.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que dicho adenocarcinoma gastrointestinal es un adenocarcinoma colorrectal, pancreático, esofágico o gástrico.
- 25 14. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicha composición farmacéutica es para el tratamiento de tumores progresivos, tumores en estadio tardío, pacientes con tumores con carga/masa tumoral alta, tumores metastásicos, o pacientes con tumores con una concentración sérica de CEA mayor de 100 ng/ml.
15. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que al menos uno de dichos dominios de unión primero o segundo es quimérico, humanizado, injertado con CDR, y/o desimmunizado o humano.
- 30 16. Una composición farmacéutica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
17. Una composición farmacéutica que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 16.
- 35 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que dicho vector comprende además una secuencia reguladora que está unida de forma funcional a dicha secuencia de ácido nucleico definida en la reivindicación 16.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 17 o 18, en la que dicho vector es un vector de expresión.
- 40 20. Una composición farmacéutica que comprende un huésped transformado o transfectado con un ácido nucleico definido en la reivindicación 16 o un vector definido en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.
21. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que comprende además un compuesto proteínico que puede proporcionar una señal de activación para células efectoras inmunitarias.
- 45 22. Un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, comprendiendo dicho procedimiento cultivar un huésped definido en la reivindicación 20 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y recuperar el anticuerpo monocatenario biespecífico producido del cultivo.
23. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que comprende además

formulaciones adecuadas de vehículos, estabilizantes y/o excipientes.

- 5 24. Uso de un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 16, un vector como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, o un huésped como se define en la reivindicación 20, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento o mejoría de un tumor epitelial en un ser humano.
25. El uso de la reivindicación 24, en el que dicho tumor epitelial es un adenocarcinoma gastrointestinal, un adenocarcinoma de mama o un adenocarcinoma pulmonar.
26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicho adenocarcinoma gastrointestinal es un adenocarcinoma colorrectal, pancreático, esofágico o gástrico.
- 10 27. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que la composición farmacéutica es para el tratamiento de tumores progresivos, tumores en estadio tardío, pacientes con tumores con carga/masa tumoral alta, tumores metastásicos, o pacientes con tumores con una concentración sérica de CEA mayor de 100 ng/ml.
- 15 28. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en el que dicha composición farmacéutica es adecuada para administrarse en combinación con un fármaco adicional.
29. El uso de la reivindicación 28, en el que dicho fármaco adicional es un compuesto no proteínico o un compuesto proteínico.
30. El uso de la reivindicación 29, en el que dicho compuesto proteínico puede proporcionar una señal de activación para células efectoras inmunitarias.
- 20 31. El uso de la reivindicación 29 o 30, en el que dicho compuesto proteínico o compuesto no proteínico se administra simultáneamente o no simultáneamente con un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 16, un vector como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 to 19, o un huésped como se define en la reivindicación 20.
- 25 32. Un kit que comprende un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 16, un vector como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 o un huésped como se define en la reivindicación 20.
33. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 o el uso de la reivindicación 27, en el que dicha concentración sérica de CEA se determina por ELISA.

30

FIGURA 1

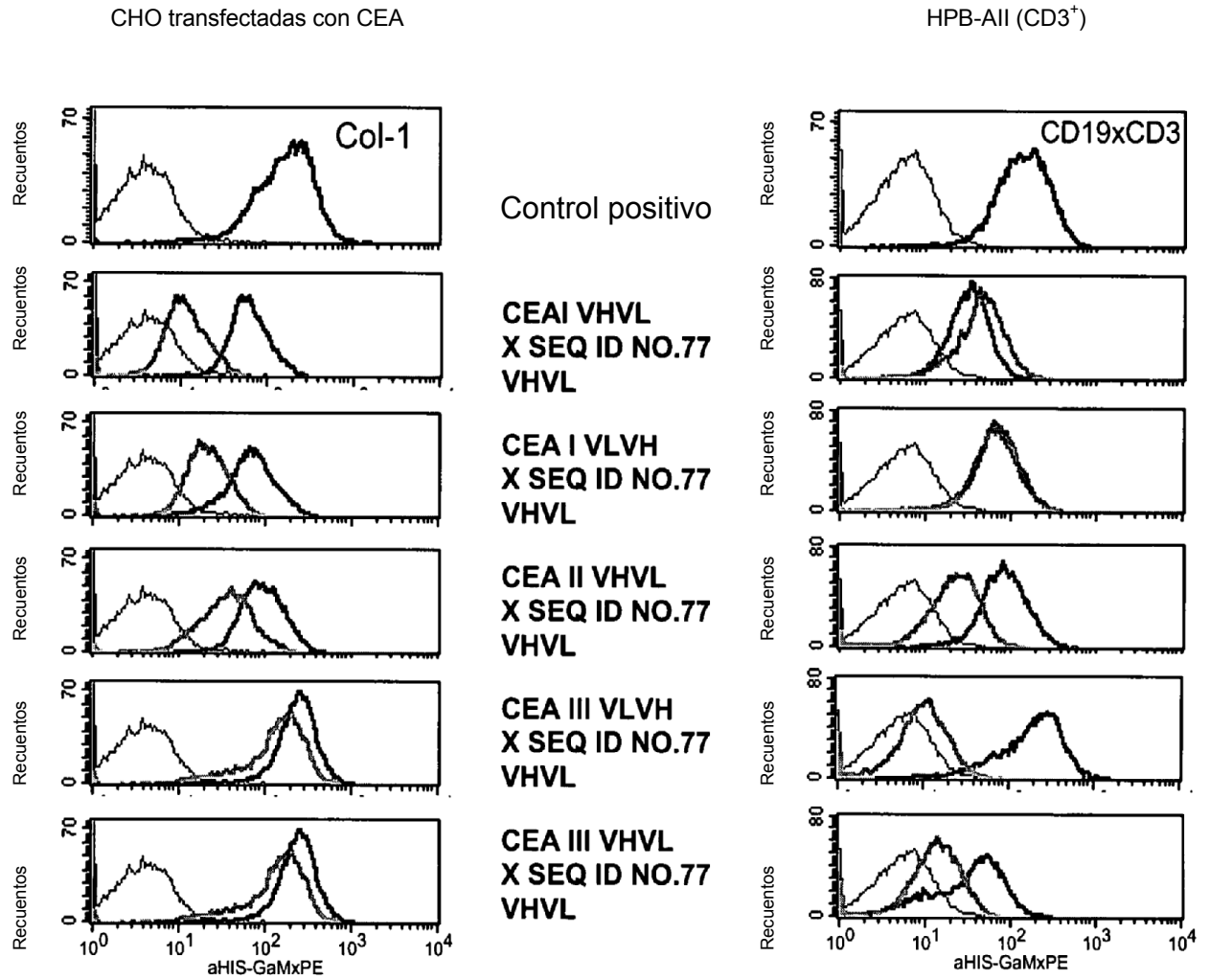


FIGURA 2

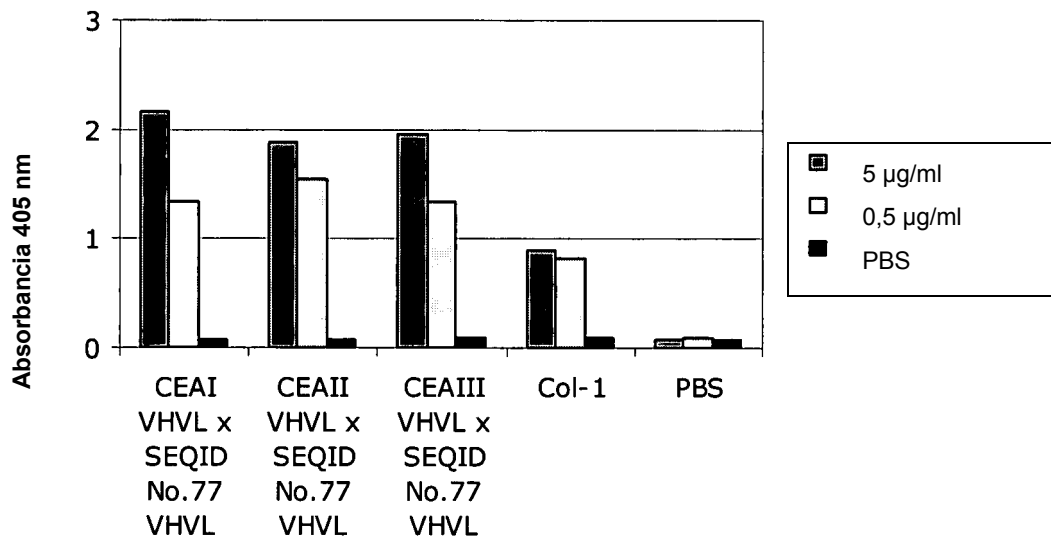
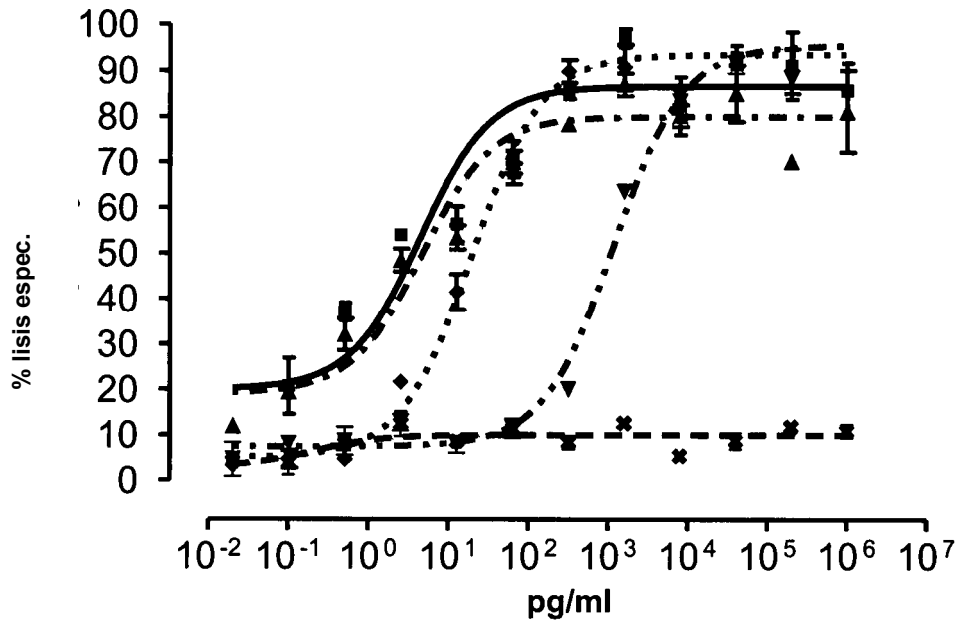


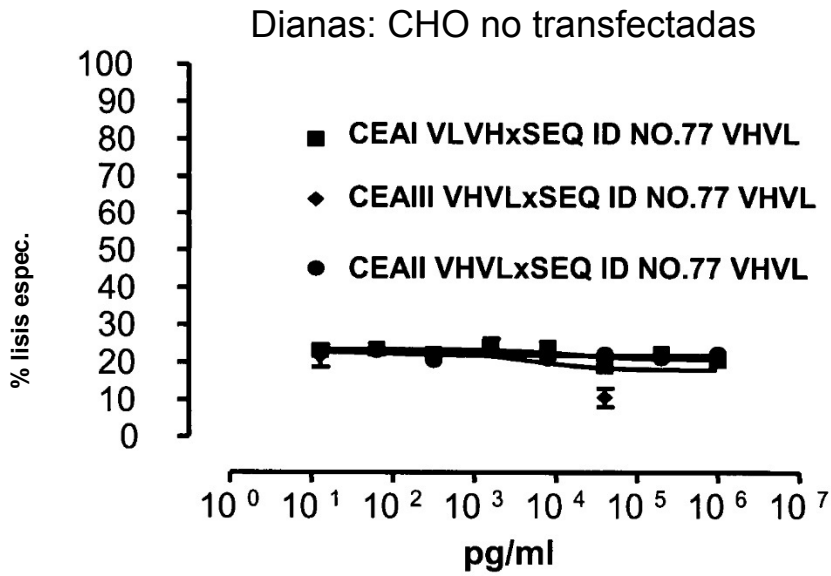
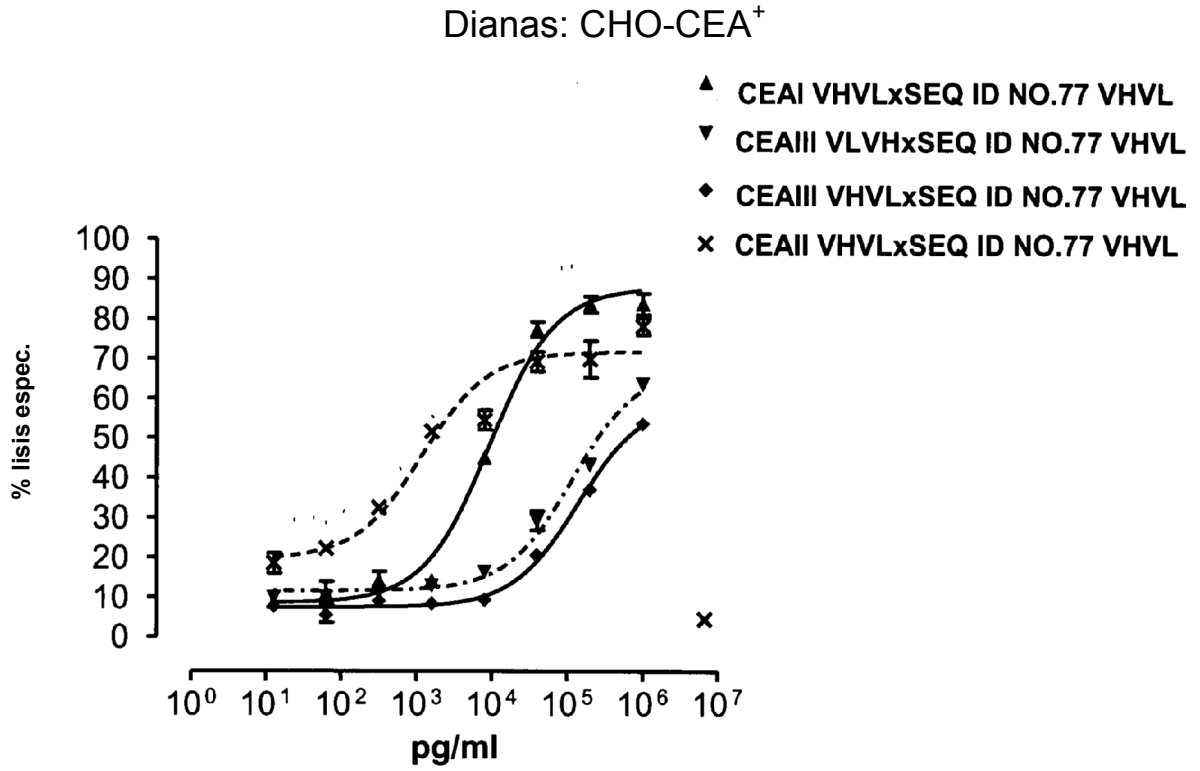
FIGURA 3



	CE 50 [ng/ml]
■ SEQ ID NO. 77 VHVL x CEAI VHVL	0,0045
▲ SEQ ID NO. 77 VHVL x CEAI VL VH	0,0035
◆ CEAI VL VH x SEQ ID NO. 77 VHVL	0,0196
▼ CEAI VHVL x SEQ ID NO. 77 VHVL	1,2
* Control negativo	n.a.



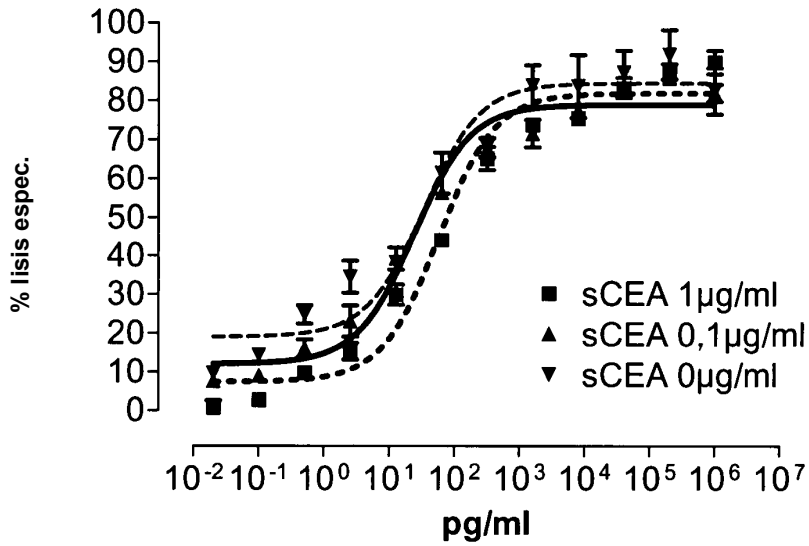
FIGURA 4



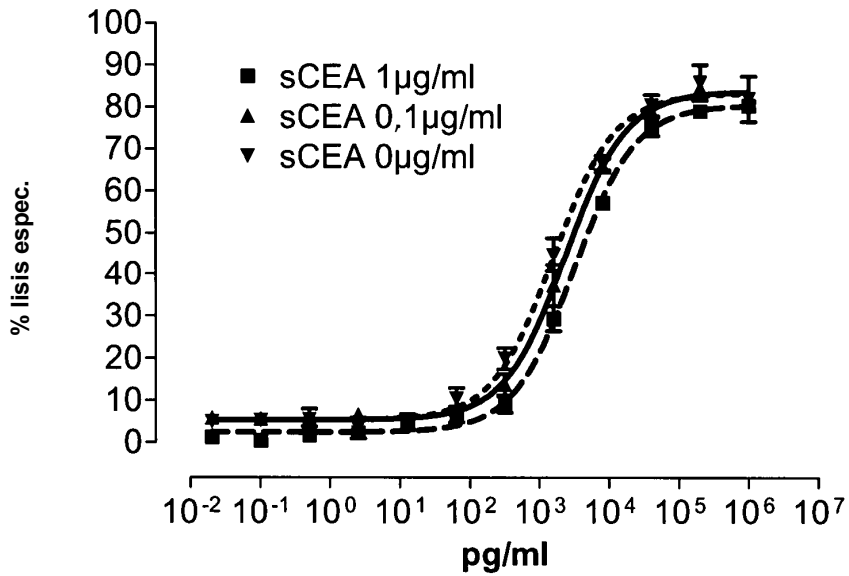
CE50 [ng/ml]	I-HL	II-HL	III-LH	III-HL
CHO-CEA <sup>+</sup>	9,3	1,2	119	139

FIGURA 5

CEA I VLVH x SEQ ID NO.77 VHVL



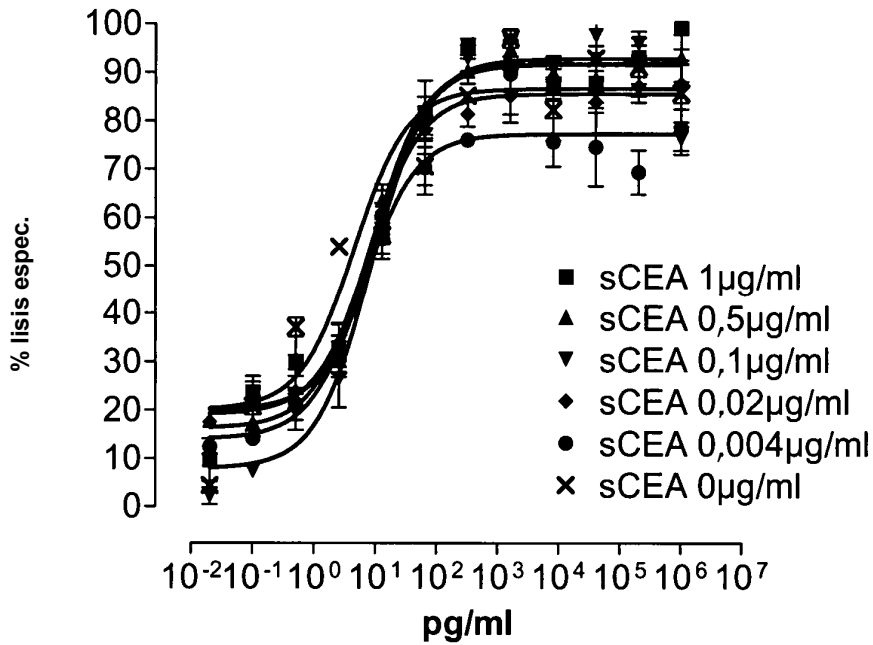
CEA I VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL



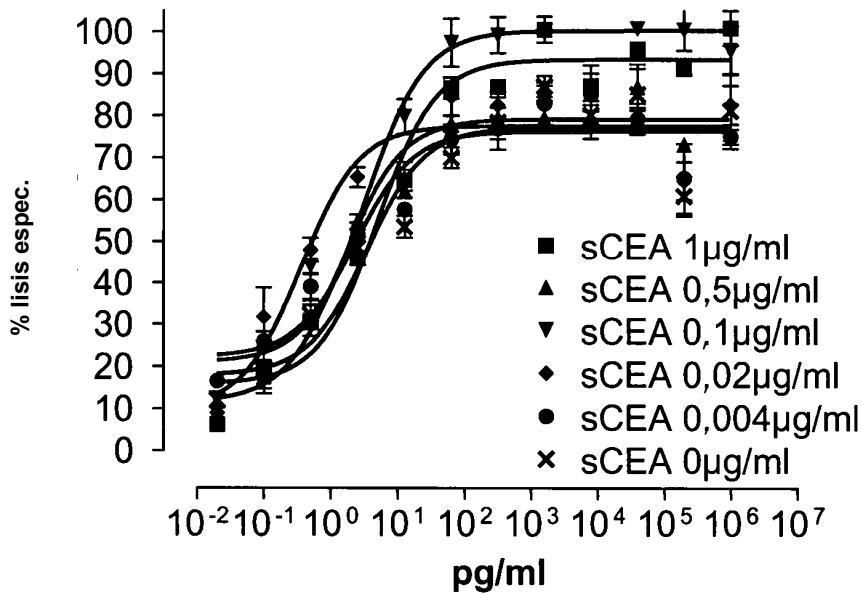
CEA sol. [µg/ml]	0	0,1	1
CEA I VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	1,6	2,4	3,2
CEA I VLVH x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	0,034	0,024	0,058

FIGURA 6

SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VHVL



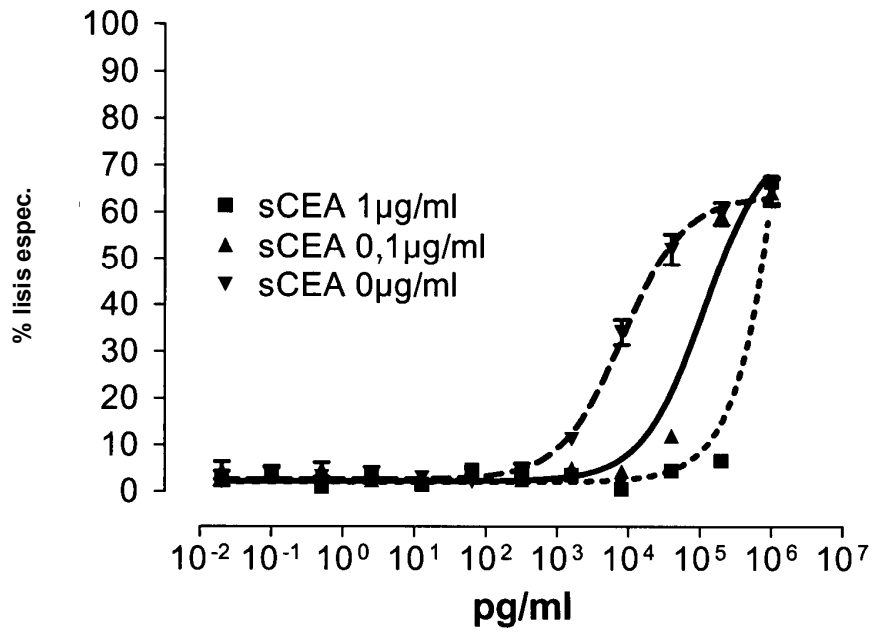
SEQ ID NO.77 VHVLxCEAI VLVH



CEA sol. [µg/ml]	0	0,004	0,02	0,1	0,5	1
SEQ ID NO.77 VHVLx CEA-I LH CE <sub>50</sub> [pg/ml]	3,5	2,3	0,4	3,5	1,6	5,1
SEQ ID NO.77 VHVLx CEA-I HL CE <sub>50</sub> [pg/ml]	4,5	6,2	7,4	8,4	9,1	11,6

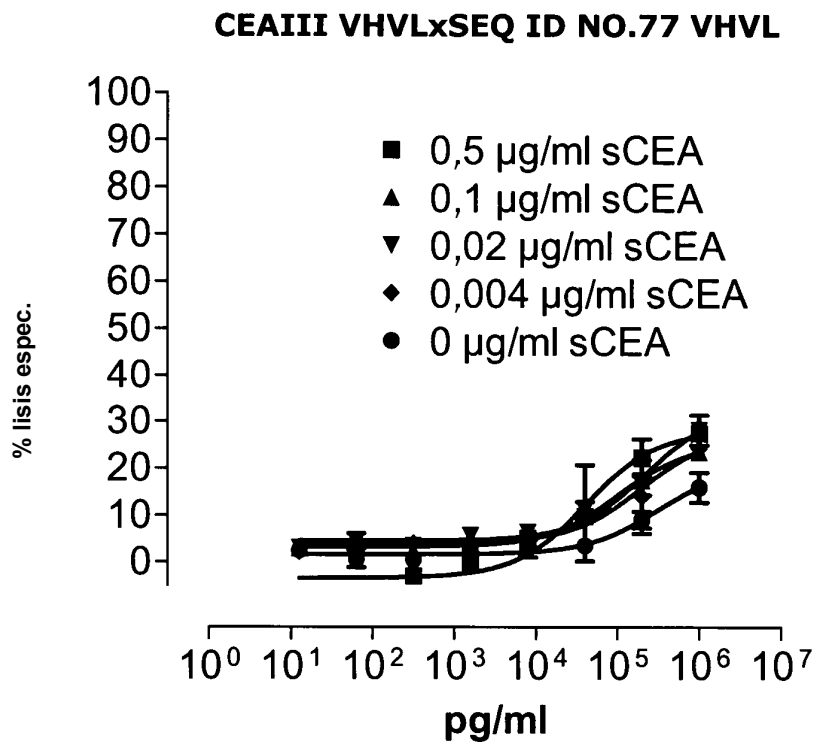
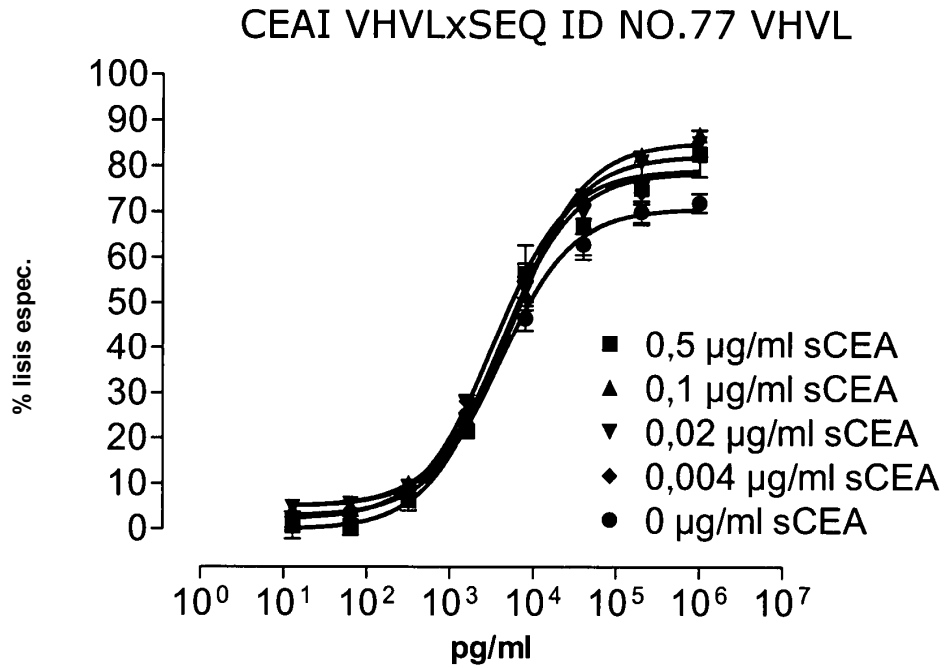
FIGURA 7

CEAII VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL



CEA sol. [µg/ml]	0	0,1	1
CEA II VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL	8,2	114,6	3980
CE50 [ng/ml]			

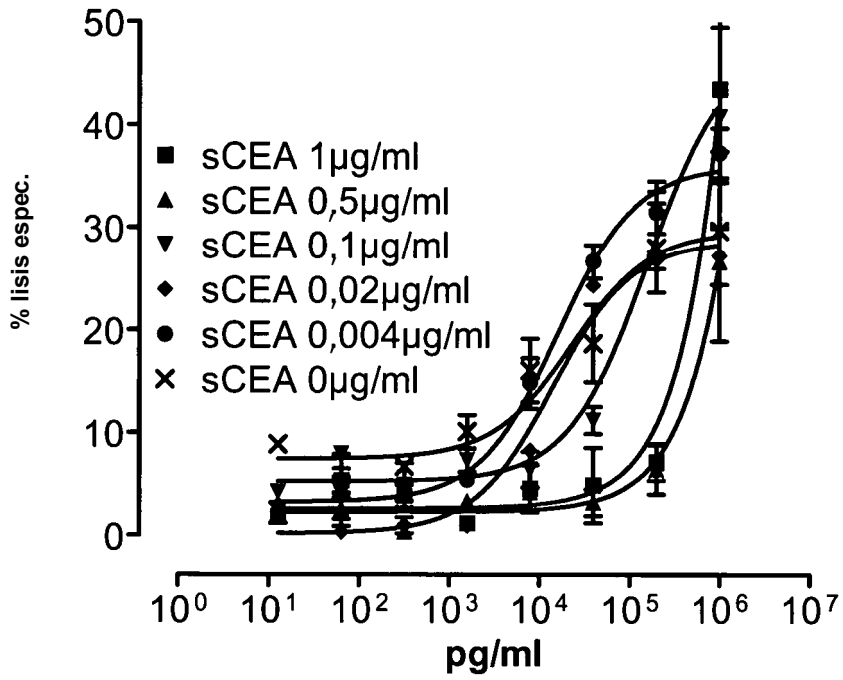
FIGURA 8



CEA sol. [µg/ml]	0	0,004	0,02	0,1	0,5
CEA I VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	3,9	3,3	4,7	5,5	3,8
CEA III VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

FIGURA 9

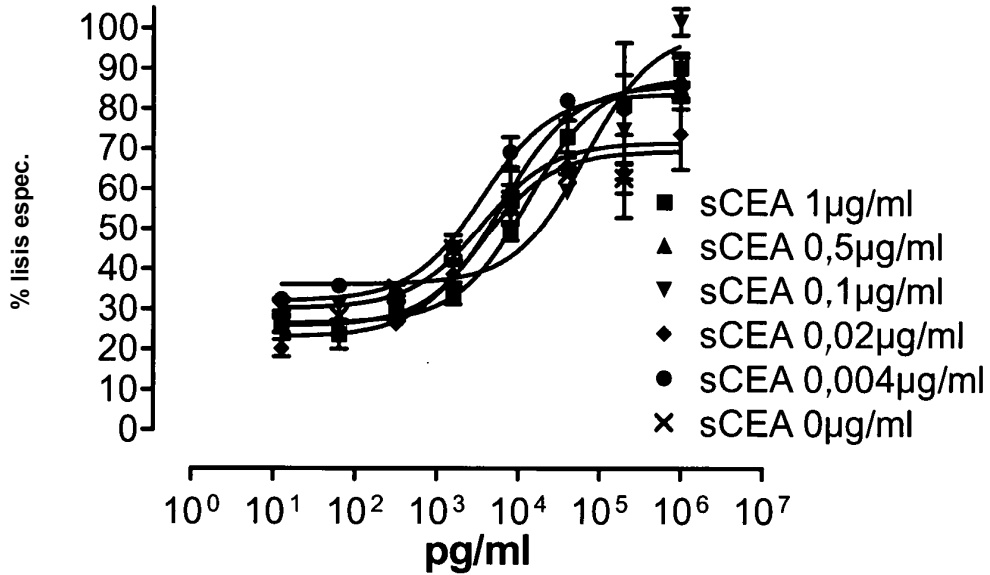
CEAII VHVLxSEQ ID NO.77 VHVL



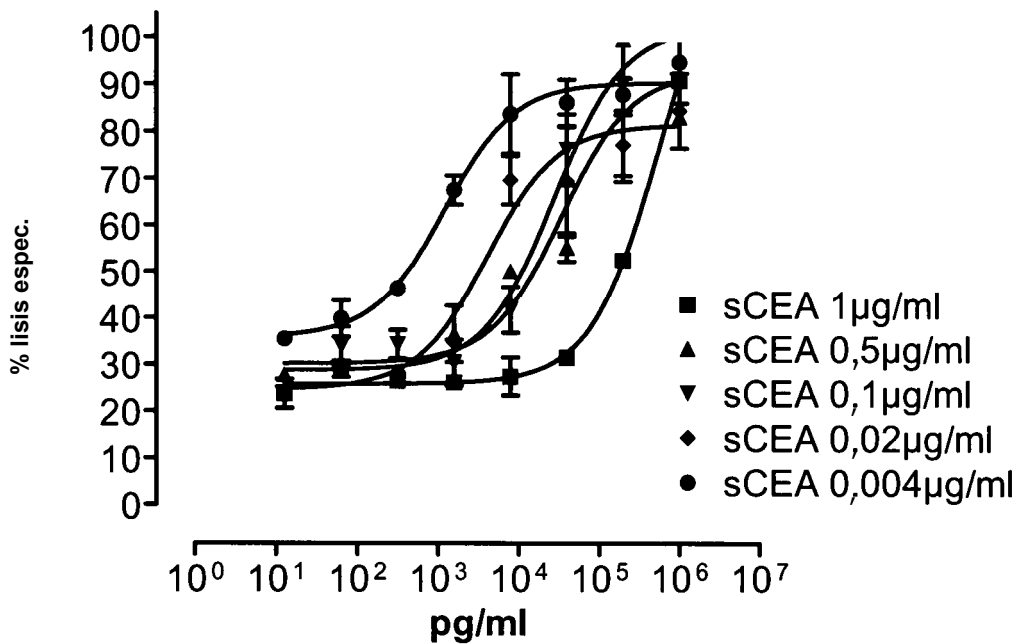
CEA sol. [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	0,02	0,1	0,5	1,0
CEA II VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	23	14	159	1415	5057

FIGURA 10

CEAI VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL



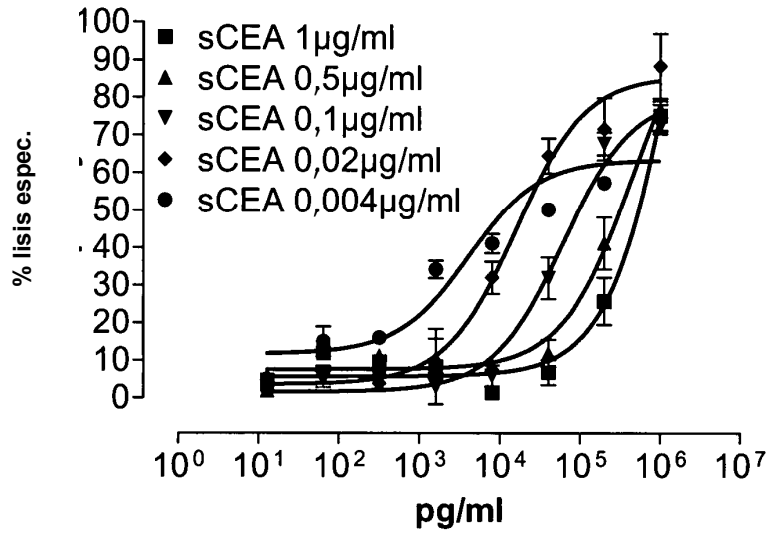
CEAII VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL



CEA sol. [µg/ml]	0	0,004	0,1	0,5	1,0
CEA I VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	3,6	3,6	65,4	6,3	5,1
CEA II VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	--	1,2	36,5	77,9	578

FIGURA 11

**CEAII VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL**



CEA sol. [µg/ml]	0,004	0,02	0,1	0,5	1,0
CEA II VHVL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	4,0	16	60	432	1983



FIGURA 12

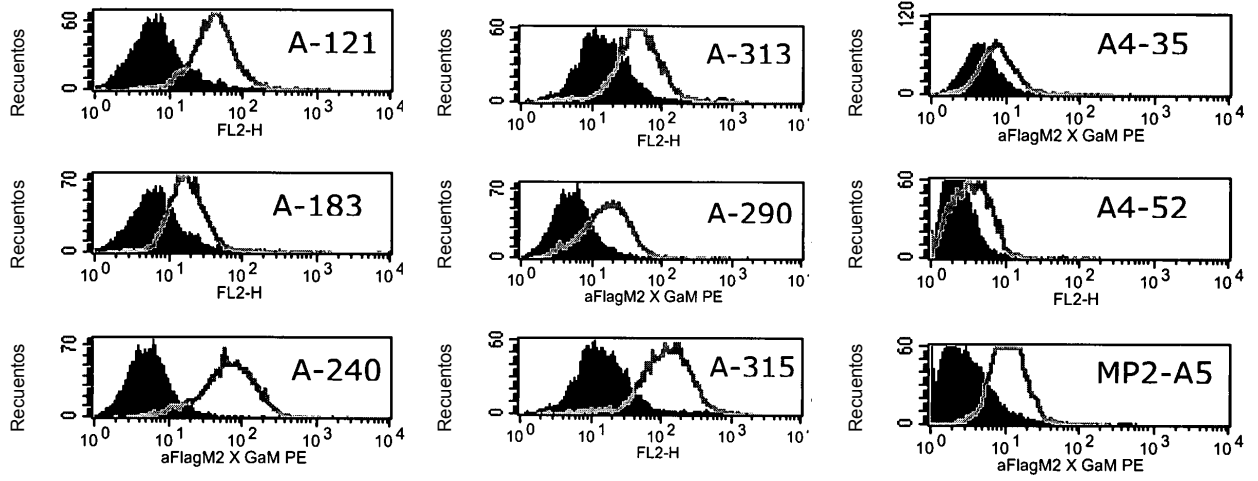


FIGURA 13

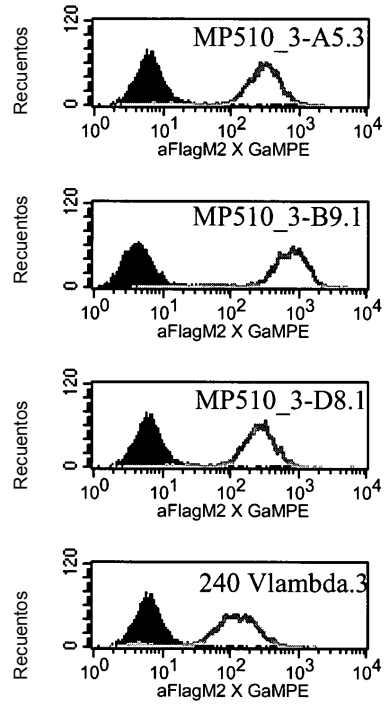


FIGURA 14

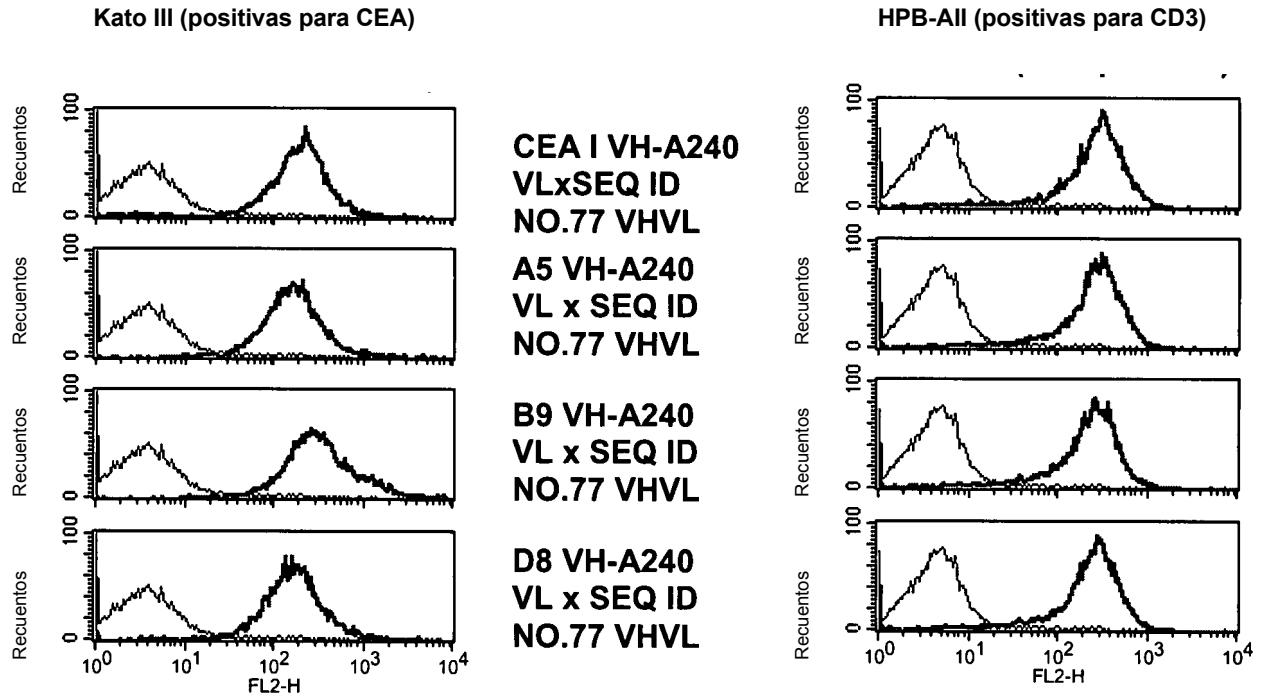
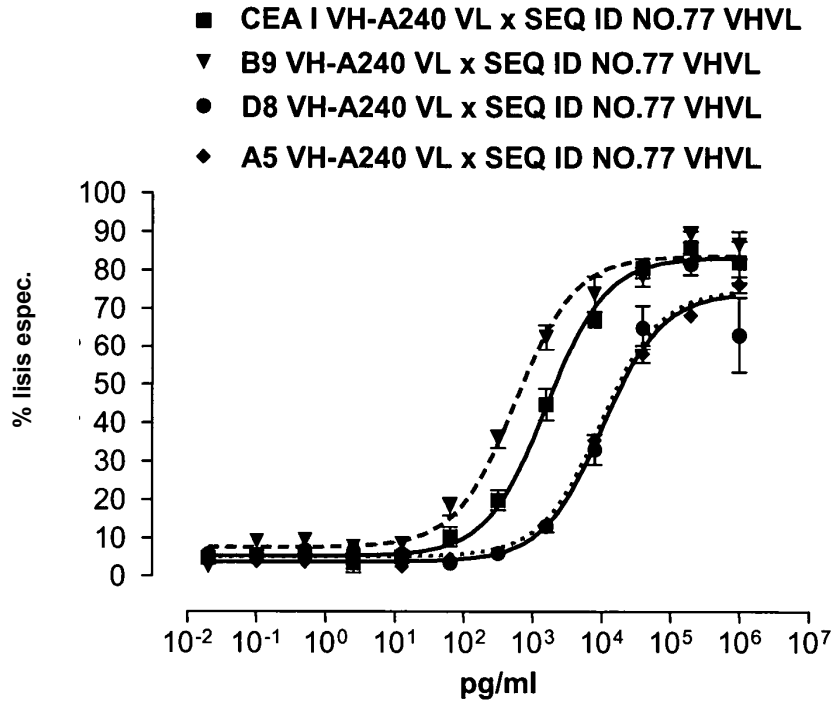
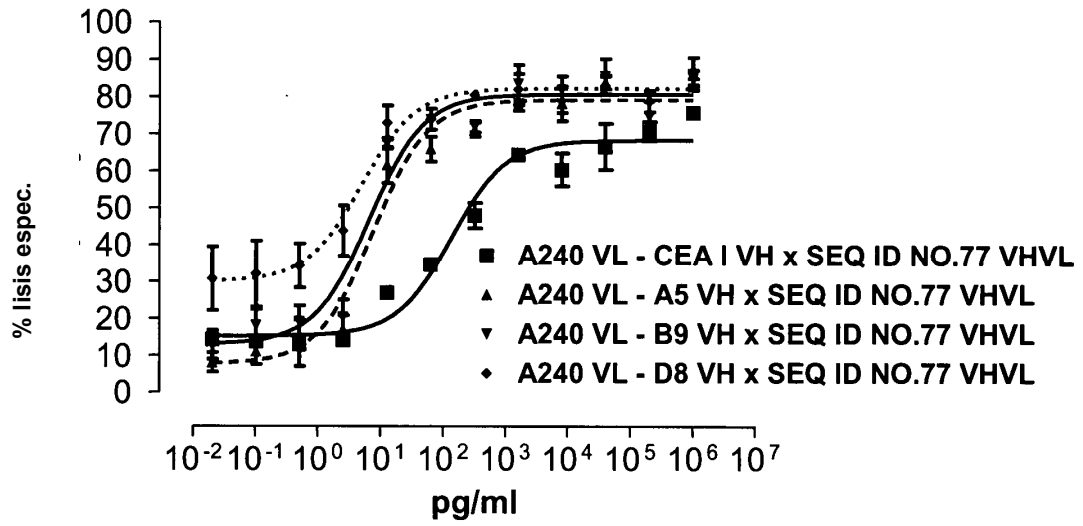


FIGURA 15



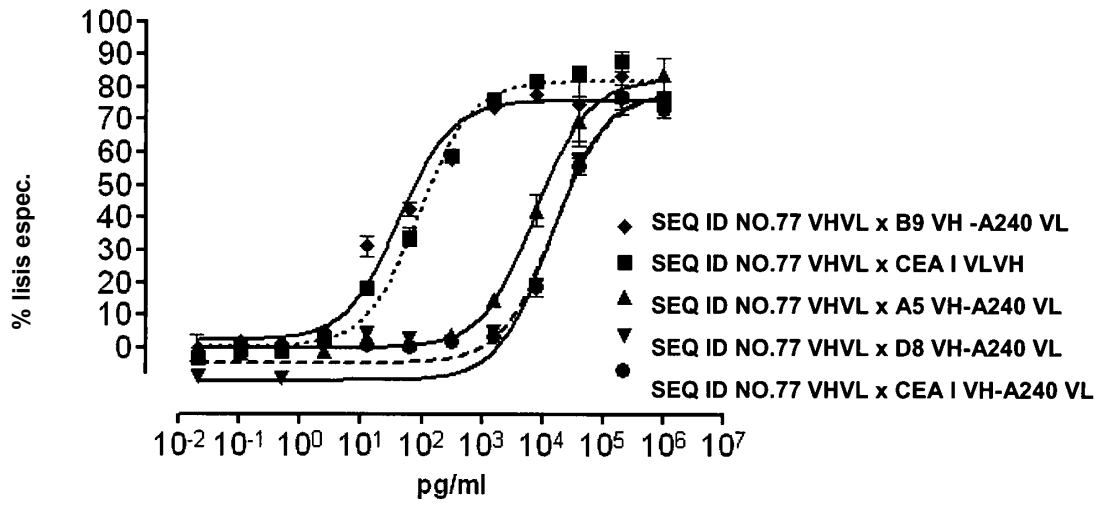
	CE50 [ng/ml]
B9 VH – A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL	0,58
CEA I VH – A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL	1,61
D8 VH – A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL	10,1
A5 VH – A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL	10,5

FIGURA 16



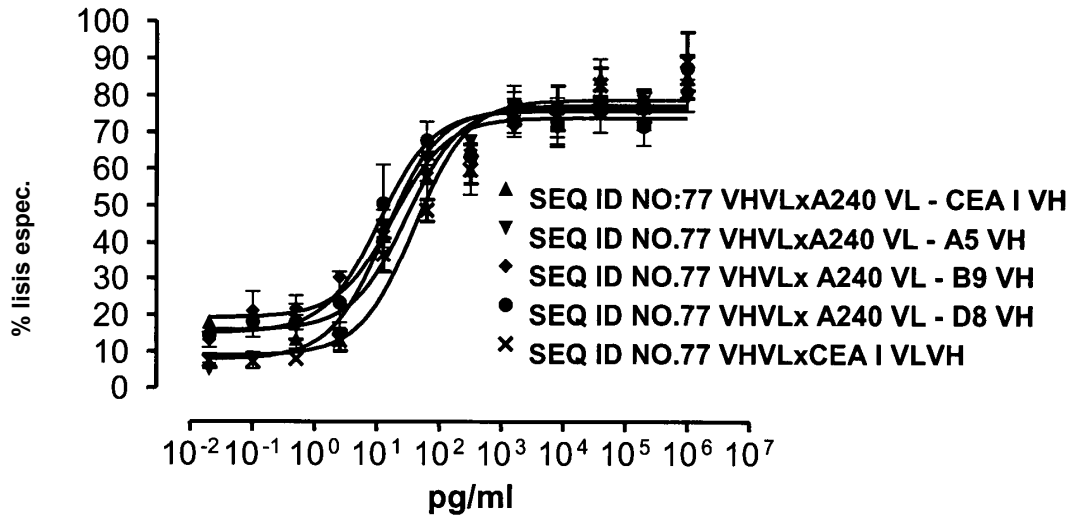
	CE50 [ng/ml]
A240 VL-D8 VH x SEQ ID NO.77 VHVL	5,1
A240 VL-A5 VH x SEQ ID NO.77 VHVL	7,7
A240 VL-B9 VH x SEQ ID NO.77 VHVL	6,7
A240 VL-CEAI VH x SEQ ID NO.77 VHVL	135,9

FIGURA 17



	CE50 [ng/ml]
SEQ ID NO.77 VHVL x B9 VH-A240 VL	0,042
SEQ ID NO.77 VHVL x CEA I VLVH	0,092
SEQ ID NO.77 VHVL x A5 VH-A240 VL	7,5
SEQ ID NO.77 VHVL x D8 VH-A240 VL	13,8
SEQ ID NO.77 VHVL x CEA I VH-A240 VL	15,6

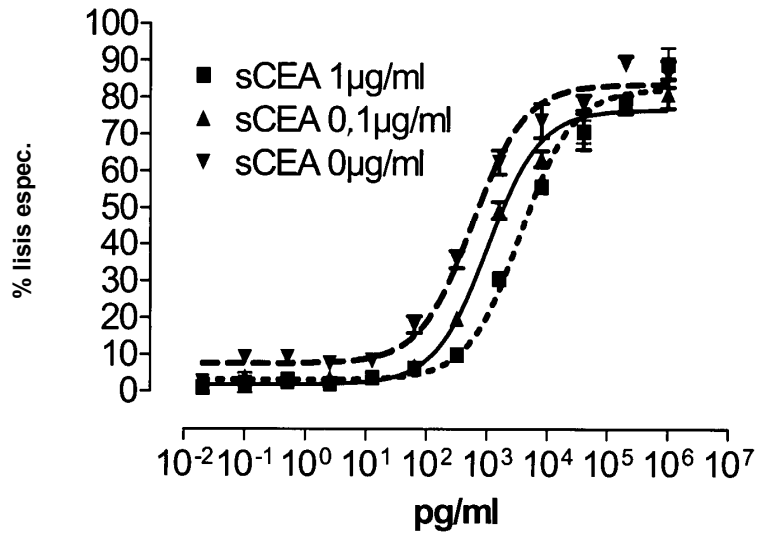
FIGURA 18



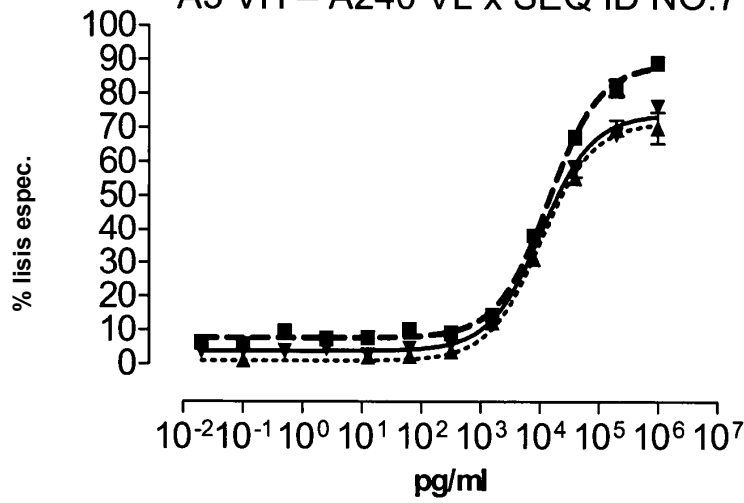
	CE50 [ng/ml]
SEQ ID NO.77 VHVL x A240 VL – D8 VH	11,0
SEQ ID NO.77 VHVL x A240 VL – A5 VH	13,5
SEQ ID NO.77 VHVL x A240 VL – B9 VH	18,4
SEQ ID NO.77 VHVL x A240 VL – CEA I VH	29,8
SEQ ID NO.77 VHVL x CEA I VLVH	40,0

FIGURA 19

B9 VH – A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL



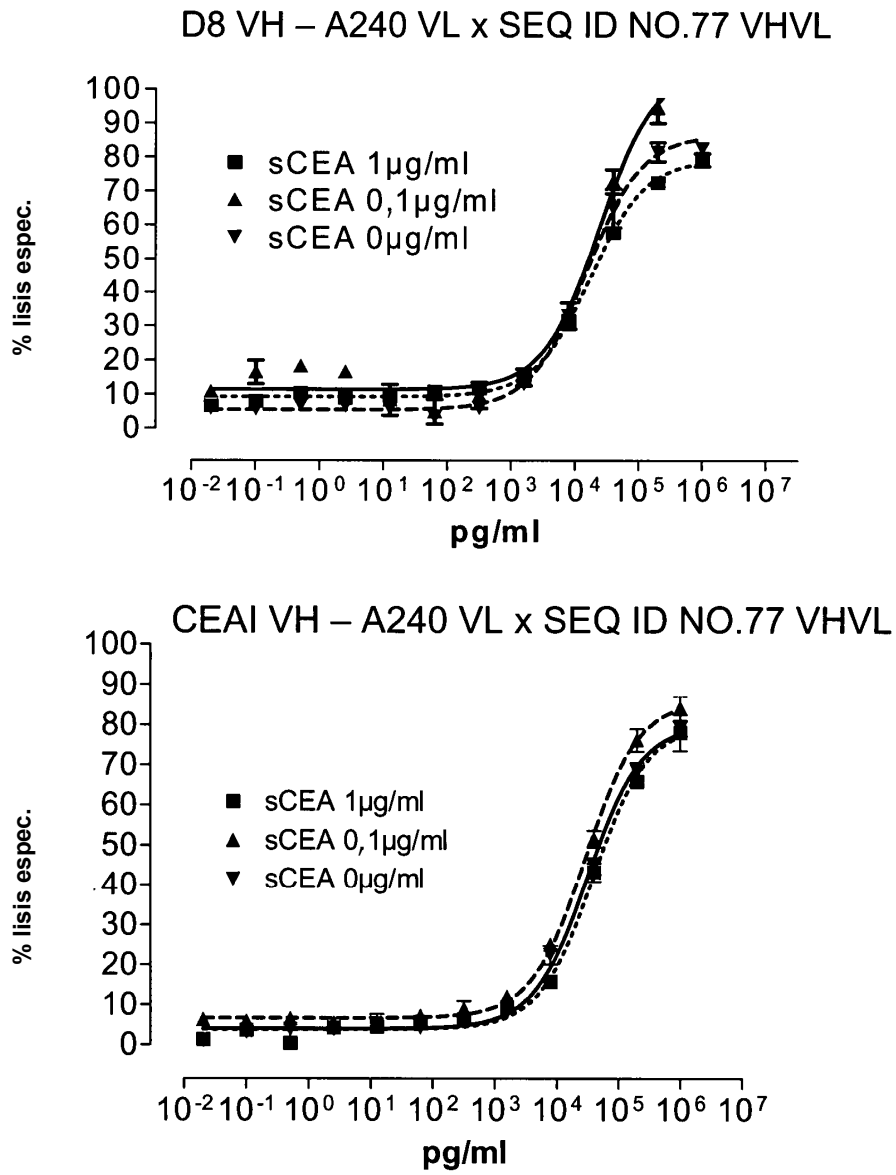
A5 VH – A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL



CEA sol. [µg/ml]	0	0,1	1
B9 VH - A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	0,58	1,04	3,65
A5 VH - A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	10,5	10,4	14,0

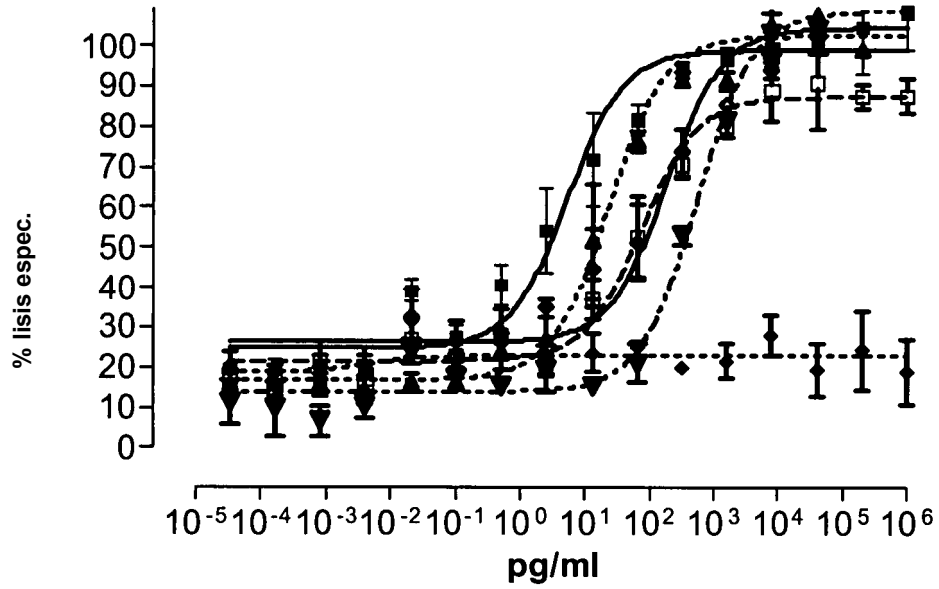


FIGURA 20



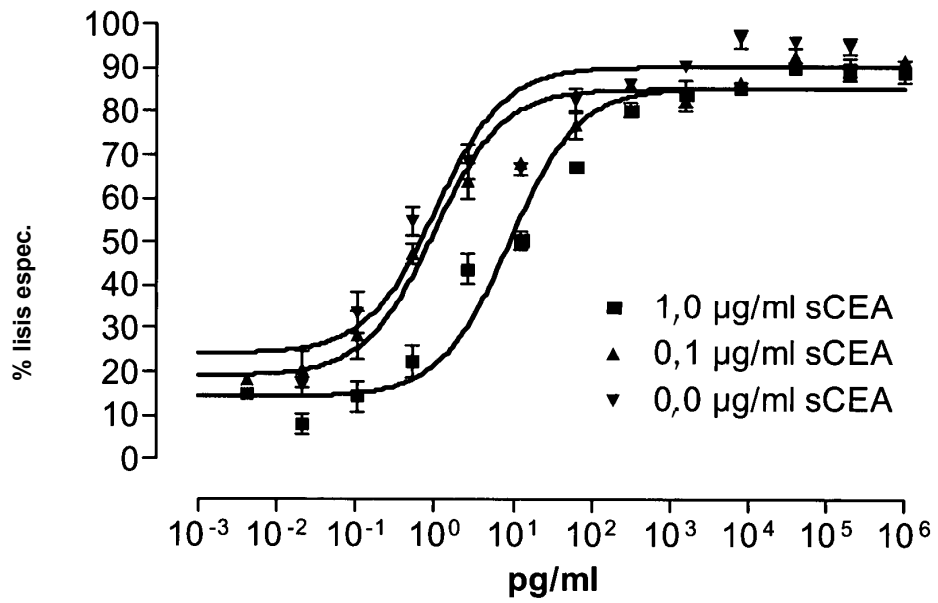
CEA sol. [µg/ml]	0	0,1	1
D8 VH - A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	15,1	24,1	17,5
CEAI VH - A240 VL x SEQ ID NO.77 VHVL CE50 [ng/ml]	31,6	28,8	39,0

FIGURA 21



	CE50 [ng/ml]
—■ A240 (VL) – B9 (VH) x SEQ ID NO.77 VHVL	5,3
....▲ SEQ ID NO.77 VHVL x A240 (VL) – B9 (VH)	22,9
- - -□ SEQ ID NO.77 VHVL x B9 (VH) – A240 (VL)	74,2
—◇ B9 (VH) – A240 (VL) x SEQ ID NO.77 VHVL	178,2
- - -▼ SEQ ID NO.77 VHVL x CEA I	538,6
.....◆ Control negativo	n.a.

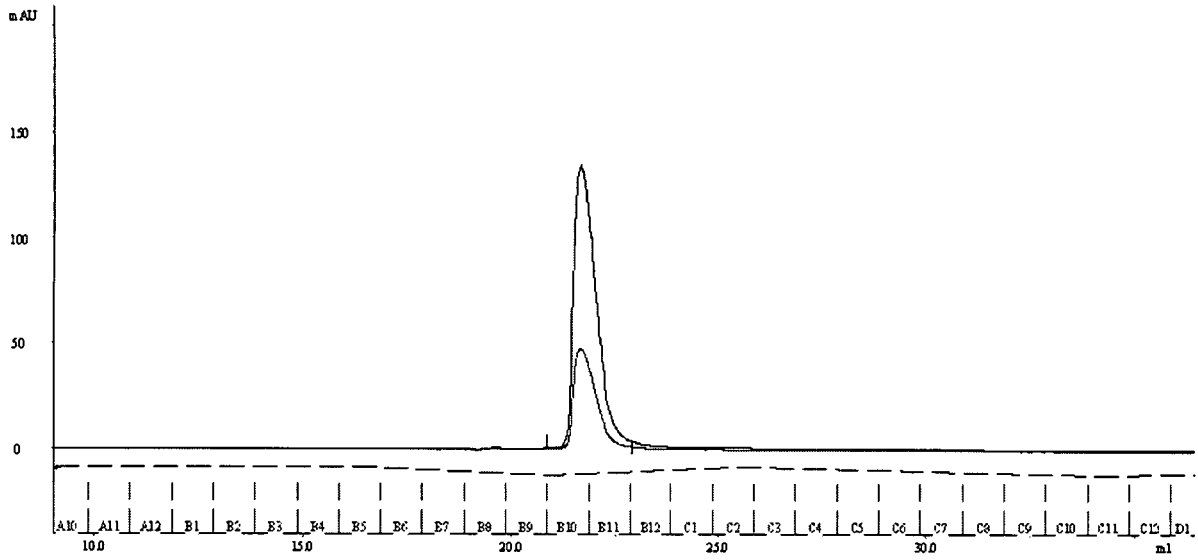
FIGURA 22



CEA sol. [µg/ml]	0	0,1	1
A240 VL - B9 VH x SEQ ID NO.77 VHVL	1,0	1,0	8,9
CE50 [ng/ml]			

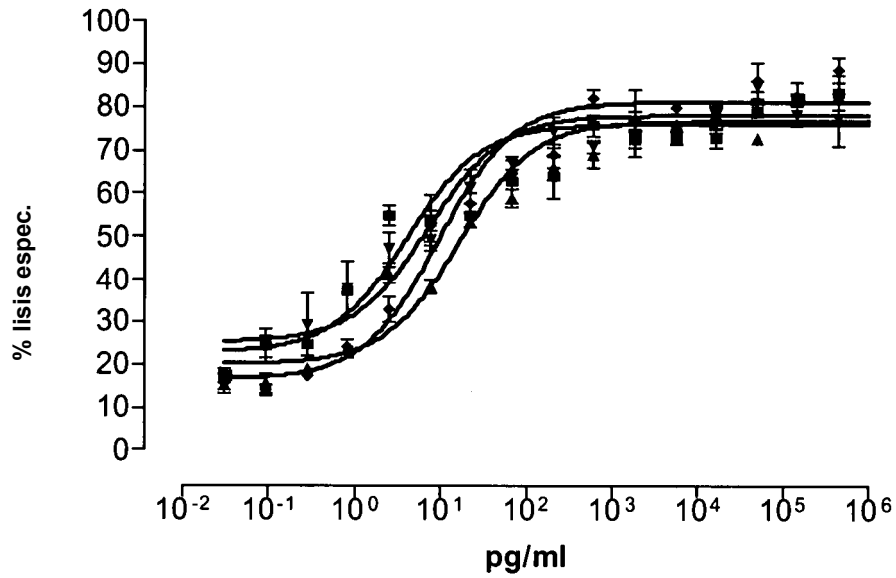
FIGURA 23

Cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución  
de A240 VL - B9 VH x SEQ ID NO.77 VHVL



**FIGURA 24**

Pruebas de estabilidad de proteína de A240 VL - B9 VH x SEQ ID NO.77 VHVL en plasma humano



	CE50 [ng/ml]
■ Incubación durante 24 h en plasma a 37 °C	<b>4,0</b>
▲ Incubación durante 24 h en plasma a 4 °C	<b>16,5</b>
● Dilución de proteína de inmediato antes del ensayo en RPMI	<b>7,1</b>
◆ Dilución de proteína de inmediato antes del ensayo en plasma	<b>9,4</b>

FIGURA 25

Cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución  
de SEQ ID NO.77 VHVL x E12 VH-A240 VL

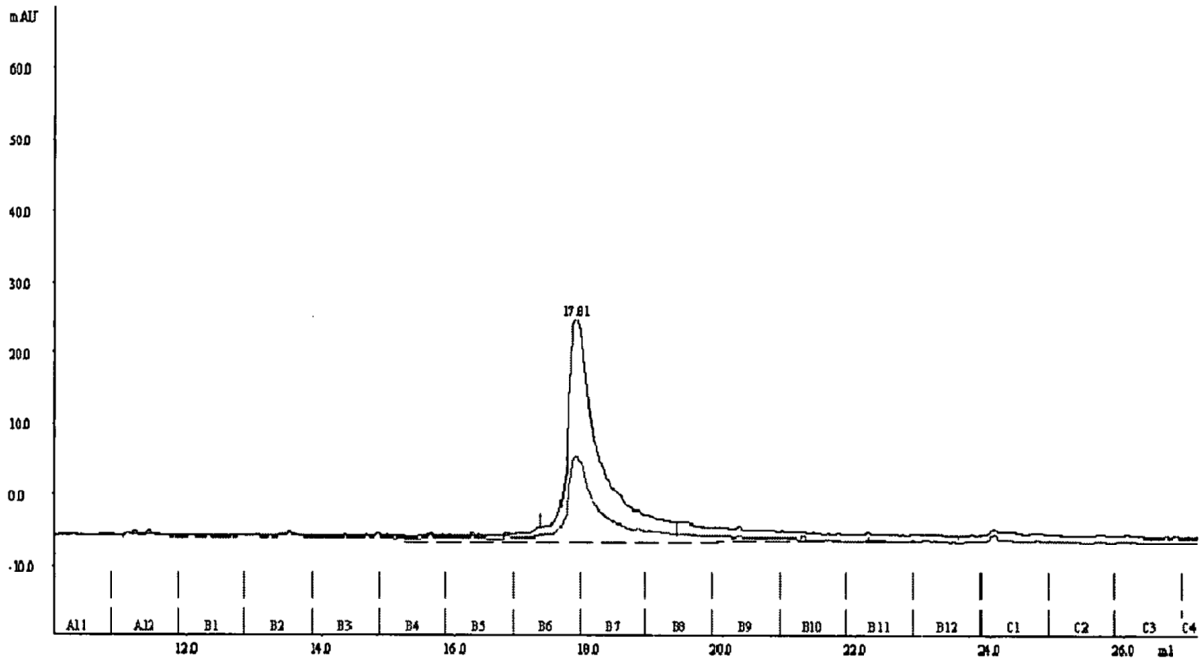
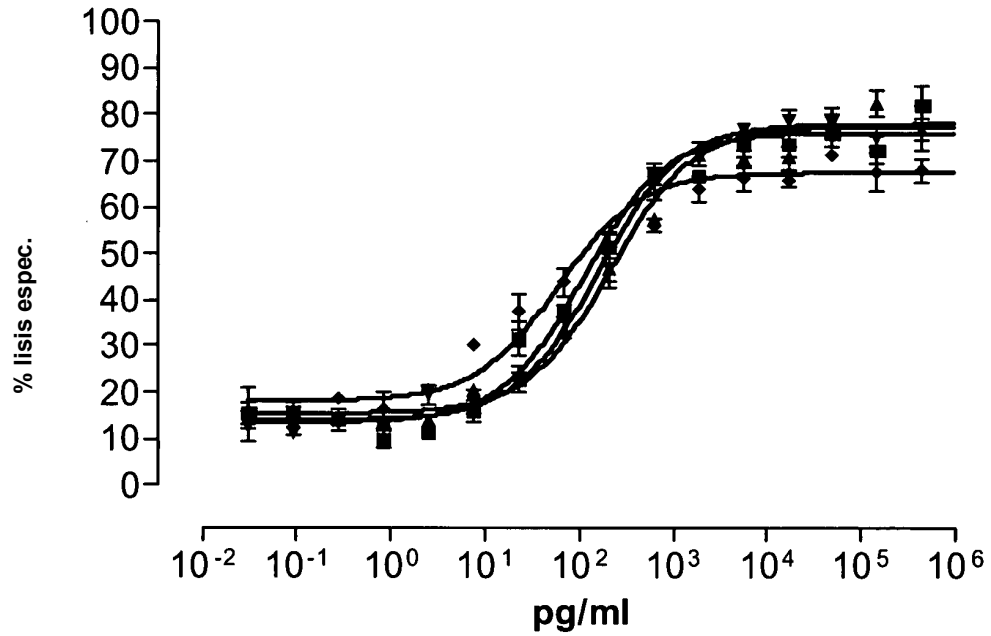


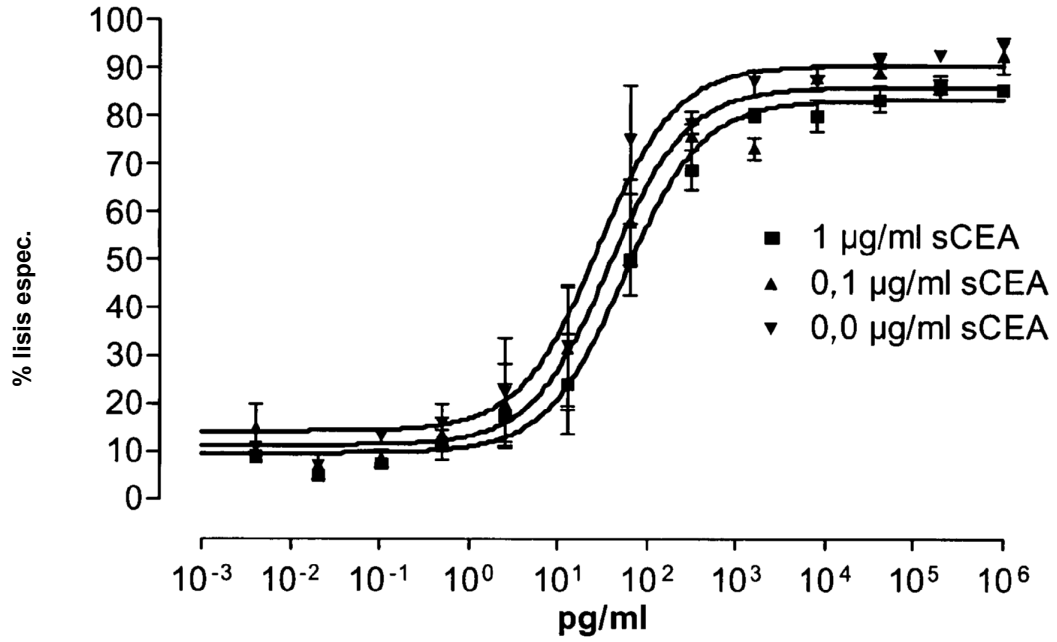
FIGURA 26

Pruebas de estabilidad de proteína de SEQ ID NO.77 VHVL x E12 VH-A240 VL en plasma humano



	CE50 [ng/ml]
■ Incubación durante 24 h en plasma a 37 °C	111,4
▲ Incubación durante 24 h en plasma a 4 °C	214,0
● Dilución de proteína de inmediato antes del ensayo en RPMI	159,5
◆ Dilución de proteína de inmediato antes del ensayo en plasma	59,1

FIGURA 27



CEA sol. [µg/ml]	0	0,1	1
SEQ ID NO.77 VHVL x E12 VH - A240 VL	28,2	37,6	55,3
CE50 [ng/ml]			