

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 316**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2006 PCT/EP2006/009782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2007 WO07042261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2006 E 06806155 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 1940881**

54 Título: **Composiciones que comprenden anticuerpos específicos para diferentes especies y usos de los mismos**

30 Prioridad:

11.10.2005 US 724781 P

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

12.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KISCHEL, ROMAN;
RAUM, TOBIAS;
SCHLERETH, BERND;
RAU, DORIS;
CIERPKA, RONNY y
KUFER, PETER**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 616 316 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 que comprenden anticuerpos específicos para diferentes especies y usos de los mismos

5 La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies para su uso en métodos para evaluar la seguridad y/o actividad *in vivo* y/o el perfil farmacocinético de los mismos en especies no humanas y en seres humanos. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies y a dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies para su uso
10 en métodos para el tratamiento de enfermedades.

Para comercializarse, cualquier nueva medicación candidata debe pasar por rigurosos ensayos. En general, dichos ensayos pueden subdividirse en fases preclínicas y clínicas: mientras que las últimas, subdivididas adicionalmente en las fases clínicas generalmente conocidas I, II y III, se realiza en pacientes humanos, la anterior se realiza en
15 animales. En general, el objetivo de los ensayos preclínicos es demostrar que el candidato farmacológico actúa y es eficaz y seguro. Específicamente, el fin de estos estudios animales es demostrar que el fármaco no es carcinogénico, mutagénico o teratogénico, así como entender la farmacocinética del fármaco. Solamente cuando la seguridad en animales y la posible eficacia del candidato farmacológico se han establecido en los ensayos preclínicos se aprobará este candidato farmacológico para ensayos clínicos en seres humanos.

El comportamiento de una molécula pequeña candidata farmacológica, por ejemplo, un nuevo agente antineoplásico basado en antraciclina, en animales será indicativo en muchos casos del comportamiento esperado de este candidato farmacológico tras su administración a seres humanos. Como resultado, los datos obtenidos de dichos ensayos preclínicos tendrán generalmente un alto valor predictivo para el caso humano. Sin embargo, no se espera
20 dicha compatibilidad con todos los tipos de candidatos farmacológicos; se esperaría que ciertos formatos moleculares se comportaran de un modo en animales y de otro modo en seres humanos. En dichos casos, el potencial predictivo de ensayos preclínicos, y por lo tanto la probabilidad de aprobación del candidato farmacológico para ensayos clínicos, se reducen en gran medida.

Un formato de candidato farmacológico que con frecuencia actúa de forma diferente en animales que en seres humanos es un anticuerpo. En general, los anticuerpos actúan por medio de reconocimiento altamente específico de moléculas diana, habitualmente proteicas. La mayoría de candidatos farmacológicos anticuerpos son anticuerpos monoclonales; reconocen solamente el único sitio, o epítipo, en su molécula diana. Sin embargo, aunque esta capacidad diferenciadora inherente de anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos hace estos
30 compuestos candidatos muy interesantes para el desarrollo de fármacos, también complica su ensayo preclínico. Esto se debe a variaciones dependientes de especies en la secuencia de la molécula diana con la que se unen dichos anticuerpos. Un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que reconoce específicamente y se une con, por ejemplo, la molécula Y mediante epítipo X en seres humanos, con frecuencia no conseguirá reconocer específicamente y unirse con la molécula correspondiente Y' en una especie no humana ya que el epítipo correspondiente X' puede ser diferente de su homólogo humano X. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, contra antígenos humanos) por diseño tienden a tener reactividad muy limitada con especies filogenéticamente distantes tales como roedores, excepto en los casos muy poco habituales en los que el antígeno está altamente conservado. Incluso entre el grupo de anticuerpos monoclonales con reactividad para antígenos humanos y de primates, existen numerosos ejemplos de anticuerpos que reaccionan solamente con los homólogos
40 de antígeno humanos y del chimpancé. Esto también se ha observado para anticuerpos monoclonales anti-CD3. Uno de los anticuerpos monoclonales más ampliamente usados y mejor caracterizados específicos para el complejo de CD3 es OKT-3 que reacciona con CD3 de chimpancé, pero no con el homólogo de CD3 de otros primates, tales como macacos, o con CD3 de perro (Sandusky *et al.*, J. Med. Primatol. 15 (1986), 441-451). El anticuerpo monoclonal anti-CD3 UCHT-1 también es reactivo con CD3 de chimpancé, pero no con CD3 de macacos (datos propios; véase los siguientes Ejemplos). Por otro lado, también hay ejemplos de anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de macaco, pero no sus homólogos humanos. Un ejemplo de este grupo es el anticuerpo monoclonal FN-18 dirigido a CD3 de macacos (Uda *et al.*, J. Med. Primatol. 30 (2001), 141-147). Resulta interesante que se ha descubierto que linfocitos periféricos de aproximadamente 12 % de monos cynomolgus carecen de reactividad con anticuerpo monoclonal anti-CD3 de mono Rhesus (FN-18) debido a un polimorfismo del antígeno
50 CD3 en macacos. Uda *et al.* describieron una sustitución de dos aminoácidos en la secuencia de CD3 de monos cynomolgus que no son reactivos con anticuerpos FN-18, en comparación con CD3 derivado de animales que son reactivos con anticuerpos FN-18 (Uda *et al.*, J Med Primatol. 32 {2003}, 105-10; Uda *et al.*, J Med Primatol. 33 (2004), 34-7).

Se observaron dificultades similares con alta especificidad de anticuerpos monoclonales en ensayos animales preclínicos con anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico recombinante del tipo general desvelado en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.260.203. Esta dificultad añadida se debe al hecho de que un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico, comprende dos dominios de unión distintos, uno, o ambos, de los cuales puede no reconocer el homólogo no humano de su molécula diana humana. En la práctica, el riesgo de que, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico, no consiga reconocer sus moléculas diana respectivas pretendidas en un animal es dos veces mayor con un anticuerpo
60

monoespecífico o fragmento del mismo.

Existen varias estrategias conocidas para contrarrestar estos problemas.

5 Un enfoque conocido es realizar ensayos preclínicos del candidato farmacológico de anticuerpo (bienespecífico) o un fragmento del mismo en un modelo de chimpancé. El chimpancé es el pariente genético más cercano al ser humano, idéntico a este último en más del 99 % de su genoma, de modo que es muy probable que la variante de chimpancé de una molécula con la que se une específicamente un candidato farmacológico anticuerpo (bienespecífico) o un fragmento del mismo sea idéntica la variante humana de esta molécula. El peligro de la ausencia de reconocimiento de esta molécula por el candidato farmacológico de anticuerpo (bienespecífico) o el fragmento del mismo en chimpancé por tanto se minimiza. Sin embargo, los ensayos en chimpancé son muy caros y están cargados de problemas éticos. Además, los chimpancés son animales en peligro de extinción de modo que el número de animales que pueden usarse en experimentación está muy limitado. Para la mayoría de los desarrolladores de productos terapéuticos de anticuerpo (bienespecífico), dichos ensayos preclínicos en chimpancés están por lo tanto excluidos.

El enfoque anterior se describe, por ejemplo, en Schlereth *et al.* (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1 - 12). En este estudio, la actividad biológica de un candidato farmacológico clínico, anticuerpo monocatenario bienespecífico CD19xCD3, se ha ensayado en chimpancé. El anticuerpo CD19xCD3, previamente descrito en el documento WO 99/54440 para administración terapéutica en seres humanos, es un anticuerpo monocatenario bienespecífico que se une específicamente con el antígeno de linfocitos B humanos CD19 y un antígeno de linfocitos T humanos CD3. Los autores de este artículo descubrieron que este anticuerpo monocatenario bienespecífico se unía a variantes tanto humana como de chimpancé de la molécula CD3 y CD19. Sin embargo, no se pudo encontrar ninguna reactividad de dicho anticuerpo monocatenario bienespecífico con linfocitos B y T de otra especie, es decir, ratón, perro Beagle y primates distintos de chimpancé (*cynomolgus*, *Rhesus* y *babuino*), confirmando de nuevo la extrema sensibilidad de especies de los anticuerpos monoclonales.

Otro enfoque adapta la molécula usada en el ensayo preclínico al animal usado para este ensayo. De acuerdo con este enfoque, se obtiene la información de seguridad requerida en estudios preclínicos construyendo anticuerpos denominados "sustitutos" para administración a animales de ensayo. En general, dicho anticuerpo sustituto es un anticuerpo que se ha modificado para reconocer específicamente y unirse con el homólogo del animal de ensayo de una molécula diana con la que se une el anticuerpo no sustituto, es decir, el candidato farmacológico real en seres humanos. Por lo tanto, en enfoques que usan dichos anticuerpos "sustitutos", tienen que desarrollarse e investigarse por separado dos moléculas diferentes: el candidato farmacológico clínico y un candidato para ensayos preclínicos en una especie animal correspondiente a la especificidad diana del candidato clínico. El principal inconveniente de dichos enfoques de sustituto es que el anticuerpo sustituto para ensayos preclínicos se ha modificado con respecto al anticuerpo candidato farmacológico real. Por lo tanto, los datos obtenidos en ensayos preclínicos usando un anticuerpo sustituto con frecuencia no son directamente aplicables al caso humano. Como se ha explicado anteriormente, esta aplicabilidad reducida reduce en última instancia el potencial predictivo de cualquier estudio preclínico que use estos enfoques.

Aunque el enfoque anterior adapta el candidato farmacológico para coincidir con el animal usado para ensayo, otros enfoques conocidos hacen exactamente lo opuesto; de acuerdo con estos otros enfoques conocidos, el animal usado para ensayos se adapta al candidato farmacológico que se pretende administrar a seres humanos.

Un ejemplo de la adaptación del animal de ensayo al candidato farmacológico que se pretende administrar a seres humanos es la creación de un animal transgénico que expresa la molécula humana a la que se une específicamente el anticuerpo (bienespecífico) o fragmento del mismo en lugar de la molécula no humana que es endógena de su propia especie. De esta manera, el anticuerpo (bienespecífico) o fragmento del mismo administrado en ensayos preclínicos se encontrará y se unirá con el antígeno humano en el animal de ensayo transgénico. Por ejemplo, en un estudio diseñado por Bugelski *et al.* (Bugelski *et al.*, Hum Exp Toxicol. 19 (2000), 230-243), se ha llevado a cabo evaluación de seguridad preclínica del anticuerpo monoclonal Keliximab en un ratón transgénico para CD4 humano para el soporte del tratamiento crónico de artritis reumatoide en pacientes humanos. Keliximab es un anticuerpo monoclonal con especificidad por CD4 humano y de chimpancé. Los autores concluyen que el uso de ratones transgénicos que expresan proteínas humanas proporciona una alternativa útil a estudios en chimpancés con agentes biofarmacéuticos que tienen especificidad para diferentes especies limitada (Bugelski *et al.*, Hum Exp Toxicol. 19 (2000), 230-243). Sin embargo, la creación de animales transgénicos para fines de ensayo es muy laboriosa y, por lo tanto, cara.

El documento WO 2005/061547 desvela un anticuerpo bienespecífico que comprende dos dominios variables de anticuerpo en una única cadena polipeptídica en el que una primera parte del anticuerpo bienespecífico es capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana uniéndose específicamente con un antígeno efector en la célula efectora inmunitaria humana, y una segunda parte del anticuerpo bienespecífico se une específicamente con un antígeno diana distinto del antígeno efector.

El documento WO 2004/106380 proporciona un método para la preparación de una molécula de unión humana,

fragmento o derivado de la misma que se une específicamente con el complejo CD3 humano.

Bortoletto *et al.* (2002), Eur J Immunol 32(11): 3102-3107 mutaron un anticuerpo monocatenario biespecífico (BscAb) dirigido a CD3 y EpCAM humanos para generar variantes que se unen con CD3 con mayor o menor afinidad.

5 El documento US 2002/0142000 proporciona polipéptidos de inmunotoxinas recombinantes que comprenden un dominio de unión a CD3 y un mutante de exotoxina de *Pseudomonas*.

10 Knechtle *et al.* (1997), Transplantation 63(1): 1-6 desvela anulación de linfocitos T por la inmunotoxina FN18-CRM9 en monos Rhesus que se dice que da como resultado supervivencia e intolerancia a aloinjerto prolongado. De forma similar, Neville *et al.* (1992), Proc Natl Acad Sci USA 89(7): 2585- 2589 usaron la inmunotoxina FN18-CRM9 para la anulación de linfocitos T y sugirieron su uso para el tratamiento de afecciones provocadas por la expansión de linfocitos T monoclonales patológica.

15 Rogers *et al.* (2004), Immunology 113(2): 178-186 describe la identificación y caracterización de CD89 (receptor de Fc de inmunoglobulina A) de macaco.

20 Los documentos US 2006/0034835 y WO 2006/084264 proporcionan anticuerpos anti-CD20 humanizados y quiméricos para el tratamiento de tumores malignos positivos para CD20 y enfermedades autoinmunitarias.

Holt *et al.* (2003), Trends Biotechnol 21(11): 484-490 describe anticuerpos de dominio humano que se dice que son las regiones variables robustas de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas (VH y VL respectivamente).

25 Davies *et al.* (1996), Immunotechnology 2(3): 169-179 describe métodos para mejorar la afinidad de dominios VH de anticuerpos individuales.

30 En el mismo sentido, un enfoque alternativo empleado con frecuencia es inyectar a un animal de ensayo no transgénico células humanas que expresan la molécula para unir específicamente con el anticuerpo (biespecífico) o fragmento del mismo que se ensaye. Sin embargo, aunque evite los costes y el tiempo asociado con construcción de especies animales transgénicas, este enfoque presenta otros problemas. En primer lugar, en enfoques que usan, por ejemplo, ratones inmunocompetentes, el sistema inmunitario del animal de ensayo reconoce con frecuencia células ajenas introducidas en el animal y estas se eliminan sistemáticamente. Aunque los ratones inmunodeficientes permiten la inyección y el crecimiento de células no singénicas, por ejemplo, en modelos de tumores de xenoinjerto, la aplicabilidad de los datos obtenidos para el candidato farmacológico en dichos estudios está limitado debido a la distancia filogenética entre roedores y seres humanos. Además, las múltiples extracciones sanguíneas son problemáticas en animales inferiores, por ejemplo, un ratón. Sin embargo, dichas múltiples extracciones sanguíneas son esenciales para la determinación de parámetros farmacocinéticos y el ensayo continuo de parámetros sanguíneos para evaluar los efectos biológicos de un candidato farmacológico en ensayos animales preclínicos.

40 En resumen, hay dos enfoques principales para obtener datos preclínicos sobre seguridad y toxicidad de un candidato farmacológico para administración en seres humanos. Un modo es la aplicación del candidato farmacológico clínico a modelos animales transgénicos, principalmente modelos de ratón. Sin embargo, los datos preclínicos tienen potencia explicativa limitada debido al hecho de que los roedores están menos relacionados con seres humanos en comparación con los primates. Otro modo es ensayar moléculas sustitutas en una especie animal relevante. Estas moléculas sustitutas son específicas para los animales usados y son por tanto diferentes del candidato farmacológico clínico desarrollado para administración en seres humanos. El problema es que el candidato farmacológico clínico no puede aplicarse directamente en un animal distinto de chimpancé que están estrechamente relacionados con seres humanos y tiene alto potencial predictivo cuando se usa en ensayos preclínicos. Métodos existentes para obtener datos preclínicos significativos con respecto a un anticuerpo (biespecífico) o fragmento del mismo que se somete a ensayos como un candidato farmacológico ajustan este anticuerpo al animal de ensayo, en cuyo caso los datos obtenidos son con frecuencia solamente de aplicabilidad limitada para el candidato farmacológico, o por el contrario, ajustan el animal de ensayo al anticuerpo, en cuyo caso surgen dificultades éticas y/o de coste y, en el peor de los casos, la aplicabilidad de los datos obtenidos para el candidato farmacológico aún puede ser limitada.

55 Es por lo tanto un objetivo de la invención proporcionar una solución a los problemas perfilados anteriormente.

60 La solución a estos problemas es la provisión de anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define en las reivindicaciones y en el presente documento que muestran especificidad para diferentes especies que se unen con moléculas diana humanas y de primates distintos de chimpancé y por lo tanto pueden usarse para evaluación preclínica de seguridad, actividad y/o perfil farmacocinético de dicho anticuerpo biespecífico en primates y, en la forma idéntica, como fármacos en seres humanos.

65 En consecuencia, un aspecto de la invención se refiere al uso de un anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende un primer dominio de unión que se une con un CD3 de primate distinto de chimpancé y un segundo dominio de unión que se une con un antígeno de superficie celular, en el que dicho primer dominio de unión se une

con un epítopo de CD3 humano y de primate distinto de chimpancé, en el que el epítopo comprende la secuencia de aminoácidos "FSEXEX" (SEQ ID NO 240), en la que "X" representa L (leucina) o M (metionina), y en el que el CD3-épsilon de primate distinto de chimpancé comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 135 o 136, en un método para evaluar la seguridad (*in vivo*) y/o actividad y/o perfil farmacocinético de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico en seres humanos, que comprende (i) administrar dicho anticuerpo monocatenario biespecífico a un primate distinto de chimpancé, (ii) medir dicha seguridad (*in vivo*) y/o actividad y/o perfil farmacocinético de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico en dicho primate distinto de chimpancé y (iii) evaluar la seguridad y/o actividad (*in vivo*) y/o el perfil farmacocinético de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico en seres humanos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monocatenario biespecífico como se ha definido anteriormente para uso en un método para evaluar la actividad/seguridad/toxicidad biológica, que comprende

- (i) administrar dicho anticuerpo monocatenario biespecífico a un primate distinto de chimpancé,
- (ii) medir la seguridad y/o actividad *in vivo* y/o el perfil farmacocinético de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico en dicho primate distinto de chimpancé,
- (iii) evaluar la seguridad y/o actividad *in vivo* y/o el perfil farmacocinético de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico en el primate distinto de chimpancé, y
- (iv) determinar una dosis eficaz y no tóxica en dicho anticuerpo monocatenario biespecífico y administrar dicha dosis a seres humanos.

En particular, es un objetivo de la invención proporcionar medios y métodos que mejoren el valor predictivo de datos obtenidos en ensayos de animales preclínicos para la administración del candidato farmacológico a seres humanos.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo monocatenario biespecífico" indica una unión de cadena polipeptídica que comprende dos dominios de unión. Cada dominio de unión 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 con dicha primera molécula, es decir, la molécula CD3, y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente con un antígeno de superficie celular, como se define en más detalle posteriormente.

Los dos dominios de unión se unen opcionalmente entre sí por un espaciador polipeptídico corto que comprende en general aproximadamente 5 aminoácidos. Cada dominio de unión puede comprender adicionalmente una región variable de una cadena ligera de anticuerpo ("región VL"), la región VH y región VL dentro de cada uno de los primer y segundo dominios de unión que se unen entre sí mediante un enlazador polipeptídico, por ejemplo, del tipo desvelado y reivindicado en el documento EP 623679 B1, pero en cualquier caso suficiente tiempo para permitir que la región VH y región VL del primer dominio de unión y la región VH y región VL del segundo dominio de unión se emparejen entre sí de modo que, juntos, sean capaces de unirse específicamente con las primera y segunda moléculas respectivas.

Como se usa en el presente documento, el término "une" o expresiones relacionadas tales como "uniéndose" o "reactividad con/a", etc. se refieren a capacidad de los primer y/o segundo dominios de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento para diferenciar entre la primera y/o segunda molécula respectiva en tal grado que, a partir de un grupo de una pluralidad de moléculas diferentes como compañeros de unión potenciales, solamente se unan, o se unan significativamente, dichas primera y segunda moléculas respectivas. Dichas medidas de unión pueden realizarse rutinariamente, por ejemplo, en un aparato Biacore.

Más específicamente, el primer dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento se une con CD3 humano y con CD3 de primate distinto de chimpancé. La expresión "primate distinto chimpancé" se explica en más detalle posteriormente. Como resultará evidente para el experto en la materia, no se excluye del alcance de la invención que el primer dominio de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies como se define en el presente documento también pueda unirse, por ejemplo, con CD3 de chimpancé. Por otro lado, resulta evidente que los dominios de unión que solamente se unen con CD3 humano, pero no con CD3 de primate distinto de chimpancé, se excluyen del alcance de la invención. Esto se aplica cambiando lo que deba cambiarse a dominios de unión que solamente se unan con CD3 de primate distinto de chimpancé, pero no con CD3 humano, tales como, por ejemplo, los del anticuerpo monoclonal FN-18.

El segundo dominio de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define en el presente documento se une con un antígeno de superficie celular, preferentemente, un antígeno tumoral, como se expone posteriormente. Preferentemente, ambas moléculas de unión de los anticuerpos monoclonales biespecíficos como se define en el presente documento se unen con sus moléculas diana humanas y de primate distinto de chimpancé respectivas. El segundo dominio de unión, por lo tanto, se une con un antígeno de superficie celular humana y con el homólogo correspondiente del antígeno de superficie celular en un primate distinto de chimpancé. La identificación y determinación de homólogos de antígenos de superficie celular humana en primates distintos de chimpancé se conocen bien por los expertos en la materia y puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante alineamientos de secuencia.

La expresión “especificidad para diferentes especies” o “especificidad entre especies” como se usa en el presente documento significa unión de al menos uno de los dos dominios de unión, preferentemente de ambos dominios de unión, del anticuerpo monocatenario biespecífico descrito en el presente documento con la misma molécula diana en seres humanos y primates distintos de chimpancé. Por lo tanto, la “especificidad para diferentes especies” o “especificidad entre especies” debe entenderse como una reactividad entre especies a la misma molécula X, pero no a una molécula distinta de X. La especificidad para diferentes especies de un anticuerpo monoclonal que reconoce por ejemplo CD3 humano, para un CD3 de primate distinto de chimpancé, por ejemplo, CD3 de macaco, puede determinarse, por ejemplo, por análisis de FACS. El análisis de FACS se lleva a cabo de manera que el anticuerpo monoclonal respectivo se ensaye con respecto a unión con células humanas y de primates distintos de chimpancé, por ejemplo, células de macaco, que expresan dichos antígenos CD3 humanos y de primates distintos de chimpancé, respectivamente. Se muestra un ensayo apropiado en los siguientes ejemplos. Para la generación del primer dominio de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define en el presente documento, por ejemplo, puede usarse unión de anticuerpos monoclonales con CD3 tanto humano como distinto de chimpancé (por ejemplo, CD3 de macaco). De forma similar, para generación del segundo dominio de unión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se define en el presente documento, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales que se unen con ambos de los antígenos de superficie celular humanos y de primates distintos de chimpancé respectivos. Los dominios de unión apropiada para los anticuerpos monoclonales biespecíficos como se define en el presente documento pueden derivarse de anticuerpos monoclonales específicos para diferentes especies por métodos recombinantes descritos en la técnica. Puede ensayarse la unión de un anticuerpo monoclonal con un antígeno de superficie celular humano y con el homólogo de dicho antígeno de superficie celular en un primate distinto de chimpancé por ensayos de FACS como se ha expuesto anteriormente. Resulta evidente para los expertos en la materia que también pueden generarse anticuerpos monoclonales específicos para diferentes especies por técnicas de hibridoma descritas en la bibliografía (Milstein y Köhler, Nature 256 (1975), 495-7). Por ejemplo, los ratones pueden inmunizarse alternativamente con CD3 humano y de primate distinto de chimpancé. De estos ratones se aíslan células de hibridoma productoras de anticuerpos específicos para diferentes especies mediante tecnología de hibridoma y se analizan por FACS como se ha expuesto anteriormente. La generación y análisis de anticuerpos monoclonales biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies como se describe en el presente documento se muestra en los siguientes ejemplos. Las ventajas de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies incluyen los puntos enumerados posteriormente.

Como se usa en el presente documento “humano” y “hombre” se refiere a la especie *Homo sapiens*. Una molécula “humana” es por lo tanto la variante de esa molécula como se expresa de forma natural en *Homo sapiens*. En lo que se refiere a los usos médicos de las construcciones descritas en el presente documento, los pacientes humanos deben tratarse con las mismas.

Como se usa en el presente documento, un “primate distinto de chimpancé” o variantes gramaticales del mismo se refiere a cualquier primate distinto de chimpancé, es decir, distinto de un animal que pertenece al género *Pan* y que incluye las especies *Pan paniscus* y *Pan troglodytes*, también conocidos como *Anthropopithecus troglodytes* o *Simia satyrus*. Un “primate”, “especie primate”, “primates” o variantes gramaticales de los mismos indica un orden de mamíferos euterios divididos en los dos subórdenes de prosimios y antropoides y que comprenden al hombre, simios, monos y lémures. Específicamente, “primates” como se usa en el presente documento comprende el suborden *Strepsirrhini* (prosimios no tarseros), incluyendo el infraorden *Lemuriformes* (que incluye por su parte las superfamilias *Cheirogaleoidea* y *Lemuroidea*), el infraorden *Chiromyiformes* (que incluye por su parte la familia *Daubentonidae*) y el infraorden *Lorisiformes* (que incluye por su parte las familias *Lorisidae* y *Galagidae*). “Primates” como se usa en el presente documento también comprende el suborden *Haplorrhini*, que incluye el infraorden *Tarsiiformes* (que incluye por su parte la familia *Tarsiidae*), el infraorden *Simiiformes* (que incluyen por su parte los *Platyrrhini*, o Monos del Nuevo Mundo, y los *Catarrhini*, incluyendo los *Cercopithecoidea*, o Monos del Viejo Mundo).

Puede entenderse que la especie de primate distinto de chimpancé dentro del significado de la invención es un lémur, un tarsero, un gibón, un tifi (que pertenece a los Monos del Nuevo Mundo de la familia *Cebidae*) o un Mono del Viejo Mundo (que pertenece a la superfamilia *Cercopithecoidea*).

Como se usa en el presente documento, un “Mono del Viejo Mundo” comprende cualquier mono que quede en la superfamilia *Cercopithecoidea*, subdividida a su vez en las familias: *Cercopithecinae*, que son principalmente africanos, pero incluyen el género diverso de macacos que son asiáticos y norteafricanos; y los *Colobinae*, que incluye la mayoría de los géneros asiáticos, pero también los monos colobos africanos.

Específicamente, dentro de la subfamilia *Cercopithecinae*, un primate distinto de chimpancé ventajoso puede ser de la tribu *Cercopithecini*, dentro del género *Allenopithecus* (Mono de Allen, *Allenopithecus nigroviridis*); dentro del género *Miopithecus* (Talapoin Sureño, *Miopithecus talapoin*; Talapoin Norteño, *Miopithecus ogouensis*); dentro del género *Erythrocebus* (Mono Patas, *Erythrocebus patas*); dentro del género *Chlorocebus* (Mono Verde, *Chlorocebus sabaeus*; Cercopiteco Verde, *Chlorocebus aethiops*; Cercopiteco de las Montañas Bale, *Chlorocebus djamdjamensis*; Cercopiteco Tántalo, *Chlorocebus tantalus*; Cercopiteco Verde, *Chlorocebus pygerythrus*; Malbrouck, *Chlorocebus cynosuroides*); o dentro del género *Cercopithecus* (Mono Dryas o Ntolu, *Cercopithecus dryas*; Cercopiteco Diana, *Cercopithecus diana*; Cercopiteco de Roloway, *Cercopithecus roloway*; Cercopiteco de Nariz

Blanca, *Cercopithecus nictitans*; Mono Azul, *Cercopithecus mitis*; Mono de Plata, *Cercopithecus doggetti*; Mono Dorado, *Cercopithecus kandti*; Cercopiteco de Cuello Blanco, *Cercopithecus albogularis*; Cercopiteco Mona, *Cercopithecus mona*; Mona de Campbell, *Cercopithecus campbelli*; Cercopiteco de Lowe, *Cercopithecus lowei*; cercopiteco Coronado de Grey, *Cercopithecus pogonias*; Cercopiteco de Wolf, *Cercopithecus wolffi*; Cercopiteco de Dent, *Cercopithecus denti*; cercopiteco Menor, *Cercopithecus petaurista*; cercopiteco de garganta blanca, *Cercopithecus erythrogaster*; cercopiteco de Sclater, *Cercopithecus sclateri*; Cercopiteco de Orejas Rojas, *Cercopithecus erythrotis*; cercopiteco de Hocio Azul, *Cercopithecus cephus*; Cercopiteco de Cola Roja, *Cercopithecus ascanius*; Cercopiteco de L'Hoest, *Cercopithecus lhoesti*; Cercopiteco de Preuss, *Cercopithecus preussi*; Cercopiteco de Gabón, *Cercopithecus solatus*; cercopiteco de Cara de Búho, *Cercopithecus hamlyni*; Cercopiteco de Brazza, *Cercopithecus neglectus*).

Como alternativa, un primate distinto de chimpancé ventajoso, también dentro de la subfamilia *Cercopithecinae* pero dentro de la tribu *Papionini*, puede estar dentro del género *Macaca* (Macaco de Gibraltar, *Macaca sylvanus*; Macaco de Cola de León, *Macaca silenus*; Macaco cola de cerdo sureño o Beruk, *Macaca nemestrina*; Macaco cola de cerdo norteño, *Macaca leonina*; Macaco de Pagai o Bokkoi, *Macaca pagensis*; Macaco de Siberut, *Macaca siberu*; Macaco moro, *Macaca maura*; Macaco crestado de Célebes, *Macaca ochreata*; Macaco de Togian, *Macaca tonkeana*; Macaco de Heck, *Macaca hecki*; Macaco de Gorontalo, *Macaca nigricens*; Macaco negro crestado, *Macaca nigra*; mono cynomolgus o macaco cangrejero o Kera, *Macacae fascicularis*; Macaco rabón, *Macaca arctoides*; Macaco Rhesus, *Macaca mulatta*; Macaco de Formosa, *Macaca cyclopis*; Macaco japonés, *Macaca fuscata*; Macaco de Sri Lanka, *Macaca sinica*; Macaco coronado, *Macaca radiata*; Macaco de Gibraltar, *Macaca sylvanus*; Macaco de Assam, *Macaca assamensis*; Macaco tibetano, *Macaca thibetana*; Macaco de Arunachal o Munzala, *Macaca munzala*); dentro del género *Lophocebus* (Mangabey de mejillas grises, *Lophocebus albigena*; *Lophocebus albigena albigena*; *Lophocebus albigena osmani*; *Lophocebus albigena johnstoni*; Mangabey de cresta negra, *Lophocebus aterrimus*; Mangabey de Opendbosch, *Lophocebus opdenboschi*; Kipunyi, *Lophocebus kipunji*); dentro del género *Papio* (Hamadriade, *Papio hamadryas*; papión de Guinea, *Papio papio*; papión oliva, *Papio anubis*; papión amarillo, *Papio cynocephalus*; papión Chacma, *Papio ursinus*); dentro del género *Theropithecus* (Gelada, *Theropithecus gelada*); dentro del género *Cercocebus* (Mangabey gris, *Cercocebus atys*; *Cercocebus atys atys*; *Cercocebus atys lunulatus*; Mangabey gris, *Cercocebus torquatus*; Mangabey ágil, *Cercocebus agilis*; Mangabey de vientre dorado, *Cercocebus chrysogaster*; Mangabey del río Tana, *Cercocebus galeritus*; Mangabey del río Sanje, *Cercocebus sanjei*); o dentro del género *Mandrillus* (Mandrill, *Mandrillus sphinx*; Drill, *Mandrillus leucophaeus*).

Se prefieren más *Macaca fascicularis* (también conocido como mono cynomolgus y, por lo tanto, en los ejemplos denominado "Cynomolgus") y *Macaca mulatta* (mono Rhesus, denominado "Rhesus").

Dentro de la subfamilia de *Colobinae*, un primate distinto de chimpancé ventajoso puede ser del grupo africano, dentro del género *Colobus* (Colobo negro, *Colobus satanas*; Colobo angoleño, *Colobus angolensis*; Colobo rey, *Colobus polykomos*; Colobo ursino, *Colobus vellerosus*; Guereza abisinio, *Colobus guereza*); dentro del género *Piliocolobus* (Colobo rojo occidental, *Piliocolobus badius*; *Piliocolobus badius badius*; *Piliocolobus badius temminckii*; *Piliocolobus badius waldroneae*; Colobo de Pennant, *Piliocolobus pennantii*; *Piliocolobus pennantii pennantii*; *Piliocolobus pennantii epieni*; *Piliocolobus pennantii bouvieri*; Colobo rojo de Preuss, *Piliocolobus preussi*; Colobo rojo de Thollon, *Piliocolobus tholloni*; Colobo rojo centroafricano, *Piliocolobus foai*; *Piliocolobus foai foai*; *Piliocolobus foai ellioti*; *Piliocolobus foai oustaleti*; *Piliocolobus foai semlikiensis*; *Piliocolobus foai parmentierorum*; Colobo rojo ugandés, *Piliocolobus tephrosceles*; Colobo rojo de Udzungwa, *Piliocolobus gordonorum*; Colobo rojo de Zanzíbar, *Piliocolobus kirkii*; Colobo rojo del río Tana, *Piliocolobus rufomitratu*); o dentro del género *Procolobus* (Colobo Oliva, *Procolobus verus*).

Dentro de la subfamilia de *Colobinae*, un primate distinto de chimpancé ventajoso puede ser como alternativa del grupo de Langur, dentro del género *Semnopithecus* (Langur gris de Nepal, *Semnopithecus schistaceus*; Langur gris de Cachemira *Semnopithecus ajax*; Langur gris de Tarai, *Semnopithecus hector*; Langur común, *Semnopithecus entellus*; Langur gris de pies negros, *Semnopithecus hypoleucos*; Langur gris de las planicies del sur, *Semnopithecus dussumieri*; Langur gris moñudo, *Semnopithecus priam*); dentro del grupo de *T. vetulus* o el género *Trachypithecus* (Langur de cara púrpura, *Trachypithecus vetulus*; Langur de Nilgiri, *Trachypithecus johnii*); dentro del grupo *T. cristatus* del género *Trachypithecus* (Langur de Java, *Trachypithecus auratus*; Langur plateado, *Trachypithecus cristatus*; Langur de Indochina, *Trachypithecus germani*; Langur de Tenasserim, *Trachypithecus barbel*); dentro del grupo *T. obscurus* del género *Trachypithecus* (Langur oscuro o Langur de anteojos *Trachypithecus obscurus*; Langur de Phayre, *Trachypithecus phayrei*); dentro del grupo *T. pileatus* del género *Trachypithecus* (Langur cappuccino, *Trachypithecus pileatus*; Langur de Shortridge, *Trachypithecus shortridgei*; Langur dorado, *Trachypithecus geei*); dentro del grupo *T. francoisi* del género *Trachypithecus* (Langur de Francois, *Trachypithecus francoisi*; Langur de Hatinh, *Trachypithecus hatinhensis*; Langur de cabeza blanca, *Trachypithecus poliocephalus*; Langur Laosiano, *Trachypithecus laotum*; Langur de Delacour, *Trachypithecus delacouri*; Langur negro de Indochina, *Trachypithecus ebenus*); o dentro del género *Presbytis* (Surili de Sumatra, *Presbytis melalophos*; Surili de bandas, *Presbytis femoralis*; Surili de Sarawak, *Presbytis chrysomelas*; Surili de muslos blancos, *Presbytis siamensis*; Surili de frente blanca, *Presbytis frontata*; Surili de Java, *Presbytis comata*; Langur de Thomas, *Presbytis thomasi*; Langur de Hose, *Presbytis hosei*; Langur marrón, *Presbytis rubicunda*; Langur colilargo o Langur de Mentawai, *Presbytis potenziani*; Surili de la isla Natuna, *Presbytis natunae*).

Dentro de la familia de *Colobinae*, un primate distinto de chimpancé ventajoso puede como alternativa ser del grupo de nariz rara dentro del género *Pygathrix* (Douc de canillas rojas, *Pygathrix nemaeus*; Douc de canillas negras, *Pygathrix nigripes*; Douc de patas grises, *Pygathrix cinerea*); dentro del género *Rhinopithecus* (Langur chato dorado, *Rhinopithecus roxellana*; Langur negro de nariz chata, *Rhinopithecus bieti*; Langur gris de nariz chata, *Rhinopithecus brelichi*; Langur de nariz chata de Tonkin, *Rhinopithecus avunculus*); dentro del género *Nasalis* (Mono narigudo, *Nasalis larvatus*); o dentro del género *Simias* (Langur de cola de cerdo, *Simias concolor*).

Como se usa en el presente documento, el término “tití” significa cualquier mono del nuevo mundo del género *Callithrix*, por ejemplo que pertenezca a los titís del Atlántico del subgénero *Callithrix* (tití común, *Callithrix (Callithrix) jacchus*; tití de pincel negro, *Callithrix (Callithrix) penicillata*; tití de orejas negras, *Callithrix (Callithrix) kuhlii*; tití de cabeza blanca, *Callithrix (Callithrix) geoffroyi*; tití de cabeza amarilla *Callithrix (Callithrix) flaviceps*; tití de orejas blancas, *Callithrix (Callithrix) aurita*); que pertenecen a los titís amazónicos del subgénero *Mico* (tití del río Acari, *Callithrix (Mico) acariensis*; tití de Manicoré, *Callithrix (Mico) manicorensis*; tití plateado, *Callithrix (Mico) argentata*; tití blanco, *Callithrix (Mico) leucippe*; tití de Snethlage, *Callithrix (Mico) emiliae*; tití de cabeza negra, *Callithrix (Mico) nigriceps*; tití de Marca, *Callithrix (Mico) marcai*; tití de cola negra, *Callithrix (Mico) melanura*; tití oreja de Santarem, *Callithrix (Mico) humeralifera*; tití de Maués, *Callithrix (Mico) mauesi*; tití dorado y blanco, *Callithrix (Mico) chrysoleuca*; tití de Aripuana, *Callithrix (Mico) intermedia*; tití de Sateré, *Callithrix (Mico) saterai*); tití enano de Roosmalen que pertenece al subgénero *Callibella* (*Callithrix (Callibella) humilis*); o el tití pigmeo que pertenece al subgénero *Cebuella* (*Callithrix (Cebuella) pygmaea*).

Como se usa en el presente documento, CD3 indica una molécula expresada como parte del receptor de linfocitos T y tiene el significado que se le atribuye típicamente en la técnica anterior. En seres humanos, abarca en forma individual o combinada de forma independiente todas las subunidades de CD3 conocidas, por ejemplo, CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma, CD3 zeta, CD3 alfa y CD3 beta. Los antígenos CD3 de primates distintos de chimpancé como se indica en el presente documento son, por ejemplo, CD3 de *Macaca fascicularis* y CD3 de *Macaca mulatta*. En *Macaca fascicularis*, abarca CD3 épsilon FN-18 negativo y CD3 épsilon FN-18 positivo, CD3 gamma y CD3 delta. En *Macaca mulatta*, abarca CD3 épsilon, CD3 gamma y CD3 delta. Preferentemente, dicho CD3 como se usa en el presente documento es CD3 épsilon.

El CD3 épsilon humano está indicado en GenBank N.º de referencia NM_000733 y comprende SEQ ID NO. 134. El CD3 gamma humano está indicado en GenBank N.º de referencia NM_000073 y comprende SEQ ID NO. 142. El CD3 delta humano está indicado en GenBank N.º de referencia NM_000732 y comprende SEQ ID NO. 143.

El CD3 épsilon “FN-18 negativo” de *Macaca fascicularis* (es decir, CD3 épsilon no reconocido por el anticuerpo monoclonal FN-18 debido a un polimorfismo como se ha expuesto anteriormente) está indicado en GenBank N.º de referencia AB073994 y comprende SEQ ID NO. 136.

El CD3 épsilon “FN-18 positivo” de *Macaca fascicularis* (es decir, CD3 épsilon reconocido por el anticuerpo monoclonal FN-18) está indicado en GenBank N.º de referencia AB073993 y comprende SEQ ID NO. 135. El CD3 gamma de *Macaca fascicularis* está indicado en GenBank N.º de referencia AB073992 y comprende SEQ ID NO. 144. El CD3 delta de *Macaca fascicularis* está indicado en GenBank N.º de referencia AB073991 y comprende SEQ ID NO. 145.

Las secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos de los homólogos de CD3 épsilon, gamma y delta respectivos de *Macaca mulatta* pueden identificarse y aislarse por técnicas recombinantes descritas en este campo (Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª Edición 2001). Esto se aplica cambiando lo que deba cambiarse a los homólogos de CD3 épsilon, gamma y delta de otros primates distintos de chimpancé como se define en el presente documento.

Como se ha indicado anteriormente y como se desvela en el presente documento, el primer dominio de unión el anticuerpo monocatenario biespecífico comprendido en la composición farmacéutica de la invención conduce a un epítipo de CD3 humano y de primate distinto de chimpancé que comprende la secuencia de aminoácidos “fenilalanina (F) - serina (S) – ácido glutámico (E)” como se define en las reivindicaciones. El experto en la materia se encuentra fácilmente en una situación en la que puede deducir un epítipo detectado por un anticuerpo/molécula de unión dado y/o (como en la presente invención) un “dominio de unión” dado de una construcción monocatenaria por métodos conocidos en la técnica, dichos métodos también se ilustran en los ejemplos adjuntos y pueden comprender análisis por transferencia de Western, mapeo de epítipos o análisis de pepspot y similares.

El epítipo para detectar por dicho primer dominio de unión está preferentemente en el intervalo de 15 aminoácidos +/- 3 aminoácidos. Se prevén (pero sin limitación) 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 aminoácidos en dicho epítipo que comprende el tramo “F-S-E” / epítipo central “F-S-E” como se define en las reivindicaciones.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, el epítipo central mínimo de CD3 humano y de primate distinto de chimpancé con el que se une el primer dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento es un epítipo que comprende los restos de aminoácidos “FSE” como se define en las reivindicaciones. Más específicamente, el epítipo mínimo comprende los restos de aminoácidos “FSEXE” (SEQ ID

NO. 202 y 204) en los que la sustitución (“X”) de metionina por leucina es una sustitución de aminoácido conservada entre dos restos de aminoácidos neutros, no polares. El epítipo mínimo puede ser parte de un epítipo discontinuo. Como se usa en el presente documento, la expresión “epítipo discontinuo” debe entenderse como al menos dos tramos de secuencias de aminoácidos no adyacentes dentro de una cadena polipeptídica dada, aquí por ejemplo CD3 (preferentemente CD3 épsilon), que se unen simultáneamente por un anticuerpo. Estos tramos de aminoácidos podrían ser de longitud diferente y también pueden estar implicados en la interacción de anticuerpo y antígeno. En consecuencia, además del epítipo mínimo (central) como se ha definido anteriormente, el anticuerpo monocatenario biespecífico puede simultáneamente unirse con uno, dos o incluso más epítopos no adyacentes. Este epítipo o estos epítopos no adyacentes en combinación con el epítipo (central) mínimo podría representar el sitio de contacto entre antígeno y anticuerpo. De acuerdo con esta definición, dicha unión simultánea puede ser del polipéptido en forma lineal. Aquí, se puede imaginar que el polipéptido forma un bucle extendido, en una región de la cual las dos secuencias, por ejemplo, están más o menos en paralelo y próximas una a la otra. Los epítopos no adyacentes en la secuencia lineal podrían formar una estructura tridimensional que conduce a una proximidad estrecha de estos epítopos. En este estado se unen simultáneamente con el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento. De acuerdo con esta definición, la unión simultánea de los al menos dos tramos de secuencias del polipéptido indicado anteriormente (incluyendo el epítipo (central) mínimo) también puede tomar la forma de unión de anticuerpo con un epítipo conformacional. Aquí, el polipéptido maduro ya ha formado su conformación terciaria como existe normalmente *in vivo*. En esta conformación terciaria, la cadena polipeptídica se pliega de tal manera que ponga los al menos dos tramos de secuencias indicados anteriormente en proximidad espacial, por ejemplo, en la superficie externa de una región particular de polipéptido maduro, plegado, donde se reconocen después en virtud de su conformación tridimensional en el contexto de las secuencias polipeptídicas circundantes.

La expresión “antígeno de superficie celular” como se usa en el presente documento indica una molécula que se presenta en la superficie de una célula. En la mayoría de los casos, esta molécula se localizará en o sobre la membrana plasmática de la célula de modo que al menos parte de esta molécula permanezca accesible desde fuera de la célula en forma terciaria. Un ejemplo no limitante de una molécula de superficie celular que se localiza en la membrana plasmática es una proteína transmembrana que comprende, en su conformación terciaria, regiones de hidrofilia e hidrofobicidad. Aquí, al menos una región hidrófoba permite que la molécula de superficie celular se incluya, o se inserte en la membrana plasmática hidrófoba de la célula mientras que las regiones hidrófilas se extienden a uno de los lados de la membrana plasmática en el citoplasma y espacio extracelular, respectivamente. Son ejemplos no limitantes de moléculas de superficie celular que se localizan en la membrana plasmática proteínas que se han modificado en un resto de cisteína para portar un grupo de palmitoilo, proteínas modificadas en un resto de cisteína C terminal para portar un grupo farnesilo o proteínas que se han modificado en el extremo C terminal para portar un anclaje de glucosilfosfatidil inositol (“GPI”). Estos grupos permiten la unión covalente de proteínas con la superficie externa de la membrana plasmática, donde permanecen accesibles para reconocimiento por moléculas extracelulares tales como anticuerpos.

El “antígeno tumoral” como se usa en el presente documento debe entenderse como los antígenos que se presentan en células tumorales. Estos antígenos pueden presentarse en la superficie celular con una parte extracelular que se combina con frecuencia con una parte transmembrana y citoplasmática de la molécula. Estos antígenos pueden en ocasiones presentarse solamente por células tumorales y nunca por las normales. Los antígenos tumorales pueden expresarse exclusivamente en células tumorales o podrían representar una mutación específica de tumor en comparación con células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos de tumor. Más habituales son antígenos que se presentan por células tumorales y células normales y se denominan antígenos asociados a tumor. Estos antígenos asociados al tumor pueden sobreexpresarse en comparación con células normales o son accesibles para unión a anticuerpo en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido tumoral en comparación con tejido normal. Son ejemplos no limitantes de antígenos tumorales como se usa en el presente documento EpCAM (Naundorf, *Int. J. Cancer* 100/1 (2002), 101-110), EGFR (Liu, *Br. J. Cancer* 82/12 (2000), 1991-1999; Bonner, *Semin. Radiat. Oncol.* 12 (2002), 11-20; Kiyota, *Oncology* 63/1 (2002), 92-98; Kuan, *Brain Tumor Pathol.* 17/2 (2000), 71-78), EGFRvIII (Kuan, *Brain Tumor Pathol.* 17/2 <2000), 71-78), o carboanhidrasa IX (MN/CA EX) (Uemura, *Br. J. Cancer* 81/4 (1999), 741-746; Longcaster, *Cancer Res.* 61/17 (2001), 6394-6399; Chia, *J. Clin. Oncol.* 19/16 (2001), 3660-3668; Beasley, *Cancer Res.* 61/13 (2001), 5262-5267).

Las secuencias correspondientes de las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos humanas y de primate distinto de chimpancé pueden encontrarse por ejemplo en bases de datos de NCBI.

Puede generarse un anticuerpo monoclonal específico para diferentes especies que se une con un antígeno de superficie celular humana (preferentemente un antígeno tumoral) y con el homólogo de dicho antígeno de superficie celular (preferentemente un antígeno tumoral) en un primate distinto de chimpancé como se ha expuesto anteriormente. “Homólogos” como se usa en el presente documento se refiere a genes (que codifican por ejemplo CD3, CD3 épsilon, antígenos de superficie celular o antígenos tumorales) que codifican productos génicos con función biológica similar o idéntica en diferentes especies y cuyos genes pueden atribuirse a un gen precursor común. La especificidad para diferentes especies de dicho anticuerpo monoclonal para el antígeno tumoral humano y de primate distinto de chimpancé puede ensayarse por ensayos de FACS como se ha expuesto anteriormente. Como alternativa, puede usarse inmunohistoquímica, radioinmunoensayo o ensayos de ELISA como conocen los

expertos en la materia. El segundo dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico que muestra especificidad para diferentes especies como se describe en el presente documento puede derivarse por ejemplo de dichos anticuerpos monoclonales específicos para diferentes especies mediante técnicas recombinantes descritas en los siguientes ejemplos.

5 La expresión “evaluar la seguridad y/o actividad *in vivo* y/o el perfil farmacocinético” del anticuerpo monocatenario biespecífico como se usa en el presente documento puede entenderse como se expone posteriormente. Antes de poder comercializar un nuevo medicamento candidato este debe pasar por ensayos rigurosos, que pueden subdividirse aproximadamente en ensayos preclínicos en animales y fases clínicas en pacientes humanos. El
10 objetivo del ensayo preclínico en animales es demostrar que el candidato farmacológico es seguro y eficaz (véase, por ejemplo, the Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16,1997).

15 La expresión “fármaco”, “candidato farmacológico” o “composición farmacéutica” como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos monocatenarios biespecíficos definidos en el presente documento.

La actividad biológica del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento puede determinarse por ejemplo mediante ensayos de citotoxicidad, como se describe en los siguientes ejemplos, en el documento WO 99/54440 o en Schlereth *et al.* (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1 - 12). “Eficacia” o
20 “eficacia *in vivo*” como se usa en el presente documento se refiere a la respuesta a terapia por el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento, usando, por ejemplo, criterios de respuesta de NCI normalizados. El éxito o eficacia *in vivo* de la terapia usando un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento se refiere a la eficacia del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento para su fin pretendido, es decir, capacidad del anticuerpo biespecífico para provocar su
25 efecto deseado, es decir, agotamiento de células patológicas, por ejemplo, células tumorales. La eficacia *in vivo* puede supervisarse por métodos convencionales establecidos para las entidades de enfermedad respectivas incluyendo, pero sin limitación, recuentos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de médula ósea. Además, pueden usarse diversos parámetros clínicos específicos de enfermedad y otros métodos convencionales establecidos. Además, puede usarse tomografía asistida por
30 ordenador, rayos X, tomografía por resonancia magnética nuclear (por ejemplo, para evaluación de respuesta basada en criterios del Instituto Nacional del Cáncer [Cheson BD, Homing SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. Abr 1999; 17(4): 1244]), exploración por tomografía de emisión de positrones, recuentos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de médula ósea, biopsias/histologías de ganglios linfáticos y diversos parámetros clínicos químicos de linfoma (por ejemplo, lactato deshidrogenasa) y otros métodos convencionales establecidos.

40 Otro reto importante en el desarrollo de fármacos es la modulación predecible de las propiedades farmacocinéticas. Para este fin, se establece un perfil farmacocinético del candidato farmacológico, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan a la capacidad de un fármaco particular para tratar una afección dada. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco que influyen en la capacidad de un fármaco para tratar una determinada entidad de enfermedad incluyen, pero sin limitación: semivida, volumen de distribución, metabolismo de primer pase
45 hepático y el grado de unión en suero sanguíneo. La eficacia de un agente farmacológico dado puede estar influida por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente.

50 “Semivida” significa el tiempo en el que se elimina el 50 % de un fármaco administrado mediante procesos biológicos, por ejemplo, metabolismo, excreción, etc.

Por “metabolismo de primer pase hepático” se entiende la propensión de un fármaco para metabolizarse tras su primer contacto con el hígado, es decir, durante su primer pase a través del hígado.

55 “Volumen de distribución” significa el grado de retención de un fármaco a lo largo de los diversos compartimentos del cuerpo, como por ejemplo espacios intracelulares y extracelulares, tejidos y órganos, etc. y la distribución del fármaco dentro de estos compartimentos.

60 “Grado de unión en suero sanguíneo” significa la propensión de un fármaco a interactuar con y unirse con proteínas del suero sanguíneo, tales como albúmina, que conducen a una reducción o pérdida de la actividad biológica del fármaco.

Los parámetros farmacocinéticos también incluyen biodisponibilidad, tiempo de retardo (Tlag), Tmáx, velocidades de absorción, más aparición y/o Cmáx para una cantidad dada de fármaco administrado.

65 “Biodisponibilidad” significa la cantidad de un fármaco en el compartimento sanguíneo.

"Tiempo de retardo" significa el retardo temporal entre la administración del fármaco y su detección y capacidad de medición en sangre o plasma.

5 "T_{máx}" es el tiempo después del cual se alcanza la concentración sanguínea máxima del fármaco y "C_{máx}" es la concentración en la sangre obtenida de forma máxima con un fármaco dado. El tiempo hasta alcanzar una concentración en sangre o tejido del fármaco que se requiere para su efecto biológico está influido por todos los parámetros. Los parámetros farmacocinéticos de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies que pueden determinarse en ensayos animales preclínicos y en primates distintos de chimpancé como se ha perfilado anteriormente también se exponen, por ejemplo en la publicación de Schlereth *et al.* (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1 - 12).

10 El término "toxicidad" como se usa en el presente documento se refiere a los efectos tóxicos de un fármaco manifestado en acontecimientos adversos o acontecimientos adversos graves. Estos acontecimientos secundarios podrían referirse a una falta de tolerabilidad del fármaco en general y/o una falta de tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénicos y carcinogénicos causados por el fármaco.

15 La expresión "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad" como se usa en el presente documento define la administración de un fármaco sin inducir acontecimientos adversos graves directamente después de la administración (tolerancia local) y durante un periodo más largo de aplicación del fármaco. Puede evaluarse la "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad", por ejemplo a intervalos regulares durante el tratamiento y el período de seguimiento. Las mediciones incluyen la evaluación clínica, por ejemplo manifestaciones orgánicas, y exploración de anomalías de laboratorio. Puede llevarse a cabo evaluación clínica y registrarse/codificarse desviación con respecto a hallazgos normales según los patrones de NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones orgánicas pueden incluir criterios tales como alergia/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y similares, como se expone, por ejemplo, en Common Terminology Criteria for adverse events v3.0 (CTCAE). Los parámetros de laboratorio que pueden ensayarse incluyen por ejemplo hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y examen de otros fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido linfóide o cefalorraquídeo, licor y similares. La seguridad puede evaluarse por lo tanto por ejemplo mediante examen físico, técnicas de captura de imágenes (es decir, ultrasonidos, rayos x, exploraciones de TC, captura de imágenes por resonancia magnética (IRM), otras medidas con dispositivos técnicos (es decir, electrocardiograma), signos vitales, midiendo parámetros de laboratorio y registrando acontecimientos adversos. Por ejemplo, los acontecimientos adversos en primates distintos de chimpancé en los usos y métodos de acuerdo con la invención pueden examinarse por métodos histopatológicos y/o histoquímicos.

20 25 30 35 40 La expresión "dosis eficaz y no tóxica" como se usa en el presente documento se refiere a una dosis tolerable del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento que es suficientemente alta para provocar el agotamiento de células patológicas, eliminación de tumores, encogimiento de tumores o estabilización de enfermedad sin o esencialmente sin efectos tóxicos importantes. Dichas dosis eficaces y no tóxicas pueden determinarse por ejemplo por estudios de cambio de escala descritos en la técnica y deberían estar por debajo de la dosis que induzca acontecimientos secundarios adversos graves (toxicidad limitante de dosis, TLD).

45 También se hace referencia a las expresiones anteriores, por ejemplo, en la Preclinical safety evaluation of biotechnology- derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16, 1997.

50 55 60 65 Se ha descubierto sorprendentemente que es posible generar productos terapéuticos basados en anticuerpos biespecíficos para seres humanos en los que la molécula idéntica también puede usarse en ensayos animales preclínicos. Esto se debe a la identificación inesperada de anticuerpos monocatenarios biespecíficos que, además de unirse con antígenos humanos (y debido a la similitud genética probable con homólogos de chimpancé), también se unen con los homólogos de dichos antígenos de primates distintos de chimpancé, tales como macacos. Por lo tanto, desaparece la necesidad de construir un anticuerpo monocatenario biespecífico sustituto para ensayar en una especie filogenéticamente distante (de los seres humanos). Como resultado, puede usarse el mismo anticuerpo monocatenario biespecífico en ensayos preclínicos animales que se pretende administrar a seres humanos en ensayos clínicos así como después de la aprobación del mercado. La capacidad de usar la misma molécula para ensayos animales preclínicos que en administración posterior a seres humanos elimina prácticamente, o al menos reduce en gran medida, el peligro de que los datos obtenidos en ensayos animales preclínicos no sean aplicables al caso humano. Brevemente, la obtención de datos de seguridad preclínicos en animales usando la misma molécula que se administrará realmente a seres humanos hace mucho para asegurar la aplicabilidad de los datos a un escenario relevante para seres humanos. Por el contrario, en enfoques convencionales que usan moléculas sustitutas, dichos anticuerpos sustitutos tienen que adaptarse molecularmente al sistema de ensayo animal usado para la evaluación de la seguridad preclínica. Por lo tanto, el anticuerpo sustituto para usar en terapia humana difiere de hecho en secuencia y también probablemente en estructura del usado en ensayos preclínicos en parámetros farmacocinéticos y/o actividad biológica, con la consecuencia de que los datos obtenidos en ensayos animales preclínicos tienen una aplicabilidad/transferibilidad limitada al caso humano. El uso de moléculas sustitutas requiere la construcción, producción, purificación y caracterización de una construcción de anticuerpo completamente nueva. Esto conduce a costes y tiempo de desarrollo adicionales necesarios para obtener esa molécula. En resumen, tienen

que desarrollarse sustitutos por separado además del fármaco real para usar en terapia humana, de modo que deben llevarse a cabo dos líneas de desarrollo para dos moléculas de anticuerpo monocatenario biespecífico. Por lo tanto, una ventaja importante de las construcciones basadas en anticuerpos biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies descritas en el presente documento es que la molécula idéntica puede usarse para productos terapéuticos en seres humanos y en ensayos animales preclínicos.

Por otro lado, tampoco es necesario ya adaptar el animal de ensayo al candidato farmacológico-anticuerpo biespecífico que se pretende usar para la administración a seres humanos, tal como por ejemplo la creación de animales transgénicos que producen las moléculas humanas a las que se une el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies según los usos y métodos de la invención pueden usarse directamente para ensayos preclínicos en primates distintos de chimpancé, sin ninguna manipulación genética de los animales. Como se conoce bien por los expertos en la materia, los enfoques en los que el animal de ensayo se adapta al candidato farmacológico siempre conllevan el riesgo de que los resultados obtenidos en el ensayo de seguridad preclínico sean menos representativos y predictivos para seres humanos debido a la modificación del animal. Por ejemplo, en animales transgénicos, las proteínas codificadas por los transgenes están con frecuencia sobreexpresadas. Por lo tanto, los datos obtenidos para la actividad biológica de un anticuerpo contra este antígeno proteico pueden tener valor predictivo limitado para seres humanos en los que la proteína se expresa a niveles mucho menores, más fisiológicos.

Una ventaja adicional de los usos del anticuerpo monocatenario biespecífico que muestra especificidad para diferentes especies de la invención está en evitar al chimpancé como una especie para ensayos animales. Los chimpancés son los parientes más cercanos a los seres humanos y se agruparon recientemente en la familia de los homínidos basándose en los datos de secuenciación genómica (Wildman *et al.*, PNAS 100 X 2003), 7181). Por lo tanto, se considera en general que los datos obtenidos de un chimpancé son altamente predictivos para seres humanos. Sin embargo, debido a su estatus como especie en peligro de extinción, el número de chimpancés que pueden usarse para experimentos médicos está altamente restringido. Como se ha indicado anteriormente, el mantenimiento de chimpancés para ensayos animales es por lo tanto tanto costoso como éticamente problemático. Los usos del anticuerpo monocatenario biespecífico de la invención evitan tanto la carga financiera como la objeción ética durante los ensayos preclínicos sin perjudicar a la calidad, es decir la aplicabilidad, de los datos de ensayos animales obtenidos. A la luz de esto, los usos de anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies y métodos de acuerdo con la invención para ensayos preclínicos en primates distintos de chimpancé posibilitan una alternativa razonable a los estudios en chimpancés.

Una ventaja adicional del anticuerpo monocatenario biespecífico de la invención es la capacidad de extraer múltiples muestras sanguíneas cuando se usa como parte de ensayos preclínicos animales, por ejemplo en el transcurso de estudios animales farmacocinéticos. Pueden obtenerse mucho más fácilmente múltiples extracciones sanguíneas con un primate distinto de chimpancé que con animales inferiores, por ejemplo un ratón. La extracción de múltiples muestras de sangre permite el ensayo continuo de parámetros sanguíneos para la determinación de los efectos biológicos inducidos por el anticuerpo monocatenario biespecífico de la invención. Además, la extracción de múltiples muestras sanguíneas permite al investigador evaluar el perfil farmacocinético del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento. Además, pueden medirse efectos secundarios potenciales que pueden inducirse por dicho anticuerpo monocatenario biespecífico reflejado en parámetros sanguíneos en diferentes muestras de sangre extraídas durante el transcurso de la administración de dicho anticuerpo. Esto permite la determinación del perfil de toxicidad potencial del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento.

Las ventajas de las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad para diferentes especies, usos de dichos anticuerpos biespecíficos y métodos de acuerdo con la invención pueden resumirse brevemente de la siguiente manera:

En primer lugar, el anticuerpo monocatenario biespecífico que muestra especificidad para diferentes especies usado en ensayos preclínicos es el mismo que el usado en terapia humana. Por lo tanto, ya no es necesario desarrollar dos moléculas independientes que pueden diferir en sus propiedades farmacocinéticas y actividad biológica. Esto es altamente ventajoso porque por ejemplo los resultados farmacocinéticos son más directamente transferibles y aplicables a la situación humana que, por ejemplo en enfoques de sustitutos convencionales.

En segundo lugar, los usos del anticuerpo biespecífico que muestra especificidad para diferentes especies y métodos de acuerdo con la invención para la preparación de productos terapéuticos en ser humano son menos costosos y laboriosos que los enfoques de sustitutos.

En tercer lugar, se evita al chimpancé como especie para ensayos animales.

En cuarto lugar, pueden extraerse múltiples muestras de sangre para estudios farmacocinéticos extensivos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo monocatenario biespecífico como se ha definido anteriormente para su uso en un método para determinar la actividad y/o eficacia biológica de dicho anticuerpo

biespecífico, en el que dicho anticuerpo monocatenario biespecífico se administrara a un primate distinto de chimpancé y se mide la actividad *in vivo*.

5 Preferentemente, dicha actividad *in vivo* es activación de linfocitos T, agotamiento de células diana tumorales, citotoxicidad, toxicidad, aparición de efectos secundarios adversos, y/o liberación de citocinas. Se exponen métodos para la determinación de dicha actividad *in vivo*, por ejemplo, en el documento WO 99/54440.

La presente invención en otro aspecto también posibilita una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente humano, que comprende un anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende

- 10 (i) un primer dominio de unión que se une con un CD3 de primate distinto de chimpancé, y
(ii) un segundo dominio de unión que se une con un antígeno de superficie celular,

15 en el que dicho primer dominio de unión se une con un epítipo de CD3 humano y de primate distinto de chimpancé, en el que el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos "FSEX" (SEQ ID NO. 204), en la que "X" representa L (leucina) o M (metionina), y en el que el CD3-épsilon de primate distinto de chimpancé comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 135 o 136.

20 De acuerdo con la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición para administración a un paciente, preferentemente un paciente humano. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende formulaciones adecuadas de vehículos, estabilizadores y/o excipientes. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una composición para administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal y/o intranasal o mediante inyección directa al tejido. Se prevé en particular que dicha composición se administre a un paciente mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La composición de la presente invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se conocen bien en la técnica ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, liposomas, etc.

25 Pueden formularse composiciones que comprenden dichos vehículos por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada que puede determinarse por ejemplo mediante estudios de cambio de escala de la dosis por administración de dosis crecientes del anticuerpo monocatenario biespecífico que muestra especificidad para diferentes especies descrito en el presente documento a primates distintos de chimpancé, por ejemplo macacos. Como se ha expuesto anteriormente, el anticuerpo monocatenario biespecífico que muestra especificidad para diferentes especies descrito en el presente documento puede usarse provechosamente en forma idéntica en ensayos preclínicos en primates distintos de chimpancé y como fármaco en seres humanos. Estas composiciones también pueden administrarse en combinación con otros fármacos proteicos y no proteicos. Estos fármacos pueden administrarse simultáneamente con la composición que comprende el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento o por separado

30 antes o después de la administración de dicho anticuerpo biespecífico en intervalos y dosis definidos temporalmente. El régimen de dosificación se determinará por el médico a cargo y los factores clínicos. Como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto especial para administrar, el sexo, el momento y vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Los vehículos líquidos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos.

35 Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de líquidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Además, la composición de la presente invención podría comprender vehículos proteicos, como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, preferentemente de origen humano. Se prevé que la composición de la invención podría comprender, además del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso pretendido de la composición. Dichos agentes podrían ser fármacos que actúen en el sistema gastrointestinal, fármacos que actúen como citostáticos, fármacos que eviten la hiperuricemia, fármacos que inhiban inmunorreacciones (por ejemplo corticosteroides), fármacos que modulen la respuesta inflamatoria, fármacos que actúen en el sistema circulatorio y/o agentes tales como citocinas conocidas en la técnica.

40 45 50 55 60

El primer dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento de la composición farmacéutica de la invención se une con un epítipo de CD3 humano y de primate distinto de chimpancé que comprende la secuencia de aminoácidos "FSE" como se define en las reivindicaciones. El epítipo mínimo comprende la secuencia de aminoácidos "FSEX" (SEQ ID NO. 202 y 204; en la que "X" corresponde a una leucina (L) o a una metionina (M)) o epítopos no adyacentes como se define en el presente documento son

65

preferentemente de 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 restos de aminoácidos de longitud. Preferentemente, dichos epítomos son de 13 restos de aminoácidos de longitud. Aún más preferentemente, el epítomo con el motivo "**FSEXE**" (SEQ ID NO. 202 y 204, en la que "X" corresponde a una leucina (L) o a una metionina (M)) comprende la secuencia de aminoácidos "EFSELEQSGYYVC" (SEQ ID NO. 195) de CD3 épsilon humano. En CD3 épsilon de cynomolgus, el epítomo correspondiente tiene la secuencia "EFSEMEQSGYYVC" (SEQ ID NO. 201). La sustitución de metionina por leucina es una sustitución de aminoácidos conservada entre dos restos de aminoácidos neutros, no polares. La secuencia correspondiente del epítomo preferido: "EFSEXEQSGYYVC" en la que X representa L (leucina) o M (metionina) se representa en SEQ ID NO. 207. Como se representa en los siguientes ejemplos, el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento no solamente se une con este epítomo, sino también con tramos de aminoácidos no adyacentes a dicho epítomo mínimo. Por ejemplo, el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento además del epítomo central mínimo puede unirse simultáneamente con un epítomo o epítomos de CD3 épsilon humano contenido en dicha cadena de CD3 épsilon. En consecuencia, dicho epítomo puede comprender adicionalmente la secuencia de aminoácidos "QYPGSEILWQHND" (SEQ ID NO. 203). Además pueden detectarse epítomos adicionales (u otros) de CD3 épsilon de cynomolgus contenidos en dicha cadena por la molécula de unión o molécula que comprende los dominios de unión como se define en la misma. Estas secuencias adicionales u otras pueden comprender la secuencia de aminoácidos "QDGNEEMGSITQT" (SEQ ID NO. 199) y "YYVSYPRGSNPED" (SEQ ID NO. 200).

Por lo tanto, el epítomo mínimo es más probablemente parte de un epítomo discontinuo o un epítomo conformacional. Como resulta evidente para un experto en la materia, el alcance de la presente invención incluye anticuerpos monocatenarios biespecíficos que no solamente se unen con este epítomo (central) mínimo, sino también con uno, dos o incluso más tramos de secuencias de aminoácidos no adyacentes dentro de CD3 (preferentemente CD3 épsilon). Basándose en los resultados mostrados en los siguientes ejemplos se concluye que los anticuerpos específicos para diferentes especies anti-CD3 entran en contacto con CD3 épsilon en el área de los restos de aminoácidos 57-61 de CD3 épsilon tanto de cynomolgus como humano que comprenden los tramos de aminoácidos **FSEME** (SEQ ID NO. 206) y **FSELE** (SEQ ID NO. 205) de CD3 épsilon de cynomolgus y humano, respectivamente, formando el motivo **FSE** el centro del epítomo. Este resultado, aunque es plausible debido a la accesibilidad del bucle E-F (aminoácidos 56-62) de CD3 épsilon humano (Kjer-Nielsen *et al.*, PNAS 101 (2004), p. 7675-80) que comprende los aminoácidos FSELE (SEQ ID NO. 205) o FSEME (SEQ ID NO. 206), es sorprendente, ya que no hay ningún solapamiento de este epítomo de nueva definición con el epítomo conocido de la cadena de CD3 épsilon de anticuerpos anti-CD3 OKT-3 y UCHT-1 (Kjer-Nielsen *et al.*, en el lugar citado; Arnett *et al.*, PNAS 101 (2004), p. 16268-73) que se han considerado hasta la fecha representativos de todos los anticuerpos anti-CD3 que se creía que formaban una única familia con el mismo epítomo o uno muy similar. En resumen, los epítomos "**FSE**" y "**FSEXE**" (SEQ ID NO. 204) son distintos de los epítomos reconocidos por UCHT-1 u OKT-3 (Kjer-Nielsen *et al.*, PNAS 101 (2004), p. 7675-80; Arnett *et al.*, PNAS 101 (2004), p. 16268-73) y son únicos de anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies que se unen con CD3 humano y de macaco. Preferentemente, el epítomo mínimo comprende la secuencia de aminoácidos "**FSEXE**" (SEQ ID NO. 204), en la que X representa L (leucina) o M (metionina) y significa una sustitución de restos de aminoácidos neutros, no polares.

Se prevé que en la composición farmacéutica de la invención, dicho primer dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico de la composición farmacéutica de la invención se localiza en dirección C terminal del segundo dominio de unión. Sin embargo, también es parte de la presente invención una construcción biespecífica, en la que el "primer dominio de unión para un CD3 de primate distinto de chimpancé" se localiza en dirección N terminal del "segundo dominio de unión para un antígeno de superficie celular" definido en el presente documento.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, las ventajas como se ha descrito anteriormente en el presente documento son realizables no solamente cuando el primer dominio de unión (que se une a CD3) se localiza en dirección C terminal del segundo dominio de unión, es decir, más cerca del extremo C terminal del anticuerpo monocatenario biespecífico que el segundo dominio de unión, sino también cuando el primer dominio de unión (que se une a CD3) se localiza en dirección N terminal del segundo dominio de unión, es decir más cerca del extremo N terminal del anticuerpo monocatenario biespecífico que el segundo dominio de unión. La disposición de los dominios de unión en el anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento puede por lo tanto ser una en la que el primer dominio de unión se localiza en dirección C terminal del segundo dominio de unión. La disposición de las cadenas V puede ser VH(antígeno de superficie celular)-VL(antígeno de superficie celular)-VL(CD3)-VH(CD3), VH(antígeno de superficie celular)-VL(antígeno de superficie celular)-VH(CD3)-VL(CD3), VL(antígeno de superficie celular)-VH(antígeno de superficie celular)-VL(CD3)-VH(CD3) o VL(antígeno de superficie celular)-VH(antígeno de superficie celular)-VH(CD3)-VL(CD3). Para una disposición en la que el primer dominio de unión se localiza en dirección N terminal del segundo dominio de unión, son posibles los siguientes órdenes: VH(CD3)-VL(CD3)-VL(antígeno de superficie celular)-VH(antígeno de superficie celular), VH(CD3)-VL(CD3)-VH(antígeno de superficie celular) -VL(antígeno de superficie celular), VL(CD3)-VH(CD3)-VL(antígeno de superficie celular) -VH(antígeno de superficie celular) o VL(CD3)-VH(CD3)-VH(antígeno de superficie celular)-VL(antígeno de superficie celular). Como se usa en el presente documento, "en dirección N terminal de" o "en dirección C terminal de" y variantes gramaticales de las mismas indican la localización relativa dentro de la secuencia de aminoácidos primaria en lugar de la colocación en el extremo N o C absoluto del anticuerpo monocatenario biespecífico. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, un primer dominio de unión que se "localiza en dirección C terminal del segundo

dominio de unión" simplemente indica que el primer dominio de unión se localiza 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 un marcador His, u otro compuesto proteico o no proteico tal como un radioisótopo, se localice en el extremo C terminal último del anticuerpo monocatenario biespecífico.

5 En otra realización preferida de la composición farmacéutica, el segundo dominio de unión se une con un antígeno de superficie celular y con el homólogo de primate distinto de chimpancé de dicho antígeno de superficie celular.

10 De acuerdo con esta realización de la invención, tanto el primer como el segundo dominios de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico descritos en el presente documento se unen específicamente con variantes tanto humana como de primate distinto de chimpancé de dichas primera y segunda moléculas, respectivamente. A la luz de las declaraciones anteriores, esto es particularmente ventajoso ya que existe suficiente especificidad (para diferentes especies) en ambos lados del anticuerpo monocatenario biespecífico, asegurando por lo tanto la compatibilidad entre especies con respecto tanto a la primera como a la segunda moléculas y por lo tanto capacidad de extrapolación óptima de los datos obtenidos en estudios animales preclínicos al caso de administración en seres humanos.

20 Preferentemente, dicho antígeno de superficie celular es un antígeno tumoral. Aún más preferentemente, dicho antígeno es EpCAM (Naundorf, Int. J. Cancer 100/1 (2002), 101-110), EGFR (Liu, Br. J. Cancer 82/12 (2000), 1991-1999; Bonner, Semin. Radiat. Oncol. 12 (2002), 11-20; Kiyota, Oncology 63/1 (2002), 92-98; Kuan, Brain Tumor Pathol. 17/2 (2000), 71-78), EGFRvIII (Kuan, Brain Tumor Pathol. 17/2 (2000), 71-78), o carboanhidrasa IX (MN/CA IX) (Uemura, Br. J. Cancer 81/4 (1999), 741-746; Longcaster, Cancer Res. 61/17 (2001), 6394- 6399; Chia, J. Clin. Oncol. 19/16 (2001), 3660-3668; Beasley, Cancer Res. 61/13 (2001), 5262-5267).

25 Se prefiere particularmente como antígeno de superficie celular y/o antígeno tumoral EpCAM. Como se representa en los siguientes ejemplos, la presente solicitud proporciona por primera vez las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos del dominio extracelular de EpCAM de cynomolgus mostradas en SEQ ID NO. 47 y 48, respectivamente. Dichas secuencias son herramientas esenciales para la generación y caracterización de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en el presente documento que muestran especificidad para diferentes especies para EpCAM humano y de cynomolgus.

30 En una realización preferida adicional de la composición farmacéutica de la invención, el primer dominio de unión comprende una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO. 2, 110 o 6. Se prevé y se prefiere que la región VH del primer dominio de unión comprenda al menos un tercera CDR (CDR-H3) que comprenda una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 112 o CDR-H3* que comprenda una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 113. El primer dominio de unión puede comprender adicionalmente una segunda CDR (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 114. Además, el primer dominio de unión puede además comprender una primera CDR (CDR-H1) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 115. La región VH del primer dominio de unión puede comprender por lo tanto una, dos o las tres de las CDR mencionadas. Las CDR mencionadas se incluyen por ejemplo en las regiones VH mostradas en SEQ ID NO. 2 y 110.

45 Como alternativa, se prevé que la región VH del primer dominio de unión comprenda una tercera CDR (CDR-H3) que comprenda una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 119. Preferentemente, el primer dominio de unión comprende adicionalmente una segunda CDR (CDR-H2) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 120. De forma especialmente preferente, el primer dominio de unión comprende adicionalmente una primera CDR (CDR-H1) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 121. La región VH del primer dominio de unión puede comprender por lo tanto una, dos o las tres CDR mencionadas. Las CDR anteriormente indicadas se incluyen por ejemplo en la región VH mostrada en SEQ ID NO. 6.

50 En otra realización preferida de la composición farmacéutica, el primer dominio de unión comprende una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO. 4, 148, 168 u 8. Se prevé y se prefiere que la región VL del primer dominio de unión comprenda al menos una tercera CDR (CDR-L3) que comprenda una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 116. La región VL puede comprender además una segunda CDR (CDR-L2) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 117. Además, la región VL puede comprender además una primera CDR (CDR-L1) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 118. La región VL del primer dominio de unión puede comprender por lo tanto una, dos o las tres de las CDR mencionadas. Las CDR anteriormente indicadas se incluyen por ejemplo en las regiones VL mostradas en SEQ ID NO. 4, 148 y 168.

60 Como alternativa, se prevé que la región VL del primer dominio de unión comprenda una tercera CDR (CDR-L3) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 164. Preferentemente, el primer dominio de unión comprende adicionalmente una segunda CDR (CDR-L2) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 165. Se prefiere especialmente que el primer dominio de unión comprenda adicionalmente una primera CDR (CDR-L1) que comprenda una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ

ID NO. 166. La región VL del primer dominio de unión puede comprender por lo tanto una, dos o las tres de las CDR mencionadas. Las CDR anteriormente indicadas se incluyen por ejemplo en la región VL mostrada en SEQ ID NO. 8.

Preferentemente, el primer dominio de unión comprende CDR-L1 (SEQ ID NO. 118), CDR-L2 (SEQ ID NO. 117) y CDR-L3 (SEQ ID NO. 116) y CDR-H1 (SEQ ID NO. 115), CDR-H2 (SEQ ID NO. 114) y CDR-H3 (SEQ ID NO. 112) o CDR-H3* que comprende la secuencia de aminoácidos "VSWFAY" (SEQ ID NO. 113).

Como alternativa, el primer dominio de unión comprende CDR-L1 (SEQ ID NO. 166), CDR-L2 (SEQ ID NO. 165) y CDR-L3 (SEQ ID NO. 164) y CDR-H1 (SEQ ID NO. 121), CDR-H2 (SEQ ID NO. 120) y CDR H3 (SEQ ID NO. 119).

Aún más preferentemente, la región VH del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 2 y la región VL del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 4; o la región VH del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 110 y la región VL del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 148; o la región VH del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 110 y la región VL del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 168, o la región VH del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 6 y la región VL del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 8. Como alternativa la región VH del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 2 y la región VL el primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 148. Como alternativa la región VH del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 110 y la región VL del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 4. Como alternativa la región VH del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 2 y la región VL del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 168.

Como se ha expuesto anteriormente, el orden de las regiones variables del primer dominio de unión puede ser VH-VL o VL-VH. Ambas disposiciones están dentro del alcance de la invención. Para un primer dominio de unión que comprende el VH de SEQ ID NO. 2 y el VL de SEQ ID NO. 4, la disposición VH-VL se muestra en SEQ ID NO. 9 y 10, mientras que la disposición VL-VH se representa en SEQ ID NO. 11 y 12.

Para un primer dominio de unión que comprende el VH de SEQ ID NO. 110 y el VL de SEQ ID NO. 148, la disposición VH-VL se muestra en SEQ ID NO. 146 y 147. Para un primer dominio de unión que comprende el VH de SEQ ID NO. 110 y el VL de SEQ ID NO. 168, la disposición VH-VL se muestra en SEQ ID NO. 169 y 170, mientras que la disposición VL-VH se representa en SEQ ID NO. 193 y 194. Para un primer dominio de unión que comprende el VH de SEQ ID NO. 6 y el VL de SEQ ID NO. 8, la disposición VH-VL se muestra en SEQ ID NO. 13 y 14, mientras que la disposición VL-VH se representa en SEQ ID NO. 15 y 16.

De forma similar, el orden de las regiones variables del segundo dominio de unión puede ser VH-VL o VL-VH. Ambas disposiciones están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, la disposición VH-VL de un segundo dominio de unión que muestra especificidad para diferentes especies para EpCAM humana y de cynomolgus se muestra en SEQ ID NO. 53 y 54, mientras que la disposición VL-VH se representa en SEQ ID NO. 55 y 56.

En una realización particularmente preferida de la composición farmacéutica de la invención, el anticuerpo monocatenario biespecifico como se define en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de SEQ ID NO. 38, 40, 124, 42 o 44;
- (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO. 37, 39, 125, 41 o 43; y
- (c) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que está degradada como resultado del código genético a una secuencia de nucleótidos de (b).

En la realización anteriormente indicada preferida, solamente el primer dominio de unión (que se une a CD3) muestra especificidad para diferentes especies.

Más preferentemente, el anticuerpo monocatenario biespecifico como se define en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de SEQ ID NO. 66, 68, 74, 76, 122, 70, 72, 78, 80, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190 o 192;
- (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO. 65, 67, 73, 75, 123, 69, 71, 77, 79, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189 o 191; y
- (c) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que está degradada como

resultado del código genético a una secuencia de nucleótidos de (b).

En esta realización anteriormente indicada, tanto el primer como el segundo dominios de unión muestran especificidad para diferentes especies.

5 En otra realización preferida de la composición farmacéutica, el primate distinto de chimpancé es un babuino, títí o un mono del viejo mundo.

10 En una realización aún más preferida de la composición farmacéutica, el mono del viejo mundo es un mono del género macaco.

Más preferentemente, el mono del género macaco es macaco de Assam (*Macaca assamensis*), macaco de Gibraltar (*Macaca sylvanus*), macaco coronado (*Macaca radiata*), macaco crestado de Célebes (*Macaca ochreata*), macaco negro crestado (*Macaca nigra*), macaco de Formosa (*Macaca cyclopsis*), macaco japonés (*Macaca fuscata*), mono cynomolgus o macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*), macaco de cola de león (*Macaca silenus*), macaco cola de cerdo sureño (*Macaca nemestrina*), macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), macaco tibetano (*Macaca thibetana*), macaco de Togian (*Macaca tonkeana*), macaco de Sri Lanka (*Macaca sinica*), macaco rabón (*Macaca arctoides*) o macaco moro (*Macaca maurus*).

20 Preferentemente, el CD3 de primate distinto de chimpancé comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 135, 136, 144 y 145.

De acuerdo con una realización adicional de la composición farmacéutica de la invención, al menos uno de dichos primer o segundo dominios de unión es humano, humanizado, con injertos de CDR y/o desinmunizado.

25 Debe entenderse que el término anticuerpo "humano" como se usa en el presente documento significa que el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento, comprende una secuencia o secuencias de aminoácidos contenidas en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana. Para los fines de definición del presente documento, dicho anticuerpo monocatenario biespecífico puede considerarse por tanto humano si consiste en dicha o dichas secuencias de aminoácidos de línea germinal humana, es decir si la secuencia o las secuencias de aminoácidos del anticuerpo monocatenario biespecífico en cuestión son idénticas a una secuencia o secuencias de aminoácido de línea germinal humana expresadas. Un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento también puede considerarse humano si consiste en una secuencia o secuencias que se desvían de su secuencia o sus secuencias de línea germinal humana más cercanas en no más de lo que se esperaría debido a la impronta 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 VH que podría esperarse que existieran también en el repertorio de anticuerpos humanos expresados. Cualquiera de dichas secuencias de origen humano o no humano que puede esperarse que exista en el repertorio humano expresado también se consideraría "humana" para los fines de la presente invención.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "humanizado", "humanización", "de tipo humano" o variantes gramaticalmente relacionadas con las mismas se usan indistintamente para hacer referencia a un anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende en al menos uno de sus dominios de unión al menos una región determinante de complementariedad ("CDR") de un anticuerpo no humano o fragmento del mismo. Se describen enfoques de humanización por ejemplo en los documentos WO 91/09968 y US 6.407.213. Como ejemplos no limitantes, la expresión abarca 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 de las regiones variables comprenden en cada uno de sus primera, segunda y tercera CDR respectivas las CDR de dicho animal no humano. En el caso de que todas las CDR de un dominio de unión del anticuerpo monocatenario biespecífico se hayan reemplazado por sus equivalentes correspondientes de, por ejemplo, un roedor, típicamente se habla de "injertos de CDR", y debe entenderse que esta expresión está abarcada por el término "humanizado" o variantes gramaticalmente relacionadas de la misma como se usa en el presente documento. El término "humanizado" o variantes gramaticalmente relacionadas del mismo también abarca casos en los que, además del reemplazo de una o más regiones CDR dentro de un VH y/o VL del primer y/o segundo dominio de unión se han efectuado una mutación o mutaciones adicionales (por ejemplo, sustituciones) de al menos un resto o restos de aminoácidos individuales dentro de las regiones marco conservadas ("FR") entre las CDR de modo que los aminoácidos en esa o esas posiciones correspondan al aminoácido o los aminoácidos en esa o esas posiciones en el animal del que derivan las regiones CDR usadas para el reemplazo. Como se conoce en la técnica, dichas mutaciones individuales se realizan con frecuencia en las regiones marco conservadas después de injerto de CDR para restaurar la afinidad de unión original del anticuerpo no humano usado como un donante de CDR para su molécula diana. El término "humanizado" puede abarcar además una sustitución o sustituciones de aminoácidos en las regiones CDR de un animal no humano al aminoácido o los aminoácidos de una región CDR correspondiente de un anticuerpo humano, además de las sustituciones de aminoácidos en las regiones marco conservadas como se ha descrito anteriormente.

65 Como se usa en el presente documento, el término "desinmunizado", "desinmunización" o variantes gramaticalmente

relacionadas con los mismos indica modificación del primer y/o segundo dominio de unión frente a una construcción de tipo silvestre original haciendo dicha construcción de tipo silvestre no inmunogénica o menos inmunogénica en seres humanos. Se muestran enfoques de desinmunización 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 propensión reducida a generar epítomos de linfocitos T. De acuerdo con la presente invención, la expresión "propensión reducida a generar epítomos de linfocitos T" se refiere a la retirada de epítomos de linfocitos T que conduce a activación de linfocitos T específica. Además, "propensión reducida a generar epítomos de linfocitos T" significa sustitución de aminoácidos que contribuyen a la formación de epítomos de linfocitos T, es decir, la sustitución de aminoácidos que son esenciales para la formación de un epítomo de linfocitos T. En otras palabras, "propensión reducida a generar epítomos de linfocitos T" se refiere a inmunogenicidad reducida o capacidad reducida de inducir proliferación de linfocitos T independiente de antígeno. La expresión "epítomo de linfocitos T" se refiere a secuencias peptídicas cortas que pueden liberarse durante la degradación de péptidos, polipéptidos o proteínas dentro de células y posteriormente presentarse por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para desencadenar la activación de linfocitos T; véase entre otros el documento WO 02/066514. Para péptidos presentados por MHC de clase II dicha activación de linfocitos T puede dar lugar después a una respuesta de anticuerpos por estimulación directa de linfocitos T para producir dichos anticuerpos. "Propensión reducida a generar epítomos de linfocitos T" y/o "desinmunización" pueden medirse por técnicas conocidas en este campo. Preferentemente, la desinmunización de proteínas puede ensayarse *in vitro* mediante ensayo de proliferación de linfocitos T. En este ensayo se exploran PBMC de donantes que representan > 80 % de alelos de HLA-DR en el mundo con respecto a proliferación en respuesta a péptidos de tipo silvestre o desinmunizados. Idealmente la proliferación celular se detecta solamente tras la carga de las células presentadoras de antígenos con péptidos de tipo silvestre. Como alternativa, se puede ensayar la desinmunización expresando tetrámeros de HLA-DR que representan todos los haplotipos. Estos tetrámeros pueden ensayarse con respecto a unión a péptidos o cargarse con péptidos que sustituyen células presentadoras de antígenos en ensayos de proliferación. Para ensayar si se presentan péptidos desinmunizados en haplotipos de HLA-DR, puede medirse la unión de, por ejemplo, péptidos marcados con fluorescencia en PBMC. Además, la desinmunización puede demostrarse determinando si se han formado anticuerpos contra las moléculas desinmunizadas después de la administración en pacientes. Preferentemente, se desinmunizan moléculas derivadas de anticuerpos en las regiones marco conservadas y la mayoría de las regiones CDR no se modifican para generar propensión reducida a inducir epítomos de linfocitos T de modo que la afinidad de unión de las regiones CDR no se ve afectada. Incluso la eliminación de un epítomo de linfocitos T da como resultado inmunogenicidad reducida.

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.

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

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un hospedador transformado o transfectado con un vector definido anteriormente.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente en el presente documento, que comprende además un compuesto proteico capaz de proporcionar una señal de activación para las células efectoras inmunitarias.

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

En otro aspecto, la invención se refiere a un proceso para la producción de una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente, comprendiendo dicho proceso cultivar un hospedador como se ha definido anteriormente en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se ha definido anteriormente en el presente documento y recuperar el anticuerpo monocatenario biespecífico producido a partir del cultivo.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un uso de un anticuerpo monocatenario biespecífico como se ha definido anteriormente en el presente documento o como se produce por el proceso como se ha definido anteriormente en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente en el presente documento, un vector como se ha definido anteriormente en el presente documento o un hospedador como se ha definido anteriormente en el presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, el tratamiento o el alivio de una enfermedad. Otro aspecto de la invención se refiere a una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención o como se produce de acuerdo con el proceso expuesto anteriormente para uso en un método para la prevención, el tratamiento o el alivio de una enfermedad en un sujeto que lo necesite.

Preferentemente, dicha enfermedad es una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral o un trastorno inmunológico. Aún más preferentemente, dicha enfermedad tumoral es una enfermedad maligna, preferentemente cáncer. Pueden usarse anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies como se define en el presente documento con especificidad para EpCAM, EGFR o EGFRvIII para la terapia de cánceres epiteliales y tumores. Pueden usarse construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies como se define en el presente documento con especificidad para CAIX para el tratamiento de tumores con regiones o áreas hipóxicas. Además, dichas construcciones de CAIX pueden usarse para el tratamiento de carcinomas renales o del cuello uterino. En otra realización preferida de los usos o métodos de la invención, dicha composición farmacéutica como se ha definido anteriormente en el presente documento es adecuada para administrarse en combinación con un fármaco adicional, es decir, como parte de una coterapia. En dicha coterapia, un agente activo puede incluirse opcionalmente en la misma composición farmacéutica que el anticuerpo monocatenario biespecífico, o puede incluirse en una composición farmacéutica separada. En este último caso, dicha composición farmacéutica separada es adecuada para administración antes de, simultáneamente con o después de la administración de dicha composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monocatenario biespecífico. El fármaco o la composición farmacéutica adicional pueden ser un compuesto no proteico o un compuesto proteico. En el caso de que el fármaco adicional sea un compuesto proteico, es ventajoso que el compuesto proteico sea capaz de proporcionar una señal de activación para las células efectoras inmunitarias.

Preferentemente, dicho compuesto proteico o compuesto no proteico puede administrarse simultáneamente o no simultáneamente con un anticuerpo monocatenario biespecífico como se ha definido anteriormente en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente en el presente documento, un vector como se ha definido anteriormente en el presente documento o un hospedador como se ha definido anteriormente en el presente documento. Preferentemente, dicho sujeto para tratar es un ser humano.

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

Estas y otras realizaciones se desvelan y están abarcadas por la descripción y ejemplos de la presente invención. Se describen técnicas y métodos recombinantes en inmunología por ejemplo en Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3^a 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. Puede recuperarse bibliografía adicional con respecto a uno cualquiera de los anticuerpos, métodos, usos y compuestos para emplear de acuerdo con la presente invención de bibliotecas públicas y bases de datos, usando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública "Medline", disponible en internet, por ejemplo en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Los expertos en la materia conocen bases de datos y direcciones adicionales, tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobioaen.fr/>, <http://www.fmi.ch/bioloqv/researchtools.html>, <http://www.tiqr.orq/> y también pueden obtenerse usando, por ejemplo, <http://www.lvcos.com>.

Las figuras muestran:

Figura 1: Identificación de anticuerpos específicos para diferentes especies de CD3 de macaco: se ensayó especificidad para diferentes especies de un anticuerpo anti-CD3 mostrado en SEQ ID NO. 162 descrita en el documento WO 99/54440, OKT-3, una Ig que comprende SEQ ID NO. 6 y 8, una Ig que comprende SEQ ID NO. 2 y 4 y UCHT-1 para CD3 de macaco (*cynomolgus*) con citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 1. Una inmunoglobulina (Ig) que comprende SEQ ID NO. 6 y 8 y una Ig que comprende SEQ ID NO. 2 y 4 muestran especificidad para diferentes especies para CD3 de macaco. Por el contrario, el anticuerpo anti-CD3 mostrado en SEQ ID NO. 162, OKT-3 y UCHT-1 no consiguen unirse con CD3 de macaco.

Figura 2: Ensayo de FACS para unión de una Ig que comprende SEQ ID NO. 2 y 4, una Ig que comprende SEQ ID NO. 6 y 8 y anticuerpo monoclonal (mAb) FN-18 para células HPB-ALL y PBMC de *Macaca fascicularis* (*cynomolgus*). Las células HPB-ALL expresan el complejo de CD3 humano. Se muestran células teñidas con los anticuerpos respectivos en comparación con células no teñidas. Se detectó unión a antígeno fuerte en células humanas, así como de *cynomolgus* para la Ig que comprende SEQ ID NO. 2 y 4. Para la Ig que comprende SEQ ID NO. 6 y 8, se observó unión fuerte con células humanas pero unión más débil con células de *cynomolgus*. Para FN-18, se pudo observar unión fuerte con células de *cynomolgus*, mientras que no pudo detectarse unión con células humanas.

Figura 3: Ensayo de FACS para unión de 5-10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10, 5-10LHxSEQ ID NO. 16 y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 con células Kato III humanas que expresan EpCAM o células CHO transfectadas con EpCAM humana y con células HPB-ALL. Se muestran células unidas con las construcciones respectivas (representadas como curvas no rellenas) en comparación con células incubadas solamente con los anticuerpos de detección (representados como curvas rellenas). La unión a antígeno de todas las construcciones biespecíficas fue

claramente detectable para la especificidad anti EpCAM humana, así como para las especificidades anti CD3 en la línea celular HPB-ALL positiva para CD3 humano.

Figura 4: Ensayo de citotoxicidad para 5 10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10 y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 con células Kato III humanas como células diana y PBMC humanas como células efectoras. Todas las construcciones mostraron actividad citotóxica.

Figura 5: Ensayo de citotoxicidad para 5 10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10 y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 con células Kato III como células diana y PBMC de cynomolgus como células efectoras. 5-10LHxSEQ ID NO. 14, 5-10LHxSEQ ID NO. 12 y 5-10LHxSEQ ID NO. 10 mostraron actividad citotóxica. 5-10LHxdi-anti CD3 (anticuerpo anti-CD3 desinmunizado mostrado en SEQ ID NO. 163) que no consigue unirse con CD3 de cynomolgus se usó como control negativo.

Figura 6: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la parte extracelular del antígeno EpCAM de cynomolgus (también mostrado en SEQ ID NO. 48) y el antígeno EpCAM humano.

Figura 7: Ensayo de FACS para la detección del antígeno EpCAM de cynomolgus en células CHO transfectadas. Se ensayaron sobrenadantes de tres hibridomas anti EpCAM humana diferentes (M79, 3B10, 2G8) con respecto a unión. Los transfectantes (representados como curvas no rellenas) en comparación con células no transfectadas (representadas como curvas rellenas) mostraron unión solamente con el sobrenadante del hibridoma 2G8 que se reconoce por lo tanto como anticuerpo específico para diferentes especies para EpCAM humana y de cynomolgus.

Figura 8: Ensayo de FACS para unión de 2G8LHxSEQ ID NO. 12, 2G8LHxSEQ ID NO. 10, 2G8LHxSEQ ID NO. 16, 2G8LHxSEQ ID NO. 14, 2G8HLxSEQ ID NO. 12, 2G8HLxSEQ ID NO. 10, 2G8HLxSEQ ID NO. 16 y 2G8HLxSEQ ID NO. 14 en células Kato III (Fig. 8A) o células CHO transfectadas con EpCAM de cynomolgus (Fig. 8B) y células HPB-ALL. Fue claramente detectable unión a antígeno para las especificidades anti EpCAM así como para las especificidades anti CD3. Como control negativo para unión con EpCAM de cynomolgus, se incluyó la construcción 5-10LHxSEQ ID NO. 10 que muestra unión con CD3 humano (en células HPB-ALL) pero no muestra unión con EpCAM de cynomolgus (células CHO transfectadas con EpCAM de cynomolgus).

Figura 9: Ensayo de citotoxicidad para 2G8LHxSEQ ID NO. 10 y 2G8HLxSEQ ID NO. 12 con células CHO transfectadas con EpCAM de cynomolgus como células diana y PBMC humanas como células efectoras. 2G8LHxSEQ ID NO. 10 y 2G8HLxSEQ ID NO. 12 mostraron actividad citotóxica. Se incluyó 5-10LHxdi-anti CD3 (anticuerpo anti-CD3 desinmunizado mostrado en SEQ ID NO. 163) como control negativo. 5-10LH no consigue unirse con EpCAM de cynomolgus.

Figura 10: Ensayo de citotoxicidad para 2G8LHxSEQ ID NO. 10 y 2G8HLxSEQ ID NO. 12 con células CHO transfectadas con EpCAM de cynomolgus como células diana y PBMC de cynomolgus como células efectoras. 2G8LHxSEQ ID NO. 10 y 2G8HLxSEQ ID NO. 12 mostraron actividad citotóxica. 5-10LHxdi-anti CD3 (anticuerpo anti-CD3 desinmunizado mostrado en SEQ ID NO. 163) se incluyó como control negativo. Esta construcción no consigue unirse con CD3 de cynomolgus y EpCAM de cynomolgus.

Figura 11: Comparación de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 y segmento VH humano (hu) 3-73.

Figura 12: Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de una región VH de tipo humano específica para diferentes especies (también mostrada en SEQ ID NO. 110 y 111, respectivamente).

Figura 13: Análisis de FACS de un scFv que comprende la cadena VH de tipo humano mostrada en SEQ ID NO. 110 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 148. La secuencia de aminoácidos de scFv completa se muestra en SEQ ID NO. 146. El scFv de control de SEQ ID NO. 10 muestra un claro desplazamiento en células HPB-ALL positivas para CD3 humano y por lo tanto se une con CD3 humano. El scFv representado en SEQ ID NO. 146 también muestra unión clara con dichas células humanas positivas para CD3.

Figura 14: Análisis de unión del scFv de SEQ ID NO. 146. El scFv de control de SEQ ID NO. 10 muestra un claro desplazamiento en linfocitos T positivos para CD3 de cynomolgus y por tanto se une con células positivas para CD3 de cynomolgus. Además el scFv de SEQ ID NO. 146 muestra clara unión con células positivas para CD3 de cynomolgus.

Figura 15: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de CD3 épsilon humano y de cynomolgus.

Figura 16: Secuencias de aminoácidos de los péptidos de 13 unidades derivados de CD3 épsilon de cynomolgus (43 puntos peptídicos).

Figura 17: Secuencias de aminoácidos de los péptidos de 13 unidades derivados de CD3 épsilon humano (47 puntos peptídicos).

Figura 18: Pepsots desarrollados por quimioluminiscencia potenciada. (A) Pepsot de control con IgG de cabra

antirratón conjugada con peroxidasa de rábano rusticano. (B) Pepsplot con anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies I correspondiente a una inmunoglobulina (Ig) que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 2 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 4.

5 **Figura 19:** Pepsplot con anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies II correspondiente a una inmunoglobulina (Ig) que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 6 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 8.

10 **Figura 20:** Restos de contacto de OKT-3 y UCHT-1 y epítipo de bucle E-F de anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies I y II a los que se ha hecho referencia en las Fig. 18 y 19, respectivamente, en CD3 épsilon de cynomolgus y humano.

15 **Figura 21:** Comparación de secuencias de aminoácidos del VL murino mostrado en SEQ ID NO. 4 con el segmento lambda 7a de línea germinal humana.

Figura 22: Unión del scFv murino mostrado en SEQ ID NO. 10 y el scFv de tipo humano mostrado en SEQ ID NO. 170 con células HPB-ALL CD3 positivas humanas.

20 **Figura 23:** Panel superior: Unión igual del scFv murino mostrado en SEQ ID NO. 10 y el scFv de tipo humano mostrado en SEQ ID NO. 170 con linfocitos T humanos y de cynomolgus en PBMC. Panel inferior: cuando se preincuba con 10 µg/ml del anticuerpo IgG murino mAb I descrito en el Ejemplo 1 que tiene la misma especificidad de unión que los scFv (es decir, para CD3 épsilon), los desplazamientos de células teñidas con el scFv murino anteriormente mencionado o el scFv de tipo humano se reducen significativamente, subrayando la región de unión similar de los scFv y el anticuerpo murino original mAb I.

25 **Figura 24:** Pepsplots desarrollados por el sistema de detección de fosfatasa alcalina. (A) Pepsplot de control con IgG de cabra antirratón conjugado con fosfatasa alcalina. (B) Pepsplot con anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies que comprende el VH de tipo humano mostrado en SEQ ID NO. 110 y el VL de tipo humano mostrado en SEQ ID NO. 168 como se describe en el Ejemplo 18.

30 **Figura 25:** ensayo de transferencia puntual con el anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies que comprende el VH de tipo humano de SEQ ID NO. 110 y el VL de tipo humano de SEQ ID NO. 168 como se describe en el Ejemplo 19 (A) y el anticuerpo IgG 1 murino anti-CD3 UCHT1 (B) que se une con los péptidos transferidos "biotina-enlazador-EFSELEQSGYYVC" (1) y "EFSELEQSGYYVC-biotina" (2) derivados de CD3 épsilon humano.

35 **Figura 26:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies CAIX HL x SEQ ID NO. 194 para células HPB-ALL (CD3+ humanas) PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A549 (CAIX+ humanas) y CYNOM-K1 (CAIX+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con proteína monomérica purificada 1 µg/ml que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

40 **Figura 27:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies CAIX HL x SEQ ID NO. 170 para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A549 (CAIX+ humanas) y 4MBr-5 (CAIX+ de macaco), respectivamente. La adición de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubó posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

45 **Figura 28:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies CAIX LH x SEQ ID NO. 170 para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A549 (CAIX+ humanas) y 4MBr-5 (CAIX+ de macaco), respectivamente. La adición de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

50 **Figura 29:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies EGFR LH x SEQ ID NO. 170 para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A431 (EGFR+ humanas) y CHO, transfectadas con EGFR de cynomolgus (EGFR+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

5 **Figura 30:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies EGFR LH x SEQ ID NO. 170 para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A431 (EGFR+ humanas) y CHO, transfectadas con EGFR de cynomolgus (EGFR+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

10 **Figura 31:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies EGFR HL x SEQ ID NO. 194 para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A431 (EGFR+ humanas) y CHO, transfectadas con EGFR de cynomolgus (EGFR+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

20 **Figura 32:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies EGFR LH x SEQ ID NO. 194 para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A431 (EGFR+ humanas) y CHO, transfectadas con EGFR de cynomolgus (EGFR+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

25 **Figura 33:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies SEQ ID NO. 170 x EGFR HL para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A431 (EGFR+ humanas) y CHO, transfectadas con EGFR de cynomolgus (EGFR+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

30 **Figura 34:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies SEQ ID NO. 170 x EGFR LH para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A431 (EGFR+ humanas) y CHO, transfectadas con EGFR de cynomolgus (EGFR+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

35 **Figura 35:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies SEQ ID NO. 194 x EGFR HL para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A431 (EGFR+ humanas) y CHO, transfectadas con EGFR de cynomolgus (EGFR+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

40 **Figura 36:** análisis de unión de FACS de construcción monocatenaria biespecífica específica para diferentes especies SEQ ID NO. 194 x EGFR LH para células HPB-ALL (CD3+ humanas), PBMC de cynomolgus (CD3+ de cynomolgus), A431 (EGFR+ humanas) y CHO, transfectadas con EGFR de cynomolgus (EGFR+ de cynomolgus), respectivamente. La tinción de FACS se realizó como se describe en el Ejemplo 23. La línea gruesa representa células incubadas con 1 µg/ml de proteína monomérica purificada que se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección marcado con PE. La línea de histograma fina refleja el control negativo: células solamente incubadas con el anticuerpo anti-his y el anticuerpo de detección.

45 **Figura 37:** actividad citotóxica inducida por construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico específico para diferentes especies de CD3 y CAIX redirigidas a líneas celulares diana indicadas. Se usaron linfocitos T positivos para CD8 estimulados de origen humano y de cynomolgus como células efectoras, respectivamente. El ensayo se realizó como se describe en los ejemplos 24 y 25. En el panel izquierdo de la Figura 37, se ha usado un anticuerpo monocatenario biespecífico con un dominio variable reactivo con CAIX y un dominio variable específico de CD3 humano desinmunizado como un control positivo. En el panel derecho, la misma construcción se ha usado como un control negativo.

50 **Figura 38:** actividad citotóxica inducida por la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico específico para diferentes especies de CD3 y CAIX CAIX HL x SEQ ID NO. 194 redirigido a la línea celular diana A549. Se usaron

linfocitos T CD8 positivos estimulados de origen humano y de cynomolgus como células efectoras, respectivamente. El ensayo se realizó como se describe en los ejemplos 24 y 25.

5 **Figura 39:** actividad citotóxica inducida por construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico específico para diferentes especies de CD3 y EGFR redirigidas a células CHO transfectadas con EGFR de cynomolgus como línea celular diana. Se usaron linfocitos T CD8 positivos estimulados de origen de cynomolgus como células efectoras. Las mediciones mostradas en esta figura se realizaron en un único ensayo. El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 24. Un anticuerpo monocatenario biespecífico con un dominio variable reactivo con EGFR y un dominio variable específico de CD3 humano desinmunizado (EGFR LH x di-anti CD3) se ha usado como un control negativo.

15 **Figura 40:** actividad citotóxica inducida por construcciones de anticuerpo monocatenario biespecífico específico para diferentes especies de CD3 y EGFR redirigidas a A431 humano como línea celular diana. Se usaron linfocitos T positivos para CD8 estimulados de origen humano como células efectoras. Las mediciones mostradas en esta figura se realizaron en un único ensayo. El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 24. Un anticuerpo monocatenario biespecífico con un dominio variable reactivo con EGFR y un dominio variable específico de CD3 humano desinmunizado (EGFR LH x di-anti CD3) se ha usado como un control positivo. Como control negativo, se ha usado un anticuerpo monocatenario biespecífico irrelevante.

20 Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

EJEMPLO 1: Análisis citométrico de flujo de anticuerpos específicos para diferentes especies

25 Se ensayó la especificidad para diferentes especies de anticuerpos anti-CD3 humano para CD3 de macaco (CD3 de *Macaca fascicularis*, en lo sucesivo también denominado “Cynomolgus”) por análisis citométrico de flujo. Los anticuerpos ensayados fueron un anticuerpo anti-CD3 como se describe en el documento WO 99/54440 (como se muestra en SEQ ID NO. 162 de la presente solicitud), anticuerpo monoclonal (mAb) OKT-3 (Jansen-Cilag), UCHT-1-PE (BD PharMingen, San Diego, California), una inmunoglobulina (Ig) que comprende las cadenas VH y VL mostradas en SEQ ID NO. 2 y 4, respectivamente, y una Ig que comprende las cadenas VH y VL mostradas en SEQ ID NO. 6 y 8, respectivamente. Se tiñeron dos 2×10^5 células (líneas de linfocitos T de macaco de *Macaca fascicularis* y *Macaca mulatta*, respectivamente, como se proporcionó amablemente por H. Fickenscher, Heidelberg, Alemania) por muestra durante 30 minutos a 4 °C en 25 µl de PBS/FCS 1 %/NaN₃ 0,05 % que contenía diluciones de trabajo de anticuerpos monoclonales (como se determinó individualmente por valoración). Las células se lavaron dos veces en PBS/FCS 1 %/NaN₃ 0,05 % y se añadió un anticuerpo secundario cuando fue necesario. Después de la adición del anticuerpo secundario, las células se lavaron de nuevo dos veces en la misma solución y se adquirieron 10.000 células vivas. Se usaron un citómetro de flujo FACS Calibur y el software CellQuest de Becton Dickinson para recoger y analizar los datos. Se excluyeron células no viables usando selección electrónica de dispersión frontal y lateral. Como control negativo solamente se usaron anticuerpos de control de isotipo o secundarios. Como puede verse en la Figura 1, solamente la Ig que comprende las cadenas VH y VL mostradas en SEQ ID NO. 2 y 4, respectivamente, y la Ig que comprende las cadenas VH y VL mostradas en SEQ ID NO. 6 y 8, respectivamente, mostraron especificidad para diferentes especies para un CD3 de primate distinto de chimpancé, es decir, CD3 de macaco.

EJEMPLO 2: Ensayo de FACS para unión de una Ig que comprende SEQ ID NO. 2 y 4, una Ig que comprende SEQ ID NO. 6 y 8 y mAb FN18 para células HPB-ALL y PBMC de cynomolgus

50 Se ensayó la unión de una Ig que comprende SEQ ID NO. 2 y 4, una Ig que comprende SEQ ID NO. 6 y 8 y mAb FN18 con el antígeno CD3 de cynomolgus en PBMC de *cynomolgus* y con el antígeno CD3 humano en células HPB-ALL (DSMZ N.º ACC 483) usando un ensayo de FACS. Para ese fin, se incubaron $2,5 \times 10^5$ células con la Ig conjugada con FITC que comprende SEQ ID NO. 6 y 8 y la Ig conjugada con FITC que comprende SEQ ID NO. 2 y 4 diluidas 1:25 en 50 µl de PBS con FCS de 2 %, respectivamente. La incubación con el anticuerpo mAb FN18 conjugado con FITC (Biosource International) se realizó en 50 µl de anticuerpo no diluido. Las muestras se midieron en un FACSscan (BD biosciences, Heidelberg, FRG). Los resultados para el ensayo se muestran en la Figura 2. Se detectó fuerte unión a antígeno en células humanas, así como en células de *cynomolgus* para la Ig que comprende SEQ ID NO. 2 y 4. Para la Ig que comprende SEQ ID NO. 6 y 8, se observó unión fuerte con células humanas, pero unión más débil con células de *cynomolgus*. Para FN18, se pudo observar unión fuerte con células de *cynomolgus* mientras que no se pudo detectar unión con células humanas.

EJEMPLO 3: Determinación de secuencias de las regiones variables de dos anticuerpos anti-CD3 humano que muestran especificidad de especie para primates no humanos

65 Para la determinación de secuencia de las regiones variables de las Ig anti-CD3 específicas para diferentes especies de los Ejemplos 1 y 2, se usó PCR (desnaturalización a 93°C durante 5 minutos, hibridación a 58 °C durante 1 minuto, elongación a 72 °C durante 1 minuto para el primer ciclo; desnaturalización a 93 °C durante 1 minuto, hibridación a 58 °C durante 1 minuto, elongación a 72 °C durante 1 minuto durante 30 ciclos; extensión terminal a 72 °C durante 5 minutos) para amplificar las secuencias codificantes de las regiones variables de los anticuerpos. Como

se desconoce la secuencia de la región 5' de las regiones variables, en lugar de un único cebador se usó un conjunto de cebadores 5' en combinación con un cebador 3' constante por lo que el cebador 3' se eligió de acuerdo con el isotipo del anticuerpo respectivo y hubo dos conjuntos diferentes de cebadores para la región 5', uno para la región variable de cadena ligera y el otro para la región variable de cadena pesada. Las combinaciones de cebadores usadas en las reacciones de PCR se proporcionan a continuación.

Región variable de cadena pesada:

cebador 5':

5'-SAGGTGCAGCTCGAGGAGTCAGGACCT-3' (SEQ ID NO. 81)
 5'-GAGGTCCAGCTCGAGCAGTCTGGACCT-3' (SEQ ID NO. 82)
 5'-CAGGTCCAACCTCGAGCAGCCTGGGGCT-3' (SEQ ID NO. 83)
 5'-GAGGTTCAGCTCGAGCAGTCTGGGGCA-3' (SEQ ID NO. 84)
 5'-GARGTGAAGCTCGAGGAGTCTGGAGGA-3' (SEQ ID NO. 85)
 5'-GAGGTGAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGT-3' (SEQ ID NO. 86)
 5'-GAAGTGAAGCTCGAGGAGTCTGGGGGA-3' (SEQ ID NO. 87)
 5'-GAGGTTCAGCTCGAGCAGTCTGGAGCT-3' (SEQ ID NO. 88)
 5'-GGGCTCGAGCACCATGGRATGSAGCTGKGMTMATSCTCTT (SEQ ID NO. 89)
 5'-GGGCTCGAGCACCATGRACTTCGGGYTGAGCTKGGTTTT-3' (SEQ ID NO. 90)
 5'-GGGCTCGAGCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTTCT-3' (SEQ ID NO. 91)

cebador 3':

5'-GAGGAATTCGAACTGGACAGGGATCCAGAGTTCC-3' (SEQ ID NO. 92)
 5'-CGGAATTCGAATGACATGGACATCTGGGTCATCC-3' (SEQ ID NO. 93)

Región variable de cadena ligera:

cebador 5':

5'-CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT-3, (SEQ ID NO. 94)
 5'-CCAGTCCGAGCTCGTGTGACGCAGCCGCC-3' (SEQ ID NO. 95)
 5'-CCAGTCCGAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO. 96)
 5'-CCAGTCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO. 97)
 5'-CCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCA-3' (SEQ ID NO. 98)
 5'-CCAGATGTGAGCTCGTCATGACCCAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO. 99)
 5'-CCAGTCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO. 100)
 5'-GGGGAGCTCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3' (SEQ ID NO. 101)
 5'-GGGGAGCTCCACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG-3' (SEQ ID NO. 102)
 5'-GGGGAGCTCCACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA-3' (SEQ ID NO. 103)
 5'-GGGGAGCTCCACCATGKCCCCWRCTCAGYTYCTKGT-3' (SEQ ID NO. 104)

cebador 3':

5'-GAGGAATTCGAACTGCTCACTGGATGGTGGG-3' (SEQ ID NO. 105)
 5'-CGGAATTCGAACAACTCTTCTCCACAGTGTGACC-3' (SEQ ID NO. 106)

Todos los productos de PCR con una longitud entre 350 y 700 pares de bases se aislaron, se purificaron y se secuenciaron con el cebador 3' respectivo de acuerdo con protocolos convencionales (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) (2001)).

Las secuencias obtenidas se examinaron con respecto a secuencias codificantes de región variable funcional y para la cadena pesada y la cadena ligera de cada anticuerpo se obtuvo una secuencia codificante de la región variable. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies se describen en SEQ ID NO. 1 a 8 en el listado de secuencias incluido en la descripción, respectivamente.

EJEMPLO 4: Clonación de anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies anti EpCAM y CD3 humanos

Para generar anticuerpos monocatenarios biespecíficos que comprenden las especificidades para diferentes especies de CD3 anteriormente mencionadas, hubo que modificar las regiones variables amplificadas por PCR para obtener los fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios correspondientes. Para determinar disposiciones adecuadas de las regiones variables de cadena ligera y pesada en el anticuerpo Fv monocatenario, se generaron dos anticuerpos Fv monocatenarios diferentes para cada anticuerpo. Para este fin, se usó una PCR de fusión en dos etapas para amplificar la secuencia codificante de 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 ([Gly₄Ser]₃) en el orden VH-enlazador-VL y VL-enlazador-VH. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes se describen en SEQ ID NO. 9 a 12 y en SEQ ID NO. 13 a 16 del listado de secuencias incluido en la descripción.

En resumen, se usaron las siguientes combinaciones de cebadores:

Para anticuerpo scFv VL-VH mostrado en SEQ ID NO. 11 y 12: SEQ ID NO. 17 a 20.

Para anticuerpo scFv VH-VL mostrado en SEQ ID NO. 9 y 10: SEQ ID NO. 21 a 24.

5 Para anticuerpo scFv VL-VH mostrado en SEQ ID NO. 15 y 16: SEQ ID NO. 25 a 28.

Para anticuerpo scFv VH-VL mostrado en SEQ ID NO. 13 y 14: SEQ ID NO. 29 a 32.

Para generar el anticuerpo monocatenario, se realizaron dos PCR con las combinaciones de cebadores respectivas. Durante esta PCR se introdujeron secuencias complementarias solapantes en los productos de PCR que surgían de los cebadores de enlazadores respectivos que se combinaban para formar la secuencia codificante del enlazador de 15 aminoácidos durante la PCR de fusión posterior. Los dominios VH y VL amplificados se fusionaron en una siguiente PCR en la que solamente se requerían los cebadores externos y ambos productos de PCR. El anticuerpo de scFv resultante está flanqueado en el extremo 5' con un enlazador Ser(Gly₄) Ser pequeño precedido por el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción para BspEI y en extremo 3' con un marcador de afinidad de 6 histidinas seguido de un codón de terminación y del sitio de reconocimiento de enzimas de restricción para Sall. El segundo anticuerpo Fv monocatenario fue uno con especificidad anti-EpCAM humana designado "5-10" que se describe en SEQ ID NO. 33 y 34 del listado de secuencias incluido en la descripción. Para conseguir la fusión de los anticuerpos Fv monocatenarios y para permitir la expresión eucariota, la secuencia codificante de los anticuerpos Fv monocatenarios se clonó después mediante BspEI (5' del enlazador Ser(Gly₄)Ser) Sall en el vector de expresión pEFDHFR (pEFDHFR se describió en Mack *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) que contenía la secuencia codificante para el anticuerpo Fv monocatenario específico de EpCAM humana 5-10 y el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción para BspEI. La secuencia codificante de un péptido líder de inmunoglobulina murino se describe en SEQ ID NO. 35 y 36 del listado de secuencias incluido en la descripción, precedido de una secuencia consenso de inicio de la traducción de Kozak y el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción para EcoRI. Se aislaron clones individuales de las construcciones y se secuenciaron con cebadores complementarios de regiones flanqueantes en el vector de acuerdo con protocolos convencionales (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York {1989} (2001)). Para experimentos adicionales se seleccionó un clon de cada construcción. Se describen las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para 5-10LHxSEQ ID NO. 12 en SEQ ID NO. 37 y 38, para 5-10LHxSEQ ID NO. 10 en SEQ ID NO. 39 y 40, para 5-10LHxSEQ ID NO. 16 en SEQ ID NO. 41 y 42 y para 5-10LHxSEQ ID NO.14 en SEQ ID NO. 43 y 44 del listado de secuencias incluido en la descripción.

EJEMPLO 5: Expresión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos de 5-10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10, 5-10LHxSEQ ID NO. 16 y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 en células CHO

Los plásmidos con las secuencias codificantes de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos se transfectaron en células CHO deficientes en DHFR para expresión eucariota de la construcción como se describe en Kaufmann R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566). Se indujo amplificación génica de la construcción aumentando las concentraciones de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de MTX hasta 500 nM. Las células transfectadas se expandieron después y se produjo 1 litro de sobrenadante. La construcción se purificó finalmente del sobrenadante de cultivo como se describe en Kufer *et al.* Cancer Immunity Vol. 1, p. 10 (2001).

EJEMPLO 6: Ensayo de FACS para unión de 5-10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10, 5-10LHxSEQ ID NO. 16 y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 con células Kato III o células CHO transfectadas con EpCAM humanas y con células HPB-ALL

Se ensayó la unión de las construcciones bifuncionales para el antígeno de EpCAM en células Kato III humanas que expresan EpCAM (ATCC N.º HTB-103) o en células CHO transfectadas con EpCAM humana y para el antígeno CD3 humano en células HPB-ALL usando un ensayo de FACS. Para ese fin se incubaron $2,5 \times 10^5$ células con 50 µl de sobrenadante de cultivo celular que contenía la construcción. La unión de la construcción se detectó con un anticuerpo anti-His (anticuerpo Penta-His, sin BSA, obtenido de Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 µg/ml en 50 µl de PBS con FCS 2 %. Como un reactivo de segunda etapa se usó un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, IgG de cabra antirratón, anticuerpo específico de fragmento Fc-gamma, diluido 1:100 en 50 µl de PBS con FCS 2 % (obtenido de Dianova, Hamburgo, FRG). Las muestras se midieron en un FACScan (BD biosciences, Heidelberg, FRG). La unión a antígeno fue claramente detectable para la especificidad anti EpCAM humana, así como para especificidades anti-CD3 en la línea celular positiva para CD3 humana (véase Figura 3).

EJEMPLO 7: Ensayo de citotoxicidad para 5-10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10, y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 con células Kato III como células diana y PBMC humanas como células efectoras

Se analizó la bioactividad de 5-10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10, y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 por ensayos de citotoxicidad *in vitro* basados en FACS usando las células Kato III positivas para EpCAM humana y PBMC humanas como células efectoras. Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con colorante PKH26 (Sigma-Aldrich, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células diana macadas se lavaron dos veces con RPMI/FCS 10 % y se mezclaron con células efectoras recién aisladas a una relación E:T (Efectoras: Diana) de 10:1. Se añadieron 2×10^4 células diana y 2×10^5 células efectoras en un volumen

de 50 µl de RPMI/FCS 10 % por pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se prepararon diluciones en serie décuplas de construcciones monocatenarias biespecíficas diferentes en RPMI/FCS 10 % para obtener una concentración de partida de 1.000 ng/ml en el volumen de reacción final. Se añadieron 50 µl de las soluciones diferentes por triplicado a los pocillos correspondientes. Se incubaron mezclas de citotoxicidad individuales durante 5 24 a 48 horas a 37 °C, CO₂ 5 %.

Posteriormente se realizó la medición de la actividad citotóxica. Para este fin, se añadió yoduro de propidio (PI) hasta una concentración final de 1 µg/ml por pocillo y las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. El número de células diana positivas y negativas para PKH y PI se determinó por FACS. La citotoxicidad se midió como la relación de PKH positivas y PI negativas (células diana vivas) frente a la media de células diana vivas (PKH positivas y PI negativas) en el control que no contenía ninguna construcción de acuerdo con la fórmula: citotoxicidad (%) = [(células PI negativas/media de células PI negativas en el control) x 100]. Se analizaron curvas de muerte de respuesta a dosis sigmoidea por software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Estados Unidos) y se calculó la concentración de BITE que inducía la destrucción semi-máxima (valor de CE50). Los resultados de este ensayo se muestran posteriormente en la Figura 4. Todas las construcciones mostraron una actividad citotóxica. Los valores de CE50 resultantes para 5-10LHxSEQ ID NO. 14, 5-10LHxSEQ ID NO. 12 y 5-10LHxSEQ ID NO. 10 fueron 1,3 pg/ml, 1,5 pg/ml y 5,8 pg/ml respectivamente.

20 **EJEMPLO 8: Ensayo de citotoxicidad para 5-10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10, y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 con células Kato III como células diana y PBMC de *cynomolgus* como células efectoras**

Se analizó la bioactividad de 5-10LHxSEQ ID NO. 12, 5-10LHxSEQ ID NO. 10, y 5-10LHxSEQ ID NO. 14 mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro* basados en FACS usando las células Kato III positivas para EpCAM humana como células diana y PBMC de *cynomolgus* como células efectoras.

Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con colorante PKH26 (Sigma-Aldrich, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células diana marcadas se lavaron dos veces con RPMI/FCS 10 % y se mezclaron con células efectoras recién aisladas a una relación E:T de 10:1. Se añadieron 2x10⁴ células diana y 2x10⁵ células efectoras en un volumen de 50 µl de RPMI/FCS 10 % por pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se prepararon diluciones en serie décuplas de anticuerpos monocatenarios biespecíficos diferentes en RPMI/FCS 10 % para obtener una concentración de partida de 1.000 ng/ml en el volumen de reacción final. Se añadieron 50 µl de las diferentes soluciones por triplicado a los pocillos correspondientes. Se incubaron mezclas de citotoxicidad individuales durante 24 a 48 horas a 37 °C, CO₂ 5 %.

Posteriormente, se realiza la medición de la actividad citotóxica. Para este fin, se añadió yoduro de propidio (PI) hasta una concentración final de 1 µg/ml por pocillo y las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. El número de células diana positivas y negativas para PKH y PI se determinó por FACS. La citotoxicidad se midió como la relación de PKH positivas y PI negativas (células diana vivas) con respecto a la media de células diana vivas (PKH positivas y PI negativas) en el control que no contenía construcción de acuerdo con la fórmula: citotoxicidad (%) = [(células PI negativas/media de células PI negativas en control) x 100]. Se analizaron las curvas de muerte de respuesta a dosis sigmoidea mediante software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Estados Unidos) y se calculó la concentración de anticuerpo monocatenario biespecífico que inducía destrucción semi-máxima (valor de CE50). Los resultados de este ensayo se muestran posteriormente en la Figura 5. 5-10LHxSEQ ID NO. 14, 5-10LHxSEQ ID NO. 12 y 5-10LHxSEQ ID NO. 10 mostraron actividad citotóxica. Los valores de CE50 resultantes para 5-10LHxSEQ ID NO. 14, 5-10LHxSEQ ID NO. 12 y 5-10LHxSEQ ID NO. 10 fueron 87 pg/ml, 69 pg/ml y 52 pg/ml respectivamente. 5-10LHxdi-anti-CD3 (anticuerpo anti-CD3 desimmunizado como se muestra en la SEQ ID NO. 163) no mostró ninguna actividad. Esto se debe al hecho de que el anticuerpo di-anti-CD3 solamente se une con CD3 humano, pero no con CD3 de *cynomolgus*.

50 **EJEMPLO 9: Determinación de secuencia del antígeno EpCAM de *cynomolgus* y generación de células CHO transfectadas con EpCAM de *cynomolgus***

Para obtener el antígeno EpCAM de *cynomolgus* para ensayar la especificidad para diferentes especies de anticuerpos anti-EpCAM humana, en primer lugar, tuvo que determinarse la secuencia codificante del antígeno EpCAM de *cynomolgus*. Para este fin, se usaron muestras de tejido de colon de 3 animales en paralelo para el aislamiento de ARN total y síntesis de ADNc por transcripción inversa con cebadores aleatorios, que se realizaron de acuerdo con protocolos convencionales (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) (2001)). Se usó una PCR (desnaturalización a 93°C durante 5 minutos, hibridación a 58 °C durante 1 minuto, elongación a 72 °C durante 1 minuto para el primer ciclo; desnaturalización a 93 °C durante 1 minuto, hibridación a 58 °C durante 1 minuto, elongación a 72 °C durante 1 minuto durante 35 ciclos; extensión terminal a 72 °C durante 5 minutos) para amplificar la secuencia codificante del antígeno EpCAM. Como se desconocía la secuencia codificante del antígeno EpCAM de *cynomolgus*, se diseñaron cebadores apropiados (cebador 5' descrito en SEQ ID NO. 45, cebador 3' descrito en SEQ ID NO. 46) para la reacción de PCR de acuerdo con la secuencia codificante conocida del antígeno EpCAM humano (Szala S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 87 (1990); p. 3542-6). También se diseñaron cebadores para permitir la expresión de la secuencia codificante del antígeno completo. Para las tres muestras, se aislaron, purificaron y subclonaron PCR de

960 pares de bases mediante XbaI y Sall, en pEFDHFR. Se secuenciaron múltiples clones para cada muestra de acuerdo con protocolos convencionales (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) (2001)) usando cebadores de secuenciación apropiados complementarios de secuencias flanqueantes en el vector.

5 Las nuevas secuencias de nucleótidos y aminoácidos del antígeno EpCAM de *cynomolgus* se describen en SEQ ID NO. 47 y 48 en el listado de secuencias incluido en la descripción, respectivamente.

10 Las secuencias obtenidas se examinaron por comparación con la secuencia codificante del antígeno EpCAM humano. Como se muestra en la Figura 6, hay un alto grado de homología de secuencia entre la secuencia codificante del antígeno EpCAM humano y las secuencias obtenidas de las muestras de colon de los 3 monos *cynomolgus*.

15 Para generar una línea celular positiva para EpCAM de *cynomolgus*, se transfectó un clon de la secuencia codificante anteriormente mencionada del antígeno EpCAM de *cynomolgus* subclonado en pEFDHFR con una secuencia de nucleótidos verificada en células CHO deficientes en DHFR para expresión eucariota de la construcción como se describe en Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566). Se indujo amplificación génica de la construcción mediante concentraciones crecientes de MTX hasta una concentración final de hasta 500 nM de MTX. Las células transfectadas se ensayaron después con respecto a la expresión de EpCAM de *cynomolgus*

20 usando un ensayo de FACS. Para ese fin, se incubaron varias de $2,5 \times 10^5$ células con 50 μ l de sobrenadante de tres hibridomas anti EpCAM humana de ratón diferentes (M79 – Fogler *et al.*, *Cancer Res.* 48 (1988); p. 6303-8; 3B10 – Passlick *et al.* *Int. J. Cancer* 87 (2000), p. 548-552; 2G8 – Balzar *et al.*, *J. Mol. Med.* 77 (1999), p. 699-712). La unión de los anticuerpos se detectó con un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, IgG de cabra anti-ratón, anticuerpo específico de fragmento Fc-gamma, diluido 1:100 en 50 μ l de PBS con FCS 2 %

25 (obtenido de Dianova, Hamburgo, FRG). Las muestras se midieron en un FACScan (BD biosciences, Heidelberg, FRG). El anticuerpo anti EpCAM 2G8 se reconoció como específico para diferentes especies y se confirmó la expresión de EpCAM de *cynomolgus* (véase Fig. 7). Los transfectantes (representados como curvas no rellenas) en comparación con células no transfectadas (representadas como curvas rellenas) mostraron unión solamente con el sobrenadante del hibridoma 2G8 que se reconoció por lo tanto como específico de especie de anticuerpo para

30 EpCAM humano y de *cynomolgus*.

EJEMPLO 10: Determinación de secuencia de las regiones variables de un anticuerpo anti EpCAM humana específico para diferentes especies para primates no humanos

35 Para la determinación de secuencia de las regiones variables del anticuerpo anti-EpCAM 2G8, se usó la línea celular de hibridoma respectiva para aislamiento de ARN total y síntesis de ADNc por transcripción inversa con cebadores aleatorios, que se realizaron según protocolos convencionales (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (1989) (2001)). Se usó una PCR (desnaturalización a 93 °C durante 5 min, hibridación a 58 °C durante 1 min, elongación a 72 °C durante 1 min para el primer ciclo; desnaturalización a 93 °C durante 1 min, hibridación a 58 °C durante 1 min, elongación a 72 °C

40 durante 1 min durante 30 ciclos; extensión terminal a 72 °C durante 5 min) para amplificar las secuencias codificantes de las regiones variables del anticuerpo. Como se desconoce la secuencia de la región 5' de las regiones variables se usó el conjunto anteriormente mencionado de cebadores 5' en combinación con un cebador 3' constante por lo que el cebador 3' se eligió de acuerdo con el isotipo del anticuerpo.

45 Región variable de cadena pesada:

Cebador 3':

50 5'-TATGCAACTAGTACAACCACAATCCCTGGG-3' (SEQ ID NO. 107)

Región variable de cadena ligera:

Cebador 3':

55 5'-GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCCTGTTGAA-3' (SEQ ID NO. 108)

60 Todos los productos de PCR con una longitud entre 350 y 700 pares de bases se aislaron, se purificaron y se secuenciaron con el cebador 3' respectivo de acuerdo con protocolos convencionales (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) (2001)).

65 Las secuencias obtenidas se examinaron con respecto a secuencias codificantes de región variable funcional y para la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo se aisló una secuencia codificante de la región variable. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables se describen en SEQ ID NO. 49 a 52 en el listado de secuencias incluido en la descripción, respectivamente.

EJEMPLO 11: Clonación de anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies de EpCAM y CD3

Para generar moléculas de anticuerpos monocatenarios biespecíficos que comprenden la especificidad para diferentes especies de CD3 anteriormente mencionada y la especificidad para diferentes especies de EpCAM anteriormente mencionada, las regiones variables amplificadas del anticuerpo 2G8 tuvieron que modificarse por PCR para obtener los fragmentos de anticuerpo Fv monocatenario correspondientes. Se generaron dos anticuerpos Fv monocatenarios con diferentes disposiciones de las regiones variables de cadena ligera y pesada. Para este fin, se usó una PCR de fusión de dos etapas para amplificar la secuencia codificante de 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 2G8 que conecta los dos dominios variables con un enlazador de 15 aminoácidos ([Gly₄Ser]₃) en el orden VH-Enlazador-VL y VL-Enlazador-VH. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se describen en SEQ ID NO. 53 a 56 del listado de secuencias incluido en la descripción, respectivamente.

En resumen se usaron las siguientes combinaciones de cebadores:

Para anticuerpo scFv 2G8 VL-VH (designado en lo sucesivo en el presente documento 2G8LH mostrado en SEQ ID NO. 55 y 56): SEQ ID NO. 57 a 60.

Para anticuerpo scFv 2G8 VH-VL (designado en lo sucesivo en el presente documento 2G8HL mostrado en SEQ ID NO. 53 y 54): SEQ ID NO. 61 a 64.

Para generar el anticuerpo monocatenario, se realizaron dos PCR con las combinaciones de cebadores respectivas. Durante esta PCR, se introdujeron secuencias complementarias solapantes en los productos de PCR (que surgen de los cebadores enlazadores respectivos que se combinaron para formar la secuencia codificante del enlazador de 15 aminoácidos durante la PCR de fusión posterior). Los dominios VH y VL amplificados se fusionaron en esta PCR de fusión en la que solamente se requerían los cebadores externos y ambos productos de PCR. El anticuerpo scFv resultante se flanquea en el extremo 5' con el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción para BsrGI y en el extremo 3' con el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción para BspEI. La secuencia codificante de los anticuerpos Fv monocatenarios específicos de EpCAM se clonó después mediante BsrGI y BspEI en los vectores de expresión pEFDHFR descritos anteriormente que reemplazan el scFv 5-10LH. Se aislaron clones individuales de las construcciones y se secuenciaron con cebadores complementarios para regiones flanqueantes en el vector de acuerdo con protocolos convencionales (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) (2001)). Para experimentos adicionales se seleccionó un clon de cada construcción. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se describen para 2G8LHxSEQ ID NO. 12 en SEQ ID NO. 65 y 66, para 2G8LHxSEQ ID NO. 10 en SEQ ID NO. 67 y 68, para 2G8LHxSEQ ID NO. 16 en SEQ ID NO. 69 y 70, para 2G8LHxSEQ ID NO. 14 en SEQ ID NO. 71 y 72, para 2G8HLxSEQ ID NO. 12 en SEQ ID NO. 73 y 74, para 2G8HLxSEQ ID NO. 16 en SEQ ID NO. 77 y 78 y para 2G8HLxSEQ ID NO. 14 en SEQ ID NO. 79 y 80 del listado de secuencias incluido en la descripción.

EJEMPLO 12: Expresión de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos 2G8LHxSEQ ID NO. 12, 2G8LHxSEQ ID NO. 10, 2G8LHxSEQ ID NO. 16, 2G8LHxSEQ ID NO. 14, 2G8HLxSEQ ID NO. 12, 2G8HLxSEQ ID NO. 10, 2G8HLxSEQ ID NO. 16 y 2G8HLxSEQ ID NO. 14 en células CHO

Los plásmidos con las secuencias que codifican los anticuerpos monocatenarios biespecíficos se transfectaron en células CHO deficientes en DFHR para expresión eucariota de la construcción como se describe en Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566). Se indujo amplificación génica de la construcción aumentando concentraciones de MTX hasta una concentración final de hasta 500 nM de MTX. Las células transfectadas se expandieron después y se produjo 1 litro de sobrenadante. La construcción se purificó finalmente del sobrenadante de cultivo como se describe en Kufer *et al.* *Cancer Immunity* Vol. 1, p. 10 (2001).

EJEMPLO 13: Ensayo de FACS para unión de 2G8LHxSEQ ID NO. 12, 2G8LHxSEQ ID NO. 10, 2G8LHxSEQ ID NO. 16, 2G8LHxSEQ ID NO. 14, 2G8HLxSEQ ID NO. 12, 2G8HLxSEQ ID NO. 10, 2G8HLxSEQ ID NO. 16 y 2G8HLxSEQ ID NO. 14 en células Kato III o células CHO transfectadas con EpCAM de *cynomolgus* y células HPB-ALL

Se ensayó la unión de las construcciones bifuncionales de sobrenadantes de cultivo celular o unión de construcciones bifuncionales purificadas con el antígeno EpCAM humano en células Kato III o células CHO transfectadas con EpCAM de *cynomolgus* y con el antígeno CD3 en células HPB-ALL usando un ensayo de FACS. Para ese fin se incubaron $2,5 \times 10^5$ células con 50 μ l de sobrenadante o con 5 μ g/ml de las construcciones purificadas en 50 μ l de PBS con FCS al 2 %. La unión de las construcciones se detectó con un anticuerpo anti-His (Anticuerpo Penta-His, sin BSA, obtenido de Qiagen GmbH, Hilden, FRG) a 2 μ g/ml en 50 μ l de PBS con FCS 2 %. Como un reactivo de segunda etapa se usó un fragmento F(ab')₂ purificado por afinidad conjugado con R-Ficoeritrina, IgG de cabra anti-ratón, anticuerpo específico de fragmento Fc-gamma, diluido 1:100 en 50 μ l de PBS con FCS 2 % (obtenido de Dianova, Hamburgo, FRG). Las muestras se midieron en un FACScan (BD biosciences, Heidelberg,

FRG). La unión a antígeno fue claramente detectable para las especificidades anti EpCAM así como para las especificidades anti CD3 (véase Fig. 8). Como un control negativo para unión con EpCAM de cynomolgus, se incluyó la construcción 5-10LHxSEQ ID NO. 10 que muestra unión en CD3 humano (células HPB-ALL) pero no muestra unión con EpCAM de *cynomolgus* (células CHO transfectadas con EpCAM de cynomolgus). La parte 5-10LH solamente se une con EpCAM humana.

EJEMPLO 14: Ensayo de citotoxicidad para 2G8LHxSEQ ID NO. 10 y 2G8HLxSEQ ID NO. 12 con células CHO transfectadas con EpCAM de *cynomolgus* como células diana y PBMC humanas como células efectoras

Se analizó la bioactividad de anticuerpos monocatenarios biespecíficos seleccionados mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro* basados en FACS usando las células CHO transfectadas con EpCAM de *cynomolgus* como células diana y PBMC humanas como células efectoras.

Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con colorante PKH26 (Sigma-Aldrich, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células diana marcadas se lavaron dos veces con RPMI/FCS al 10 % y se mezclaron con células efectoras recién aisladas a una relación E:T de 10:1. Se añadieron 2×10^4 células diana y 2×10^5 células efectoras en un volumen de 50 μ l de RPMI/FCS 10 % por pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se prepararon diluciones en serie décuplas de diferentes anticuerpos monocatenarios biespecíficos en RPMI/FCS 10 % para obtener una concentración de partida de 5000 ng/ml en el volumen de reacción final. Se añadieron 50 μ l de las diferentes soluciones por triplicado a los pocillos correspondientes y se incubaron durante 24 a 48 horas a 37 °C, CO₂ 5 %.

Posteriormente, se realizó la medición de la actividad citotóxica. Para este fin se añadió yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 1 μ g/ml por pocillo y las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. El número de células diana positivas para PKH y PI se determinó por FACS. Se midió la citotoxicidad como la relación de células PI positivas (células muertas) frente al número total de células diana (PKH positivas) de acuerdo con la fórmula: citotoxicidad (%) = [(células PI positivas/células PKH positivas) x 100]. Se analizaron curvas de destrucción de respuesta a dosis sigmoideas mediante Software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Estados Unidos) y se calculó la concentración de anticuerpo monocatenario biespecífico que inducía muerte semimáxima (valor de CE50). Los resultados de este ensayo se muestran posteriormente en la Fig. 9. Los valores de CE50 resultantes para 2G8LHxSEQ ID NO. 110 y 2G8HLxSEQ ID NO. 12 fueron 1103 pg/ml y 3638 pg/ml, respectivamente. Se incluyó 5-10LHxdi-anti CD3 (versión des inmunizada del anticuerpo anti-CD3 como se muestra en SEQ ID NO. 163 que se une con CD3 humano, pero no con CD3 de cynomolgus) como control negativo y no mostró ninguna actividad. Esto se debe al hecho de que 5-10LH solamente se une con EpCAM humana pero carece de especificidad para diferentes especies para EpCAM de cynomolgus.

EJEMPLO 15: Ensayo de citotoxicidad para 2G8LHxSEQ ID NO. 10 y 2G8HLxSEQ ID NO. 12 con células CHO transfectadas con EpCAM de cynomolgus como células diana y PBMC de cynomolgus como células efectoras

Se analizó la bioactividad de anticuerpos monocatenarios biespecíficos seleccionados mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro* basados en FACS usando las células CHO transfectadas con EpCAM de cynomolgus como células diana y PBMC de cynomolgus como células efectoras.

Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con colorante PKH26 (Sigma-Aldrich, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células diana marcadas se lavaron dos veces con RPMI/FCS 10 % y se mezclaron con células efectoras recién aisladas a una relación E:T de 10:1. Se añadieron 2×10^4 células diana y 2×10^5 células efectoras en un volumen de 50 μ l de RPMI/FCS 10 % por pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se prepararon diluciones en serie décuplas de diferentes anticuerpos monocatenarios biespecíficos en RPMI/FCS 10 % para obtener una concentración de partida de 5000 ng/ml en el volumen de reacción final. Se añadieron 50 μ l de las diferentes soluciones por triplicado a los pocillos correspondientes. Se incubaron mezclas de citotoxicidad individuales durante 24 a 48 horas a 37 °C, CO₂ 5 %.

Posteriormente, se realizó la medición de la actividad citotóxica como se ha descrito en el Ejemplo 14. Los valores de CE50 resultantes para 2G8LHxSEQ ID NO. 110 y 2G8HLxSEQ ID NO. 12 fueron 39810 pg/ml y 60350 pg/ml, respectivamente. Se incluyó 5-10LHxdi-anti CD3 (versión des inmunizada del anticuerpo anti-CD3 como se muestra en SEQ ID NO. 163) como control negativo y no mostró ninguna actividad. Di-anti CD3 se une solamente con CD3 humano, pero no consigue unirse con CD3 de macaco/cynomolgus. 5-10LH solamente se une con EpCAM humana pero carece de especificidad para diferentes especies para EpCAM de cynomolgus.

EJEMPLO 16: Generación de un fragmento de anticuerpo CD3 de tipo humano que se une con CD3 humano y de cynomolgus1. Determinación de un VH humano equivalente

La secuencia de aminoácidos de la cadena VH murina mostrada en SEQ ID NO. 2 se alineó con el repertorio de secuencias de línea germinal de VH humano (<http://vbase.mrc-cep.cam-ac.uk>) usando el software de análisis de ADN Vector NTI. Basándose en este análisis, se eligió el segmento VH humano 3-73 como una secuencia molde (véase Fig. 11). Las definiciones de CDR y marcos conservados son de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.

Los restos de aminoácidos correspondientes que difieren entre la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 2 y el segmento de VH humano 3-73 dentro de las regiones marco conservadas se mutaron en el nivel de ADN hacia los restos humanos. Sin embargo, la construcción conservó restos marco conservados potencialmente cruciales de la secuencia de VH murina original (de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat): H-30, H-41, H49, H82b, H-93 (véase Figura 12). De esta manera, se diseñó una secuencia de aminoácidos que era idéntica a la cadena de VH murina mostrada en la secuencia SEQ ID NO. 2 dentro de sus CDR. La secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en SEQ ID NO. 110, mientras que la secuencia de ácido nucleico correspondiente se muestra en SEQ ID NO. 111; véase también Fig. 12. La secuencia de VH N-terminal se cambió a "EVQLLE" para generar un sitio de clonación N-terminal adecuado (véase Fig. 12).

2. Síntesis génica y clonación de la región VH de tipo humano

La región VH de tipo humano anteriormente mencionada se sintetizó por gen (Entelechon, Alemania) y se subclonó mediante los sitios de restricción XhoI y BstEII en un vector de expresión bacteriano adecuado. Este vector ya contenía la secuencia codificante de una cadena VL (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 148; extremo N terminal en comparación con el VL original mostrado en SEQ ID NO. 4 cambiado ligeramente por razones de clonación) que se empareja con la región VH de tipo humano seguido de un Flag y un Marcador His-6 y precedido de una secuencia líder que dirige el scFv funcional al periplasma de *E. coli*. La disposición de dominio funcional después de clonación fue Secuencia líder-VH(G₄S)₃-VL-Flag-His6.

3. Análisis funcional de construcciones de scFv que tienen el VH murino original mostrado en SEQ ID NO. 2/VL mostrado en SEQ ID NO. 4 en comparación el VH de tipo humano mostrado en SEQ ID NO. 110/VL mostrado en SEQ ID NO. 148

Se transformó ADN plasmídico que codificaba a) el VH (SEQ ID NO. 2) y VL (SEQ ID NO. 4) murino original y b) el VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110) combinado con el VL (SEQ ID NO. 148) cada uno en *E. coli* TG1 de acuerdo con protocolos convencionales. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del scFv VH-VL que comprende el VH (SEQ ID NO. 2) y VL (SEQ ID NO. 4) murino original se muestran en SEQ ID NO. 9 y 10, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del scFv VH-VL que comprende el VH (SEQ ID NO. 110) y el VL (SEQ ID NO. 148) de tipo humano se muestran en SEQ ID NO. 147 y 146, respectivamente.

Se realizó la expresión de diferentes clones en *E. coli* TG-1 en un formato de 96 pocillos. Se inocularon 100 µl de LB/glucosa al 0,1 % con 10 µl de un cultivo de sobrenadante de clones individuales y se dejó crecer durante 4 h a 37 °C. Después de la adición de IPTG hasta una concentración final de 1 mM, el cultivo se dejó crecer a 30 °C durante otras 18-20 h. Por cada pocillo, se añadieron 40 µl de tampón BEL (ácido bórico 400 mM, NaCl 320 mM, EDTA 4 mM, pH 8,0 + lisozima 2,5 mg/ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se eliminó el residuo celular por centrifugación y los sobrenadantes se ensayaron en experimentos de citometría de flujo.

La línea de linfocitos T humanos HPB-All y linfocitos T en células mononucleares de sangre periférica de cynomolgus (PBMC) se usaron como células positivas para CD3 humano y CD3 de cynomolgus, respectivamente.

Típicamente se incubaron 100.000 células con 50 µl de los sobrenadantes bacterianos que contenían scFv y se incubaron durante 30 min en hielo.

A continuación las tablas se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se resuspendieron en 50 µl de PBS que contenía anticuerpo anti-His (Pentahis, Roche) y se incubaron adicionalmente en hielo durante 30 min. Después las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo anti IgG de ratón marcado con PE durante 30 min más en hielo (en esta etapa se coincubaron PBMC de cynomolgus con FITC anti-CD2 para identificar los linfocitos T en la mezcla de PBMC). Después de lavar las células una vez las células se resuspendieron en un tampón adecuado y se determinó la positividad de la construcción de anticuerpo unido a célula en un citómetro de flujo (FACScalibur) y se analizó.

El scFv de control de SEQ ID NO. 10 muestra un claro desplazamiento de células CD3 positivas humanas así como en células CD3 positivas de cynomolgus indicativo de unión con CD3 tanto humano como de cynomolgus. El scFv

mostrado en SEQ ID NO. 146 que contiene el VH de tipo humano también muestra clara unión con células CD3 positivas humanas (véase Fig. 13) y de cynomolgus (véase Fig. 14).

4. Determinación de un VL humano equivalente

5 La secuencia de aminoácidos de la cadena de VH murino mostrada en SEQ ID NO. 2 se alineó con el repertorio de secuencias de línea germinal de VL humano (<http://vbase.mrc-cep.cam-ac.uk>) usando el software de análisis de ADN Vector NTI. Basándose en este análisis, se eligió el segmento 7a de Vlambda humano como una secuencia molde (véase Fig. 21). Las definiciones de CDR y marcos conservados son de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.

15 Los restos de aminoácidos correspondientes que difieren entre la cadena de VL murina mostrada en SEQ ID NO. 4 y el segmento 7a de Vlambda humano dentro de las regiones marco conservadas se mutaron en el nivel de ADN hacia los restos humanos. Sin embargo, la construcción conservó restos de marco conservado potencialmente cruciales de la secuencia de Vlambda murina original (de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat): L 36, L 46, L 49, L 57 (véase Fig. 21). De esta manera, se diseñó una secuencia de aminoácidos que era idéntica a la cadena de VL murina mostrada en la secuencia SEQ ID NO. 4 dentro de sus CDR. La secuencia de aminoácidos correspondiente del VL de tipo humano generado se muestra en SEQ ID NO. 168, mientras que la secuencia de ácido nucleico correspondiente se muestra en SEQ ID NO. 167. La secuencia de VL N-terminal se cambió a "EL" para generar un sitio de clonación N terminal adecuado.

5. Síntesis génica y clonación de la región VL de tipo humano

25 La región VL de tipo humano anteriormente mencionada se sintetizó por gen (Entelechon, Alemania) y se subclonó mediante los sitios de restricción SacI y BsiWI en un vector de expresión bacteriano adecuado. Este vector ya contenía la secuencia codificante de la cadena de VH de tipo humano anteriormente mencionada (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 110) que se empareja con la región VL de tipo humano (secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 168) seguida de un Flag y un Marcador de His-6 y precedida por una secuencia líder que dirige el scFv funcional a periplasma de *E. coli*. La disposición de dominio funcional después de clonación fue secuencia Líder-VH(G₄S)₃-enlazador-VL-marcador Flag-marcador His6.

6. Análisis funcional de construcciones de scFv que tienen el VH de tipo humano mostrado en SEQ ID NO. 110 combinado con el VL de tipo humano mostrado en SEQ ID NO. 168

35 Se transformó ADN plasmídico que codificaba a) el VH (SEQ ID NO. 2) y VL (SEQ ID NO. 4) murino original y b) el VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110) combinado con el VL de tipo humano (SEQ ID NO. 168) cada uno en *E. coli* TG1 de acuerdo con protocolos convencionales. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del scFv VH-VL que comprende el VH (SEQ ID NO. 2) y VL (SEQ ID NO. 4) murino original se muestran en SEQ ID NO. 9 y 10, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del scFv VH-VL que comprende el VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110) y el VL de tipo humano (SEQ ID NO. 168) se muestran en SEQ ID NO. 169 y 170, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del scFv VL-VH que comprende el VL de tipo humano (SEQ ID NO. 168) y el VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110) se muestran en SEQ ID NO. 193 y 194, respectivamente. Debido a diferentes estrategias de clonación, la secuencia de aminoácidos del scFv VL-VH de SEQ ID NO. 194 muestra tres intercambios de aminoácidos en comparación con la del scFv VH-VL de SEQ ID NO. 45 170, sin embargo, sin afectar a la capacidad de unión y especificidad de dicho scFv.

50 Se realizó expresión de diferentes clones en *E. coli* TG-1 en formato de 96 pocillos. Se inocularon 100 µl de LB/glucosa al 0,1 % con 10 µl de un cultivo de una noche de clones individuales y se cultivó durante 4 h a 37 °C. Después de la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, el cultivo se dejó crecer a 30 °C durante otras 18-20 h. Por cada pocillo, se añadieron 40 µl de tampón BEL (ácido bórico 400 mM, NaCl 320 mM, EDTA 4 mM, pH 8,0 + lisozima 2,5 mg/ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se eliminó el residuo celular por centrifugación y se ensayaron los sobrenadantes en experimentos de citometría de flujo.

55 La línea de linfocitos T humano HPB-ALL y linfocitos T humanos cynomolgus en células mononucleares de sangre periférica (PMBC) se usaron como células positivas para CD3 humano y CD3 de cynomolgus, respectivamente.

Típicamente se incubaron 100.000 células con 50 µl de los sobrenadantes bacterianos que contenían scFv y se incubaron durante 30 min en hielo.

60 a) Las células HPB-ALL se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron posteriormente en 50 µl de PBS que contenía anticuerpo anti-His (Pentahis, Roche) y se incubaron adicionalmente en hielo durante 30 min. Después las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo anti IgG de ratón marcado con PE durante 30 min más en hielo. Después de lavar las células una vez las células se resuspendieron en un tampón adecuado y se determinó la positividad de la construcción de anticuerpo unido a célula en un citómetro de flujo (FACScalibur) y se analizó.

65

b) PBMC humanas y de cynomolgus (que contenían linfocitos T) se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se resuspendieron en 50 µl de PBS que contenía anticuerpo anti-His biotinilado (Pentahis biotinilado, Roche) y se incubaron adicionalmente en hielo durante 30 min. Después las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con Estreptavidina marcada con PE durante 30 min más en hielo. En esta etapa, se coincubaron PBMC con FITC anti-CD2 para identificar los linfocitos T en la mezcla de PBMC.

Después de lavar las células de a) o b) una vez las células se resuspendieron en un tampón adecuado y se determinó la positividad de la construcción de anticuerpo unido a célula en un citómetro de flujo (FACScalibur) y se analizó.

El scFv de control de SEQ ID NO. 10 (VH murino de SEQ ID NO. 4 - VL murino de SEQ ID NO. 2) muestra un claro desplazamiento en células CD3 positivas humanas como se representa en la Figura 22. El desplazamiento en linfocitos T humanos y de cynomolgus es menos pronunciado, más probablemente debido al sistema de detección menos sensible (Fig. 23).

El scFv de tipo humano de SEQ ID NO. 170 (VH de tipo humano de SEQ ID NO. 110 - VL de tipo humano de SEQ ID NO. 168) muestra un desplazamiento positivo en células HPB-ALL (Fig. 22) y claros desplazamientos en linfocitos T humanos así como de cynomolgus (Fig. 23, panel superior).

Cuando se preincuba con 10 µg/ml del anticuerpo IgG murino mAb I descrito en el Ejemplo 1 que tiene la misma especificidad que los scFv (es decir, para CD3 épsilon), los desplazamientos de células teñidas con el scFv murino anteriormente mencionado o el scFv de tipo humano se reducen significativamente, subrayando la región de unión similar de los scFv y el anticuerpo murino original; véase Fig. 23 panel inferior.

25 **Ejemplo 17: Determinación de un epítipo para anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies que se unen a CD3 épsilon tanto humano como de cynomolgus**

Para determinar el epítipo de CD3 épsilon humano y de cynomolgus que se une con anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies, se llevó a cabo mapeo de epítipos con anticuerpo I (Ig que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 2 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 4) y el anticuerpo II (Ig que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 6 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 8), que se unen ambos con CD3 épsilon humano y de cynomolgus; véase también Figura 1. Para el análisis de aplicación puntual de péptidos ("pepspot"), se unieron covalentemente péptidos de 13 unidades solapantes derivados de las secuencias de aminoácidos de CD3 épsilon humano y de cynomolgus (véase Figura 15) a una membrana de celulosa -β-alanina Whatman 50 mediante el extremo C terminal mientras que el extremo N terminal acetilado permaneció libre. En los péptidos, el aminoácido cisteína, siempre que aparezca en la secuencia de CD3 épsilon correspondiente se intercambió por el aminoácido serina. Los péptidos de 13 unidades individuales generados (mediante JPT Peptide Technologies GmbH) se muestran en las Figuras 16 y 17. Para CD3 épsilon de cynomolgus, se han ensayado 43 puntos, mientras que para el CD3 épsilon humano se han ensayado 47 puntos. Se ha establecido que la longitud de la secuencia solapante de dos péptidos adyacentes es de 11 aminoácidos.

Los experimentos de pepsot se realizaron de la siguiente manera. De acuerdo con el protocolo del fabricante, la membrana se aclaró con metanol durante 1 min, se lavó con TBS 1x y se bloqueó con TBS 1x/reactivo de bloqueo 1 % (p/v) (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) of Roche Diagnostics GmbH) durante 3 h. Todas las etapas de incubación y lavado se realizaron en un agitador orbital a temperatura ambiente, excepto por la incubación durante una noche del anticuerpo primario. Directamente después de descartar la solución de bloqueo, las membranas se incubaron durante una noche con 5 o 3 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies como se ha expuesto anteriormente en TBS 1x/reactivo de bloqueo 0,5 % (p/v) a 4 °C en un agitador orbital. Después de lavar 4 veces con TBS 1x/Tween 0,05 % durante 15 min, se consiguió detección de anticuerpo anti-CD3 unido mediante incubación durante 2 h con un anticuerpo anti-IgG (específico de F(ab)₂) conjugado con peroxidasa de rábano rusticano disponible en el mercado o un anticuerpo anti-IgG marcado con fosfatasa alcalina (diluido según la recomendación del fabricante en TBS 1x/reactivo de bloqueo 0,5 %, respectivamente). Posteriormente, las membranas se lavaron 6 veces con TBS 1x/Tween 0,05 % durante 15 minutos. La peroxidasa de rábano rusticano se visualizó mediante quimioluminiscencia potenciada (solución de sustrato de luminiscencia A y solución de partida B mezcladas 100: 1; sustrato de transferencia de quimioluminiscencia BM (POD) de Roche Diagnostics GmbH) y una película BioMax (Kodak). Se visualizó fosfatasa alcalina usando sistema de sustrato líquido de 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato/nitro azul tetrazolio (Sigma).

Para excluir la unión no específica de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano rusticano, la membrana se incubó solamente con anticuerpo secundario. Todas las otras etapas se realizaron como en el experimento anterior.

El ensayo de pepsot de control (véase la figura 18(A)) mostró señales en los puntos 33 y 42 de CD3 épsilon de cynomolgus y en los puntos 37, 39 y 46 de CD3 épsilon humano. Estas señales se consideran inespecíficas y no se mencionarán adicionalmente.

1. Anticuerpo anti-CD3 I (Ig que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 2 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 4)

(i) Unión con CD3 épsilon de cynomolgus

5 Se detectaron fuertes señales de unión de anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies I (Ig que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 2 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 4) con péptidos derivados de CD3 épsilon de cynomolgus en el punto 1, así como en el tramo de puntos peptídicos 24-29 (Figura 18(B)). Este último corresponde a los restos de aminoácidos 47-69 de CD3 épsilon de cynomolgus (véase Figura 15). Todos los péptidos de 13 unidades que abarcan esta región contienen un motivo de aminoácidos mínimo 56-59 (EFSE). El punto 1 corresponde a los restos de aminoácidos 1-13 (QDGNEEMGSITQT) de CD3 épsilon de cynomolgus.

(ii) Unión con CD3 épsilon humano

15 El anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies I se unió con los puntos peptídicos 15, 28, 32, 33 y 40 derivados de CD3 épsilon humano (véase Figura 18(B)). El tramo de puntos peptídicos 28 a 33 corresponde a los restos de aminoácidos 47-69 de CD3 épsilon humano y comprende el motivo de aminoácidos mínimo 57-59 (FSE). Los puntos 15 y 40 corresponden a restos de aminoácidos 30-42 (QYPGSEILWQHND) y 71-83 (RGSKPEDANFYLY), respectivamente.

2. Anticuerpo anti-CD3 II (Ig que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 6 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 8)

(i) Unión con CD3 épsilon de cynomolgus

25 El análisis de pepspot con anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies II (Ig que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 6 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 8) mostró fuertes señales para CD3 épsilon de cynomolgus en el tramo de puntos peptídicos 27-29 así como en el punto 33 (véase Figura 19). El tramo que abarca los puntos 27 y 29 corresponde a los restos de aminoácido 53-69 de CD3 épsilon de cynomolgus (véase Figura 15), en el que los péptidos de 13 unidades tienen el tramo mínimo de aminoácidos 57-61 (FSEME) en común. El punto 33 se correlaciona con los restos de aminoácidos 65-77 (YYVSYPRGSNPED).

(ii) Unión con CD3 épsilon humano

30 El anticuerpo anti-CD3 con reacción cruzada II se unió con los puntos peptídicos 15, 19, 32 y 33, 37, 39 y 40 de CD3 épsilon humano (véase Figura 19). El punto 19 corresponde a los restos de aminoácidos 38-46d (WQHNDKNIGGDED) de CD3 épsilon humano (véase Figura 15). El tramo pequeño de puntos 32 a 33 corresponde a los restos de aminoácidos 55-69 que contienen el péptido mínimo FSELE (aminoácidos 57-61). Los puntos 37 y 39 coinciden con los restos de aminoácidos 65-77 (YYVSYPRGSKPED) y 69-81 (YPRGSKPEDANFY) de CD3 épsilon humano, respectivamente. Las correlaciones de los puntos 15 y 40 ya se han mencionado anteriormente.

40 En resumen, ambos anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies reconocen epítomos discontinuos en CD3 épsilon humano y de cynomolgus. Con respecto a CD3 épsilon de cynomolgus ambos anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies reconocieron un claro tramo solapante de puntos peptídicos 27-29 (véase Figura 16). Todos los péptidos de 13 unidades que abarcan esta región contienen un péptido mínimo FSEME (restos de aminoácidos 57-61 de CD3 épsilon de cynomolgus). La intersección peptídica en CD3 épsilon humano con la que se unían ambos anticuerpos puede determinarse para los puntos 32 y 33 (véase Figura 17). Esta sección contiene el péptido mínimo FSELE correspondiente a los restos 57-61 de CD3 épsilon humano.

45 Basándose en estos resultados se concluye que fragmentos de anticuerpo de CD3 específicos para diferentes especies entra en contacto con CD3 épsilon en el área de los restos de aminoácidos 57-61 de CD3 épsilon tanto de cynomolgus como humano que comprende los tramos de aminoácidos FSEME y FSELE de CD3 épsilon de cynomolgus y humano, respectivamente, formando el motivo FSE el núcleo epitópico. Este resultado, aunque es plausible debido a la accesibilidad del bucle E-F (aminoácidos 56-62; véase Figura 15) de CD3 épsilon humano (Kjer-Nielsen *et al.*, PNAS 101 (2004), p. 7675-80) que comprende los aminoácidos FSELE o FSEME, es no obstante sorprendente ya que no hay ningún solapamiento de este epítipo recién definido con el epítipo conocido en la cadena de CD3 épsilon de anticuerpos anti-CD3 OKT3 y UCHT1 (véase la Figura 17; Kjer-Nielsen *et al.*, en el lugar citado; Amett *et al.*, PNAS 101 (2004), p. 16268-73) que se han considerado hasta la fecha representativos de todos los anticuerpos anti-CD3 que se cree que forman una única familia con el mismo epítipo o uno muy similar.

Ejemplo 18: Determinación del epítipo para el anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies de tipo humano que se une con CD3 épsilon tanto humano como de cynomolgus

60 El mapeo epitópico del fragmento de anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies de tipo humano descrito en el Ejemplo 16 (SEQ ID NO. 170) se llevó a cabo por análisis de puntos peptídicos ("pepspot") como se describe en el Ejemplo 17. Para este fin, se convirtió dicho fragmento Fv monocatenario mostrado en SEQ ID NO. 170 en un anticuerpo IgG completo con una cadena pesada gamma1 murina que comprendía la región VH como se muestra en SEQ ID NO. 110 y una cadena ligera kappa que comprendía la región VL como se muestra en SEQ ID NO. 168. El procedimiento del experimento pepspot fue idéntico al protocolo usado en el Ejemplo 17.

La membrana de pepspot se incubó con 4 µg/ml del anticuerpo IgG1 mencionado y un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina que detecta anticuerpo de CD3 unido. Se incubó una segunda membrana con anticuerpo de cabra anti IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina solo para revelar la unión inespecífica del anticuerpo de detección.

5 Las siguientes señales detectadas en el ensayo de pepspot de control (véase la Figura 24(A)) se han considerado inespecíficas y no se mencionarán adicionalmente: los tramos de puntos teñidos 10-13,15-19, 30-32, 35-41 de CD3 épsilon de cynomolgus y 2-6,14-19, 26, 34-39 y 46 de CD3 épsilon humano.

10 (i) Unión con CD3 épsilon de cynomolgus

El anticuerpo anti CD3 específico para diferentes especies (IgG1 murino que comprende la cadena VH mostrada en SEQ ID NO. 110 y la cadena VL mostrada en SEQ ID NO. 168) se unió con los puntos peptídicos 1 y 33, así como con el tramo de aminoácidos de los puntos peptídicos 24-29 (Figura 24(B)) derivados de CD3 épsilon de cynomolgus. El tramo que abarca los puntos 24 y 29 corresponde a los restos de aminoácidos 47-69 de CD3 épsilon de cynomolgus (véase Figuras 15 y 16), en el que los péptidos de 13 unidades tienen el tramo mínimo de los aminoácidos 56-59 (EFSE) en común. El punto 1 y el punto 33 corresponden a restos de aminoácidos 1-13 ("QDGNEEMGSITQT"; SEQ ID NO. 199) y 65-77 ("YYVSYPRGSPED"; SEQ ID NO. 200) de CD3 épsilon de cynomolgus, respectivamente.

15 (ii) Unión con CD3 épsilon humano

20 Se descubrieron señales de unión del anticuerpo IgG1 anti-CD3 específico para diferentes especies mencionado con péptidos derivados de CD3 épsilon humano (véase la Figura 24(B)) en los puntos 28 y 33, que corresponden a los restos de aminoácidos 47-59 y 57-69 de CD3 épsilon humano (véase Figura 17), respectivamente. Los dos puntos teñidos comprenden el motivo de aminoácido mínimo 57-59 (FSE).

25 El anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies de tipo humano reconoce los mismos epítosos discontinuos en CD3 épsilon humanos y de cynomolgus que el anticuerpo I y II descritos en los Ejemplos 1 y 17. Las señales de unión de dicho anticuerpo de tipo humano en la membrana peptídica revelan las intersecciones peptídicas correspondientes a la secuencia de aminoácidos "FSEME" (restos de aminoácidos 57-61) de CD3 épsilon de cynomolgus y las correspondientes a la secuencia de aminoácidos "FSELE" (restos de aminoácidos 57-61) de CD3 épsilon humano como región central. Esto está en línea con el epítoto determinado para los anticuerpos anti-CD3 específicos para diferentes especies I y II en CD3 épsilon tanto de cynomolgus como humano (véase Ejemplo 17).

35 **Ejemplo 19: Verificación del epítoto identificado en CD3 épsilon humano para el anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies de tipo humano**

Para verificar el epítoto del fragmento de anticuerpo anti-CD3 específico para diferentes especies de tipo humano descrito en el Ejemplo 16 en CD3 épsilon humano, la región de unión identificada como se ha determinado en el experimento 18 se analizó adicionalmente por un ensayo de transferencia puntual usando un péptido de 13 unidades que abarcaba el área de unión definida de los restos de aminoácidos "FSELE" en CD3 épsilon humano. Este péptido comprende la secuencia de aminoácidos "EFSELEQSGYYVC" (SEQ ID NO. 195) de CD3 épsilon humano. El péptido existe en dos formas y está biotinilado en el extremo N o C terminal. En caso de marcaje N terminal, un enlazador corto conecta el péptido con la biotina. Como se ha descrito en el Ejemplo 18, el fragmento de anticuerpo se convirtió a un formato de IgG murino con una cadena pesada gamma1 murina que comprende la región VH como se muestra en SEQ ID NO. 110 y una cadena ligera kappa que comprende la región VL como se muestra en SEQ ID NO. 168.

50 La transferencia puntual se realizó de la siguiente manera. El sistema de transferencia puntual Minifold I de Schleicher & Schuell se usó para inmovilizar los péptidos en una membrana de nitrocelulosa (Protan BA 85, 0,45 µm). Se filtraron 75 µg de cada péptido en 100 µl de TBS a través de la membrana usando vacío. Después de la etapa de filtración, la membrana se bloqueó con TBS 1x/reactivo de bloqueo 1 % (p/v) (sustrato de transferencia de quimioluminiscencia (POD) BM de Roche Diagnostics GmbH) durante 2 h. Todas las etapas de incubación y lavado se realizaron en un agitador orbital a temperatura ambiente, excepto por la incubación durante una noche del anticuerpo primario. Directamente después de descartar la solución de bloqueo, la membrana se incubó una noche con 3 µg/ml del anticuerpo anti-CD3 anteriormente mencionado en TBS 1x/reactivo de bloqueo 0,5 % (p/v) a 4 °C en un agitador orbital. Como control, se aplicó el anticuerpo IgG1 murino anti-CD3 UCHT1 (BD Biosciences) que se unía con CD3 épsilon humano a una segunda membrana transferida con las mismas cantidades de los dos péptidos. Después de lavar tres veces en TBS 1x/Tween 0,05 % durante 10 min, se consiguió detección de anticuerpo anti-CD3 unido por incubación durante 2 horas con un anticuerpo anti IgG conjugado con fosfatasa alcalina disponible en el mercado (diluido de acuerdo con las recomendaciones del fabricante en TBS 1x/reactivo de bloqueo 0,5 %). Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBS 1x/Tween 0,05 % durante 10 min. La fosfatasa alcalina se visualizó usando sistema de sustrato líquido de 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato/nitro azul tetrazolio (Sigma).

65 El anticuerpo específico de CD3 mencionado que comprende la región VH mostrada en SEQ ID NO. 110 y la región VL mostrada en SEQ ID NO. 168 se unió con ambas formas del péptido "EFSELEQSGYYVC" (SEQ ID NO. 195)

transferido a la membrana (véase Figura 25 (A) (1) y (2)), mientras que no pudo obtenerse unión para el anticuerpo IgG murino anti-CD3 UCHT1 (véase Figura 25 (B) (1) y (2)). El epítipo reconocido por el anticuerpo anti-CD3 UCHT1 se describe por ejemplo en Kjer-Nielsen *et al.*, en el lugar citado; Amett *et al.*, PNAS (2204), p. 16268-73.

5 Estos resultados apoyan la identificación del epítipo recién definido del anticuerpo anti-CD3-descrito en el presente documento (con la región VH mostrada en SEQ ID NO. 110 y la región VL mostrada en SEQ ID NO. 168). Dicho epítipo corresponde a los restos de aminoácidos "EFSELEQSGYYVC" (SEQ ID NO. 195) en la cadena CD3 épsilon humana y comprende el tramo de aminoácidos "FSELE".

10 **Ejemplo 20: Generación de células CHO transfectadas con EGFR de cynomolgus**

Se usó un trozo congelado instantáneamente de colon de cynomolgus positivo para EGFR para obtener el ARN total que se aisló de acuerdo con las instrucciones del manual del kit (Qiagen, Mini Kit RNeasy).

15 El ARN obtenido se usó para síntesis de ADNc por transcripción inversa con cebadores aleatorios. Para clonación de la secuencia de longitud completa del antígeno de EGFR se usaron los siguientes oligonucleótidos:

5' EGFR AG XbaI 5' -GGTCTAGAGCATGCGACCCTCCGGGACGGCGGGG-3' (SEQ ID NO. 197)
3' EGFR AG Sall 5'-TTTAAAGTCGACTCATGCTCCAATAAATTCAGTCT-3' (SEQ ID NO. 198).

20 Se usó una PCR (desnaturalización a 93 °C durante 5 min, hibridación a 58 °C durante 1 min., elongación a 72 °C durante 2 min para el primer ciclo, desnaturalización a 93 °C durante 1 min, hibridación a 58 °C durante 1 min., elongación a 72 °C durante 2 min durante 30 ciclos; extensión terminal a 72 °C durante 5 min) para amplificar la secuencia codificante. El producto de PCR se digirió posteriormente con XbaI y Sall, se ligó en el vector de expresión digerido de forma apropiada pEF-DHFR y se transformó en *E. coli*. Los procedimientos anteriormente mencionados se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos convencionales (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)). Se transfeció un clon con secuencia de nucleótidos verificada por secuencia en las células CHO deficientes en DHFR para expresión eucariota de la construcción. Se realizó expresión de proteínas eucariotas en células CHO deficientes en DHFR como se describe en Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. Se indujo amplificación génica de la construcción aumentando las concentraciones de MTX hasta una concentración final de hasta 20 nM de MTX.

35 **Ejemplo 21: Generación de anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies de EGFR y CD3**

En general, se diseñaron moléculas de anticuerpos monocatenarios biespecíficos, que comprendían cada una un dominio con una especificidad de unión por el antígeno CD3 humano y de cynomolgus así como un dominio con una especificidad de unión por el antígeno EGFR humano y de cynomolgus, como se expone en la siguiente Tabla 1:

40 Tabla 1: Formatos de moléculas de anticuerpo monocatenario biespecífico específico para diferentes especies anti-CD3 y anti-EGFR

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones proteicas (N → C)
171/172	EGFR HL x SEQ ID NO. 170
173/174	EGFR LH x SEQ ID NO. 170
175/176	EGFR HL x SEQ ID NO. 194
177/178	EGFR LH x SEQ ID NO. 194
179/180	SEQ ID NO. 170 x EGFR HL
181/182	SEQ ID NO. 194 x EGFR HL
183/184	SEQ ID NO. 170 x EGFR LH
185/186	SEQ ID NO. 194 x EGFR LH

45 Las construcciones anteriormente mencionadas que contienen los dominios de cadena ligera variable (L) y cadena pesada variable (H) con el EGFR humano y de cynomolgus derivado de hibridomas murinos se obtuvieron por síntesis génica y posterior clonación en un vector de expresión que comprendía las combinaciones de VH y VL específicas de CD3 reactivas con el CD3 humano y de cynomolgus. En el presente documento, SEQ ID NO. 170 corresponde a secuencia de aminoácidos del scFv VH-VL anti-CD3 que comprende el VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110) y el VL de tipo humano (SEQ ID NO. 168). SEQ ID NO. 194 corresponde a la secuencia de aminoácidos del scFv VL-VH anti-CD3 que comprende el VL de tipo humano (SEQ ID NO. 168) y el VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110). Las construcciones se transfecieron después en células CHO deficientes en DHFR mediante electroporación.

55

Ejemplo 22: Expresión y purificación de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies de EGFR y CD3

Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO). Se realizó expresión de proteínas eucariotas en células CHO deficientes en DHFR como se describe en Kaufmann R.J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566. Se indujo amplificación génica de las construcciones aumentando concentraciones de MTX hasta una concentración final de hasta 20 nM de MTX. Después de dos pases de cultivo estacionario las células se dejaron crecer en frascos rotatorios con medio MEM modificado para CHO durante 7 días antes de la recogida. Las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó a -20 °C.

Se usaron el sistema FPLC de Äkta® (Pharmacia) y software Unicorn® para cromatografía. Todos los productos químicos fueron de uso en investigación y se obtuvieron de Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt). Se realizó cromatografía de afinidad metálica inmovilizada ("IMAC") usando una columna Fractogel® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A2 (tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,4 M) y sobrenadante del cultivo celular (500 ml) se aplicó a la columna (10 ml) a un caudal de 3 ml/min. La columna se lavó con tampón A2 para retirar muestra no unida. Se eluyó proteína unida usando un gradiente de dos etapas de tampón B2 (tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,4 M, imidazol 0,5 M) de acuerdo con lo siguiente:

- Etapas 1: tampón B2 20 % en 6 volúmenes de columna;
- Etapas 2: tampón B2 100 % en 6 volúmenes de columna.

Las fracciones proteicas eluidas de la Etapa 2 se agruparon para purificación adicional.

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

Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos se aislaron en un proceso de purificación de dos etapas de IMAC y filtración en gel. El producto principal tuvo un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones nativas como se determinó por filtración en gel en PBS. Este peso molecular corresponde al anticuerpo monocatenario biespecífico. Todas las construcciones se purificaron de acuerdo con este método.

Se analizó la proteína de anticuerpo monocatenario biespecífico purificada en SDS PAGE en condiciones reductoras realizadas con geles Bis Tris 4-12 % premoledados (Invitrogen). Se realizó preparación y aplicación de muestras de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. El peso molecular se determinó con patrón de proteínas MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (Protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada fue > 95 % como se determinó por SDS-PAGE.

Se realizó transferencia de Western usando una membrana Optitran® BA-S83 y el módulo de transferencia de Invitrogen de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Los anticuerpos usados se dirigieron contra el marcador His (Penta His, Qiagen) e Ig de cabra antirratón marcada con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. El anticuerpo monocatenario biespecífico podría detectarse específicamente por transferencia de Western. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente a la molécula biespecífica purificada.

Ejemplo 23: Análisis de unión por citometría de flujo de los anticuerpos biespecíficos específicos para diferentes especies de EGFR y CD3

Para ensayar la funcionalidad de las construcciones de anticuerpos biespecíficos específicos para diferentes especies con respecto a la capacidad de unión con EGFR y CD3 humano y de cynomolgus, respectivamente, se realizó un análisis de FACS. Para este fin se usaron las células de carcinoma epidermoide positivo para EGFR A431 (ATCC CRL-1555) y la línea celular de leucemia de linfocitos T humanos positiva para CD3 HPB-ALL (DSMZ, Braunschweig, ACC483) para comprobar la unión con antígenos humanos. La reactividad de unión con antígenos de cynomolgus se ensayó usando los transfectantes de EGFR de cynomolgus generados descritos en el Ejemplo 20 y PBMC de cynomolgus que se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Se incubaron 200.000 células de la población celular respectiva durante 30 min en hielo con 50 µl de la proteína purificada de las construcciones de anticuerpos biespecíficos específicos para diferentes especies (1 µg/ml). Las células se lavaron dos veces en PBS y se detectó la unión de la construcción con un anticuerpo Penta His murino no marcado (diluido 1:20 en 50 µl de PBS con FCS 2 %; QIAGEN; n.º de pedido 34660). Después del lavado, se detectaron anticuerpos anti His unidos con un anticuerpo específico para Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en 50 µl de PBS con FCS 2 %. Se usó medio de cultivo nuevo como control negativo.

Las células se analizaron por citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Se realizó tinción de FACS y medición de la intensidad de fluorescencia como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002).

5 La capacidad de unión de varias disposiciones de dominio fue claramente detectable como se muestra en las Figuras 29 a 36. En el análisis de FACS, todas las construcciones con diferente disposición de los dominios VH y VL específicos para EGFR y CD3 mostraron unión con CD3 y EGFR en comparación con el control negativo usando medio de cultivo y anticuerpo de detección 1 y 2. En resumen, la especificidad para diferentes especies del anticuerpo biespecífico para antígenos CD3 y EGFR humanos y de cynomolgus podría demostrarse claramente.

10 **Ejemplo 24: Bioactividad de anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies de EGFR y CD3**

15 Se analizó la bioactividad de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos generados mediante liberación de cromo 51 en ensayos de citotoxicidad *in vitro* usando las líneas celulares positivas para EGFR descritas en el Ejemplo 23; véase también Figuras 39 y 40. Como células efectoras se usaron linfocitos T positivos para CD8 humanos estimulados o PBMC de cynomolgus estimulados, respectivamente.

20 La generación de los linfocitos T CD8 + estimulados se realizó de la siguiente manera:

25 Se prerrecubrió una placa de Petri (85 mm de diámetro, Nunc) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible en el mercado en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. Se retiró la proteína no unida mediante una etapa de lavado con PBS. Las PBMC nuevas se aislaron de sangre periférica (30-50 ml de sangre humana o 10 ml de sangre de cynomolgus) mediante centrifugación en gradiente de Ficoll de acuerdo con protocolos convencionales. Se añadieron 3 - 5 x 10⁷ PBMC a la placa de Petri prerrecubierta en 50 ml de RPMI 1640 /FCS 10 % /IL-2 20 U/ml (Proleukin, Chiron) y se estimularon durante 2 días. Al tercer día las células se recogieron, y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y se cultivó de nuevo durante un día. Los CTL CD8+ se aislaron mediante agotamiento de linfocitos T CD4+ y linfocitos NK CD56+.

30 Las células diana se lavaron dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq⁵¹ Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con FCS 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 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de RPMI complementado (como anteriormente) con una relación E:T de 10:1 correspondiente a 1.000 células diana y 10.000 células efectoras por pocillo. Se aplicó 1 µg/ml de las moléculas de anticuerpo monocatenario biespecífico específico para diferentes especies y 20 diluciones triples 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 mediciones se realizaron por cuadruplicado. Se realizó medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes con un contador gamma Wizard 3 (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). Se realizó análisis de los datos experimentales con Prism 4 para Windows (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos). Las curvas de respuesta a dosis sigmoideas típicamente tuvieron valores de R² > 0,90 como se determinó por el software. Se usaron valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis para comparación de la bioactividad.

45 Como se muestra en las Figuras 39 y 40, todas las construcciones de anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies generadas revelaron actividad citotóxica contra células diana positivas para EGFR humano inducidas por células CD8+ humanas y células diana positivas para EGFR de cynomolgus inducidas por células CD8+ de cynomolgus. En la Figura 39, se ha usado un anticuerpo monocatenario biespecífico con un dominio variable reactivo con EGFR y dominio variable de CD3 humano desimmunizado (EGFR LH x di-anti CD3) como un control negativo. En la Figura 40, se ha usado la misma construcción (EGFR LH x di-anti CD3) como un control positivo. Como control negativo, se ha usado un anticuerpo monocatenario biespecífico irrelevante.

50 **Ejemplo 25: Generación y caracterización de anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies de carboanhidrasa IX (CAIX) y CD3**

55 Tabla 2: Formatos de anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies de CAIX y CD3

SEQ ID (nucl/prot)	Formatos de construcciones proteicas (N → C)
189/190	CAIX HL x SEQ ID NO. 170
191/192	CAIX LH x SEQ ID NO. 170
187/188	CAIX HL x SEQ ID NO. 194

60 En analogía a los ejemplos anteriormente mencionados, se crearon anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies de carboanhidrasa IX (CAIX/MN) y CD3 que contenían los dominios de cadena ligera variable (L) y de cadena pesada variable (H) reactivos con el antígeno CAIX humano y de cynomolgus y

posteriormente se clonaron en un vector de expresión que comprendía las combinaciones de VH y VL específicas de CD3 reactivas con el CD3 humano y de cynomolgus. Los experimentos se llevaron a cabo en esencia como se ha descrito en los Ejemplos 20 a 24, con las siguientes excepciones:

- 5 Los experimentos de unión de FACS se realizaron con la línea celular de carcinoma de pulmón humano positiva para CAIX A549 (ATCC, CCL-185) para evaluar la capacidad de unión con el antígeno CAIX humano. La especificidad para diferentes especies con tejido de cynomolgus se ensayó desplegando la línea celular de piel de cynomolgus CYNOM-K1 (National Institute for Cancer Research (IST) de Génova, Italia, ECACC 90071809) o la línea celular epitelial de mono Rhesus 4MBr-5 (ATCC, CCL-208). Los mismos cambios en líneas celulares se aplican a los ensayos de citotoxicidad realizados con los anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies CAIX y CD3.

- 15 Como se representa en las Figuras 26 a 28, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para diferentes especies de CAIX y CD3 generados demostraron unión con los antígenos tanto humanos como de cynomolgus y demostraron ser completamente específicos para diferentes especies. La bioactividad citolítica de las construcciones analizadas se muestra en las Figuras 37 y 38. En el panel izquierdo de la figura 37, se ha usado un anticuerpo monocatenario biespecífico con un dominio variable reactivo con CAIX y un dominio variable específico de CD3 humano desimmunizado como control positivo. En el panel derecho, se ha usado la misma construcción como control negativo.

20

Apéndice

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
1	VH	Murina	NA	gaggtgaagcttctc gagtcggggagggtgggagcagcctaaagggtcattgaaactctcatgtcagccctcaggattca ccttcaatacctacgccatgaaactgggctccagggcagggctggaaagggttggaaagggttgctcgcataaaggaaat ataataattatgcaacataattatgcccgaattcagtgaaagacaggttaccatctccaggagattcacaagacgcallctctatc tacaatgaacaacctgaaaactgagagacacagccatgactactactactgagacatgggaaactcggtaaatgcttactgttctcct gggttcttactggggccaaagggaactgggtcactctcctgca
2	VH	Murina	AA	EVKLLESGGLVQPKGSLKLSCAAASGFTFNTRYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWQGTLVTVSA
3	VL	Murina	NA	caggctgtgactcaggaactgcactcaccacatcacctgggtgaaacagcacacactcctgctcaaggtactcgggg ctgttacaactagtaactatgccaaactgggtcagaagaaaacacagatcatttactactgggtcctaaggtgtaccacaag cgagctccagggtgctccagattcicaggctccctgattggagacaaggctgccctaccattcacagggggcacagac tgaaggatgagccaataatttctgctctctatgggtacagcaacctcgggtcctgggtgggaacccaactgactgtctctta
4	VL	Murina	AA	QAVVTOESALTTSPGETVLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGG TNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTTTGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFFGGGT KLTVL
5	VH	Murina	NA	caggctcagctgcagcagctcggggcigaactgggcaagacctgggctcagtgaaagtctcctgcaaggcttctggctca cacctttactagatctacgatgacgctgggtgaaacaagacctggacagggctctggaatggattggatataatccttagc agtgcctatacaatacaatacaagaaattcaaggacaaggccacatggactgcagacaatactccagatacagcctacatgca aactgagtagcctgacatctgaggactcggagctctactctactgccaaggctcccaagtcactatgattacaacggggttctt actggggccaagggaactcgggtcactgctctgca
6	VH	Murina	AA	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFRSTMTMHWVKORPQGGLEWIGYI NPSSAYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASPQVHY DYNGFPYWGQGLVTVSA
7	VL	Murina	NA	caagttgtctaccggctccagaaatctgctgcattccaggggagaaaggtaccatgacctgcaaggtgccagctcaa gttgaagttatcaatgaactgggtaccagcagaagtcaggcactcccccaggaactccttctgactcactcaatcaggcttct

37	5-10 LHxSEQ ID NO. 12	ratón artificial	NA	<p>gagctcgtgatgacacagctccatccctccctgactgtagacagcaggagagaggtcactatgagctgcaagtcacagtcag agctcgttaaacagtggaatacaaaagaactactgaccctggtagcagcagaaaaccagggcagccctccaaactgtgctc actggggcaccactaggggaatcctgggggtccctgacgcttcacagggcaggtgtagctcggaaacagatttcacactccaccatcag cagtgtgcaaggctgaaagaccctggcagttttatttactgtagcaaatgattatgattatccgctcacagctcgggtctggaccacaagc ttgggatcaaaagggtggtggtggtctggccggccggccctccgggtggtggtggtctcagagctgctcggcagctgctcggcagcgtg ggctgagctgggtaaggccctgggacttcaggaagataatccctggcaaggctctggataccgcttcactaaactactgtagcctgg ttgggtaaaagcagggccctggacatgggacttggatggatggagatattttccctggaaagtggttaataatccactacacaatgag aagttcaaggggcaaaagccacactgactgacacaatctcgaagcactatgtagcagctcagtagcctgacattgtag gactcgtgctctatttctgccaagactgaggaaactgggacggcctatggtagcactgtagcggccaaaggggaccacgggtcacc gtctccctcgggaggtgggtagtcccaggctggtgtagcagggaaatcggcacaccacalcacctgggtgaaacagctcaca ctcactgctgcicaaactgctggggctggttaacaactgtaactatgccaaactgggtccaaagaaaacacagatcttatttact gggtcctaatagggtgtagcaaacaggcaggctcagggtgctgcccaggattcagggctccctgaitggagagacaaggctgccc ctcaccatcacaaggggcacagactgaggatgaggcaatatttctgctctatggtacagcaaacctcgggtgttcgggtg gggaaaccaaactgactgcttaggtgggtgggtgcttggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc ctcggactggagggagattggcagccctaaagggtgattgaaactcctcattgaaactcctcagcagcctcgggattcaccctcaalaccta cggcatgaaactgggtccggcaggctcagggaaagggttgggaatgggtgctcggcataagaaagtaataataataattatgca acataattatgcccgaatcagtgaaagacagggttcaccatcagagattgattcacaaaaggcattctctatctacaaaatgaacaac ttgaaaactggagacacagccatgtactactgtagtagacatgggaaactcggtaataggtagcctggttctggttcttactgg ggcacaaggggactcgtgactgctctgca</p>
38	5-10 LHxSEQ ID NO. 12	artificial	AA	<p>ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPRFTGSGGTDFTLTISSVQAEDLAVYVCQNDYSYPLTF GAGTKLEIKGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGY AFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQTTVTVSSGGGGSQAVVT QESALTTSPGETVTLICRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGNKRA PGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIFYCALWYSNLWFVGGGKLTVL GGGGGGGGGGSEVKLLESGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWN VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISRDDDSQSILYLQMN LKTEDTAMYCYVRHGNFGNSYVSWFAYWGGGLVTVSA</p>
39	5-10 LHxSEQ ID NO. 10	artificial	NA	<p>gagctcgtgatgacacagctccatccctccctgactgtagacagcaggagagaggtcactatgagctgcaagtcacagtcag agctcgttaaacagtggaatacaaaagaactactgaccctggtagcagcagaaaaccagggcagccctccaaactgtgctc actggggcaccactaggggaatcctgggggtccctgacgcttcacagggcaggtgtagctcggaaacagatttcacactccaccatcag cagtgtgcaaggctgaaagaccctggcagttttatttactgtagcaaatgattatgattatccgctcacagctcgggtctggaccacaagc ttgggatcaaaagggtggtggtggtctggccggccggccctccgggtggtggtggtctcagagctgctcggcagctgctcggcagcgtg ggctgagctgggtaaggccctgggacttcaggaagataatccctggcaaggctctggataccgcttcactaaactactgtagcctgg ttgggtaaaagcagggccctggacatgggacttggatggatggagatattttccctggaaagtggttaataatccactacacaatgag aagttcaaggggcaaaagccacactgactgacacaatctcgaagcactatgtagcagctcagtagcctgacattgtag gactcgtgctctatttctgccaagactgaggaaactgggacggcctatggtagcactgtagcggccaaaggggaccacgggtcacc gtctccctcgggaggtgggtagtcccaggctggtgtagcagggaaatcggcacaccacalcacctgggtgaaacagctcaca ctcactgctgcicaaactgctggggctggttaacaactgtaactatgccaaactgggtccaaagaaaacacagatcttatttact gggtcctaatagggtgtagcaaacaggcaggctcagggtgctgcccaggattcagggctccctgaitggagagacaaggctgccc ctcaccatcacaaggggcacagactgaggatgaggcaatatttctgctctatggtacagcaaacctcgggtgttcgggtg gggaaaccaaactgactgcttaggtgggtgggtgcttggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc ctcggactggagggagattggcagccctaaagggtgattgaaactcctcattgaaactcctcagcagcctcgggattcaccctcaalaccta cggcatgaaactgggtccggcaggctcagggaaagggttgggaatgggtgctcggcataagaaagtaataataataattatgca acataattatgcccgaatcagtgaaagacagggttcaccatcagagattgattcacaaaaggcattctctatctacaaaatgaacaac ttgaaaactggagacacagccatgtactactgtagtagacatgggaaactcggtaataggtagcctggttctggttcttactgg ggcacaaggggactcgtgactgctctgca</p>

<p>cagtgccaggctgaaacctggcagtttattactgcaagaatgattatagattaccgctccacgttcggcgtgctggaccacaaagc ttgagatcaaaaggctgggttcctggccggcggcggccggtggcgggtggggtggtggtggttggtggtggcggccgctggcctggagcagctg gagctgagctggtgaaaggcctgggactggcgtgaaatatactcggcaagggcttcggtatgggctccctcaactaactgctgctaggctagg ttgggtaaaagcagaggcctggacatggacttgagtggattggagatattttccctggaaagtggtaaatatccactacaatggag aagttcaaggcgcaaaaggccacactgactgcaagcaaaatttcgacacagccatatacgaactgagtagcctgacattggag gactcctgctattttgcaaggactggaagcaactgggacgagcctatggactactgggacggccaaaggaccacgggtcacc gctcctccggagggtgggatccggagggtgaaagctcctggctgggaggggaggattggcaggcctaaagggttcattggaaa ctctcatggcaggcctcgtgattcacctcaatctaccgcaatggactgggtcccccaggcctccaggaaagggtttgggaaat gggttcctgcataaagaaagaaataataatgcaacatattggcagatgacagtgaaaagacaggttcacatctcaccaga gattgaticaaaaggcatctctatactacaaatgaaacaactgaaacaactggacacagccatgactactggtgtagacatgg gaaactcggtaatagctactggttctgttgcttactggggcgaaggactcctggcacctcctcagggcgtggggtggtggttc tggcggcggcggcctccgggtggtggttcctcaggcctgggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtg agtcacacactgctcgaagtactgggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggt taitcactggctaatagggtggtacaacaaaggagcctcaggggtgctcaggattcaggctccctgattgggagcaaa ggctgccctcaccatacaggggcagcagacgggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggt ttcgggtgaaaccacactgactgctcta</p>			<p>40</p>	<p>5-10 LHxSEQ ID NO. 10</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>	<p>ELVMTQSPSSLTVAAGEKVTMSCKSSQSLNSGNKNYLTWYQQKPGQPPK LLIWASTRESGVDRFTGSGSDFTLTISSVQAEDLAVYCYNDYSYPLTF GAGTKLEIKGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGY AFTNYWLGWVKQRPGHLEWIGDIFPGSGNIHNEFKGKATLTADKSSSTA YMQLSLTFEDSAVYFCARLRNWDPEMDYWGQTTVTVSSGGGGSEVKLLE SGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNITYAMNWWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNLLKTEDTAMYYCVRHGNFGNS YVSWFAYWGQGLVTVSAGGGGGGGGSSQAVVTOESALTTSPGET VTLCRSSSTGAVTTSNYANWYQEKPDHLFTGLIGTNRAPGVPARFSGSLIG DKAALTIIGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGKLTIVL</p>
<p>gagctgtagacacagctcctcctcctgactgtagcagcaggagagaaggtaactatgagctgcaaggtccagtgctgcaaggtccagtgag agtctgttaaacagtggaatacaaaaagaactactgacctgacagcagcagcagaaacaggccagcctcctaactgttgatc actgggcacatccactagggaatctgggggtcccctgctgctcagcagcaggggtgatcggacaggattticacatccacatcag cagtgtagcaggctgaagaccctggcagtttattactgctcagaagtagattatccctcactggttcacggctgctgggaccacagc ttgagatcaaaagggtggttcctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc gagctgagctgggtgaaaggcctgggacttcagtagataatcctgcaaggcttctggtaccggctcctcaactaactgctgctagg ttgggtgaaagcagggcctgggacatggacttgagtggttgggattttttcccctggaaagtggtaaatatccactacaatggag</p>			<p>41</p>	<p>5-10 LHxSEQ ID NO. 16</p>	<p>artificial</p>	<p>NA</p>	<p>gagctgtagacacagctcctcctcctgactgtagcagcaggagagaaggtaactatgagctgcaaggtccagtgctgcaaggtccagtgag agtctgttaaacagtggaatacaaaaagaactactgacctgacagcagcagcagaaacaggccagcctcctaactgttgatc actgggcacatccactagggaatctgggggtcccctgctgctcagcagcaggggtgatcggacaggattticacatccacatcag cagtgtagcaggctgaagaccctggcagtttattactgctcagaagtagattatccctcactggttcacggctgctgggaccacagc ttgagatcaaaagggtggttcctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc gagctgagctgggtgaaaggcctgggacttcagtagataatcctgcaaggcttctggtaccggctcctcaactaactgctgctagg ttgggtgaaagcagggcctgggacatggacttgagtggttgggattttttcccctggaaagtggtaaatatccactacaatggag</p>

<p>42</p>	<p>5-10 LHxSEQ ID NO. 16</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>	<p>aagttcaaggcgcaaaagccacactgaactgagcaaaaatcttggagcagccctatagcagctcagctgaacatttgag gactctgctgctattcttggtaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc gtctctccggaggtgagcccaagctgaagctgctcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc ccatgacctgagctgcccagctcaagctgaagctgctcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc atttatgactcacaacaggcttgggagctcctgctgcctgctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc gcaagctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc caagctacaataaacgagctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc ctggggctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc gcactggttaaacagagccctgggagctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc agaaattcaagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc aggactctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc gtcactgctctgca</p>
<p>43</p>	<p>5-10 LHxSEQ ID NO. 14</p>	<p>artificial</p>	<p>NA</p>	<p>ELVMTQSPSSLTVAAGEKVTMSCKSSQLNSGNQKNYLTWYQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPRFTGSGGDFLLTISSVQAEEDLAVYQCNDYSYPLTF GAGTKLEIKGGGGGGGSEVQLEQSGAELVPRGTSVKISKASGY AFTNYWLGWVKQRPGHLEWIGDIFPGSGNIHYNKFKAATLTADKSSSTA YMQLSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTITVSSGGGSGVVLT QSPAIMSAFPGKEKVTMTCSASSVSYMNVYQKSGTSPKRWIYDSSKLASGV PARFSGSGTSYSLTISSMETEDAATYQCQWSRNPPTFGGKLTQITGGG SGGGGGGGQVQLQSQGAELARPGASVKMSCKASGYTFRSTMHWVKQ RPGQLEWIGYINPSSAYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSLSLTS AVYYCASPOVHYDNGFPYWGQGLVTVSA</p>
<p>43</p>	<p>5-10 LHxSEQ ID NO. 14</p>	<p>artificial</p>	<p>NA</p>	<p>gagctggagagacagctcctctctgactgagcagcagcagcaagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc agctggttaaacagctggtaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc actgggcaatccactagggaactgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc cagctgcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc ttgagatcaaacagctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc gagctgagctgtaaacagctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc ttgggtaaacagcaggcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc aagttcaagggcgcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc gactctgctgctattcttggtaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc gtctctccggaggtgagctgagcagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc agatgctcctgcaagggctctgagcagcaaacctgagcaaacctgagcaaacctgagcacttggcccaagggaccacacggctcacc</p>

<p>atggattggataatccctagcagtgcttataataaatacaagaattcaaggacaaggccacattgactgacagaca aatccctcagtagacactgagtagcctgacatctgagactctgcaactgcttactgcaagctccgcaagtc cactatgattacaacgggttctactggggcgaaggactctgctctctgcaagctggtggtgctgctggcgcg ggcctcgggtggtggtcagaagtgttctaccagctctccagaaatcattgctcattccaggggagaggtcacc atgacctgagcagcagcagaagtgaagtacatgaactggaccagagaagtcaggaccctcccaaaaagatggatt tatgactcaccaaaactggctctgggctcctgctcgtcagtgagtggtgggactcttattctcacaatcagc agcatggagactgaagatgctgccatttactgccaagcagtgaggagctgaacccaccacgctcgggggggaccaa gctacaatafaca</p>	<p>AA</p>	<p>artificial</p>	<p>5-10 LHxSEQ ID NO. 14</p>	<p>ELVMTQSPSSLTVA GEKVTMSCKSSQLNSGNQKNYLTWYQQKPPK LLIYWASTRESGVDRFTGSGGTDFTLTISSVQAEDLAVYQCNDYSYPLTF GAGTKLEIKGGGGGGGGSEVQLLEQSGAELVRPQTSVKISKASGY AFTNYWLGWVKQRPHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQTTTVSSGGGGSQVQLQ QSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRSTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSSA YTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASPQVHYDNYG FPYWGQGLTVTSAGGGGGGGGGVLTQSPAIMSAFPGEKVTMT CSASSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDSSKLASGVPARFSGSGGTSYSLTIS SMETEDAATYYCQQWSRNPPTFGGKIKLQIT</p>
<p>45</p>	<p>NA</p>	<p>artificial</p>	<p>5' EpCAM</p>	<p>ggtctagaccaccatggcccccgaggctctcggctcggg</p>
<p>46</p>	<p>NA</p>	<p>artificial</p>	<p>3' EpCAM</p>	<p>agtgggctgactttagcattgagttccctatgcatcacc</p>
<p>47</p>	<p>NA</p>	<p>ADNc de cyno- molgus</p>	<p>Parte extracelular de EpCAM de cynomolgus</p>	<p>cagaaagaatgtgctgtgaaactacaagctggccgtaaacgctttttgaaatgacaatggcaatggcagtgactcggatt ggfgcacaaaatactgctctgctcaaaagctggcggcgaatggtggatgaaaggcagaatgaaaggcgcacaaactg ggagaagagcgaaacctgaaaggctctccagaaacaaatgatggcctttacgactcctgactgagagcgggctcttt aaggccaaagcagtgcaacggcacctccacgctgctggtggtgaaacactgctggggctcagaaagaactgacaaggacactg aaataacctgctctgagc-gagtgaacacttactggatcattgaaataaaacacaaagcagaagaaacacacattatgatggt caaaagtggcggactgcacttgaggaggcgatcaaaacgcttatacaactggatccaaatattcacaataattttgatgag gataatgtaacactgctggctcaaaattctcagaaaactcagaaatgatgtagacatgctgtagcttattttttg aaaaagatgtaaaagggaatcctgtttcattcaagaaatggacctgagatgaaatggggaacaactgtagctggatcct ggtcaacttttaattatgctgagaaaaggcactgaaatcgaatgcaagggtctaaaa</p>
<p>48</p>	<p>AA</p>	<p>ADNc de cyno- molgus</p>	<p>Parte extracelular de EpCAM de cynomolgus</p>	<p>QKEVCENYKLA VNCFLNDNGQCQTSIGANTVLCSKLAAKCLVMKAEM NGSKLRRRAKPEGALQNDGLYDPDCDESLFKAKQCNGTSTCWCVNTAG VVRTDKDTEITCSERVITYWIIELKHKAREKPYDVQSLRTALEEAIKTRYQL DPKFITNILYEDNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYFEKDYKGESLFHSK</p>

49	2G8 VH	Hibridoma	NA	<p>KMDLRVNGEQQLDLDPGQLIYYVDEKAPEFSMQGLK</p> <p>gagggtcagctgagcagctgaggggagagcttgtaggtcagggggccctcagtcgaagttgcctgcacagcttcaggcttc aacattaaaggactactatftgactgggigaaagcagggccggaacaggccgigaggtgattgctgaggttgcattgga atggigataataatagccccgaagtttcagggcaaggccactataactgacagacacatccccaacacacagccctac gctcagcagcccgacatctgaggacactgcccgtctattactgtaataccccctattactacggtagtaactacgactatg ctactgggggcagaggaaacctcagtcaccgtctcctca</p> <p>EVQLQQSGAELVRS GASVKLSCTASGFNIKDYHLHWVKQRPEQGLEWIAWI DLENGDIKYAPK FQ GKATITADTSSNTAYLQLSLSLTS EDTAVVYCNPPYYYS NYDYAMDYWGQGSTVTVSS</p>
50	2G8 VH	Hibridoma	AA	<p>gatggtgatgacccagactccactcacttgcgggtaccatgggacaacccctctctctctctgcaagtcacagtcagagc ctcttatagtaatggaaaaacctatttgaacggatattacagaggccaggccagctcicaaaagccctaactatctggg tctaaactggactctgggctccctgacagggttctactggcaggtgatacaggaaacagatttacgctgaaaaatcagc aggctgaggattggggagtttattactgcgctgcaagggtacacatttctcctcacgttcgggctggggaccacaaagc aaa</p> <p>DVVM TQTPLT LSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWILQRPGQSPKRLIY LVSKLD SGVPDRFTGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFFLTFGAGT KLEL K</p>
51	2G8 VL	Hibridoma	NA	<p>gagggtcagctgagcagcagctgaggggagagcttgtaggtcagggggccctcagtcgaagttgcctgcacagcttcaggcttc aacattaaaggactactatftgactgggigaaagcagggccggaacaggccgigaggtgattgctgaggttgcattgga atggigataataatagccccgaagtttcagggcaaggccactataactgacagacacatccccaacacacagccctac gctcagcagcccgacatctgaggacactgcccgtctattactgriaatcccctactactacggtagtaactacgactatg ctactggggccaaggaaacctcagtcaccgtctcctcaggggtggtgggttcggtggtggtggtggtggtggtggtg tgatgtgatgaccagactcactcacttgcgggtaccattggacaaccagccctctctctctctcctcaaggtcaggag ccctcttatagtaatggaaaaacctatttgaacggatattacagaggccaggccagctcicaaaagccctaactatctg gtcctaaactggactctgggctccctgacaggttctactggcaggtgatacaggaaacagatttacgctgaaaaatcagc gaggctgaggattggggagtttattactgcgctgcaagggtacacatttctcctcaggttcgggctggggaccacaaagc gaaa</p> <p>EVQLQQSGAELVRS GASVKLSCTASGFNIKDYHLHWVKQRPEQGLEWIAWI DLENGDIKYAPK FQ GKATITADTSSNTAYLQLSLSLTS EDTAVVYCNPPYYYS NYDYAMDYWGQGSTVTVSSGGGGGGGGGGSDVMTQPLT LSVTIG QPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWILQRPGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFFLTFGAGTKLEL K</p>
53	scFv 2G8 VH-VL	artificial	NA	<p>gagggtcagctgagcagcagctgaggggagagcttgtaggtcagggggccctcagtcgaagttgcctgcacagcttcaggcttc aacattaaaggactactatftgactgggigaaagcagggccggaacaggccgigaggtgattgctgaggttgcattgga atggigataataatagccccgaagtttcagggcaaggccactataactgacagacacatccccaacacacagccctac gctcagcagcccgacatctgaggacactgcccgtctattactgriaatcccctactactacggtagtaactacgactatg ctactggggccaaggaaacctcagtcaccgtctcctcaggggtggtgggttcggtggtggtggtggtggtggtggtg tgatgtgatgaccagactcactcacttgcgggtaccattggacaaccagccctctctctctcctcaaggtcaggag ccctcttatagtaatggaaaaacctatttgaacggatattacagaggccaggccagctcicaaaagccctaactatctg gtcctaaactggactctgggctccctgacaggttctactggcaggtgatacaggaaacagatttacgctgaaaaatcagc gaggctgaggattggggagtttattactgcgctgcaagggtacacatttctcctcaggttcgggctggggaccacaaagc gaaa</p>
54	scFv 2G8 VH-VL	artificial	AA	<p>EVQLQQSGAELVRS GASVKLSCTASGFNIKDYHLHWVKQRPEQGLEWIAWI DLENGDIKYAPK FQ GKATITADTSSNTAYLQLSLSLTS EDTAVVYCNPPYYYS NYDYAMDYWGQGSTVTVSSGGGGGGGGGGSDVMTQPLT LSVTIG QPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWILQRPGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFFLTFGAGTKLEL K</p>

70	2G8LHxSEQ ID NO.16	artificial	AA	<p>ctctgcaagtcttaattgcaagcccaagcccaattgattacaacggggttcccttaactggggcccaaggagactctgggtca ctgtctctgca</p> <p>DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWILQRPQGQSPKRLIY LVSKLDSGVPDRFTGSGSOTDFILKISRVEAEDLVVYCVQVQGFHPLTFGAGT KLELKGSGGGGGGSEVQLQSQGAELVRSASVLSCTASGFNIKD YYLHWVKORPEQGLEWIAWIDLENGDIKYPKQFKATITADTSSNTAYLQL SSLTSEDTAVYYCNPYYGSDYAMDYWGQGTSTVSSGGGGSQVVLVQ SPAIMSAFPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDSSKSLASGVP ARFSGSGTSYSLTISSMETEDAATYQCQWSRNPPTFGGGTKLQITGGGGG GGGGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFRSTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCASPQVHYDYNQFPYWGGQLVTVSA</p>
71	2G8LHxSEQ ID NO.14	artificial	NA	<p>gatgttgatgaccagactccactctttgtggttacattggacaaccaggccctctctctctctcaagtcaagtcagagc ctcttataataatggaaaacatttgaactggattatcagaaggccaggccagctcccaaaaggccctaatctctctgggig ctaaactggactctgggtccctgacaggttcaactggagtgatcaggaaacatcttctgctgctgggagaccagagtgts aggtctgaggtttgggttattactctgcaagggtacacattttctctcactgctgctgctgggagaccagagctgggagctg aaagggtggttctgggtctggcggcggcggcggcgggtggttctgaggtttcagctggcagagctgggagagagagct tgtgaggtcagggccctcagcaagttgtctctgacacagctctgcttcaacattaaagactattttgcaactggggtgaaagc agaaggcctgaacagggcctggagtggttgcctgggattgatcttgaagatggtgattaaatgccccgaagtttcagggg caaggccactaaactgacagacacatctcacaacacagctcagcagcagctcagcagcagcagcagcagcagcagcagc cttattactgtaacccttattactacgggtgtaactacgactatgctatgggactgggggtcgaaggaaacctcagtcaccgctc ctcggaggtggggtccagggctcaggctgcaaggctggggctgaaactgggcaagacctggggctcagctgaaagatg tcctgcaaggctctggctacacctttactacgatctacgatgacactgggtgaaacagagacctgggacagggctctggaaatgga ttggatacaataactcagagctgcttataactaataatacaatacaagaaatcaagagccacattgactgcaagacaatcct ccagctacagcctacatgcaactgagtagctgacatctgagactctgcaactgctattactgcaaggtccgcaaggtccactat gattacaacgggttcttaactggggcccaaggactctggctcactgctctgcaagggtggttctggcggcggcggcggc ccgggtgggtgggtctcaaggtgtctcaacccagctcagcaaatgatgctgctcatttcaggggagaaaggtcaccatgacc tgcagtgcccaagctcaaggtgtaaagtacagaaactgggtaccagcaagagctcagcaccctcccccaaaagatggattatgact catccaaaactggcttctggagtcctgctcgtttcaggtggcaggtggggtctgggaccttattctctcacaatcagcagcagc ggagactgaaagatgctggccacttattactgcaagctgaggtgtaaccccccacaggtcgggagggggggaccacaagctaca aattaca</p>
72	2G8LHxSEQ ID NO.14	artificial	AA	<p>DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWILQRPQGQSPKRLIY LVSKLDSGVPDRFTGSGSOTDFILKISRVEAEDLVVYCVQVQGFHPLTFGAGT</p>

<p>KLELKGSGGGGGSEVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKORPEQGLEWIAWIDLENGDIKYAPKFOGKATITADTSSNTAYLQLSLSLSEDTAVYYCNPYYGSDNYDYAMDYWGQGTSTVSSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFRSTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSAYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSLSLSEDSAVYYCASPVHYDYNFPYWGQGTLLVTVSAGGGGGGGGGGQVLTQSPAIMSAFPGEKVTMTCASSSVSVMNWWYQQKSGTSPKRWIYDSSKSLASGVPARFSGSGGTSYSLTISSMETEDAATYQCQWRSRNPPTFGGGLKQIT</p>	<p>gaaggttcagctgcagcagctcggggcagagcttggaggtcagggggcccaagctgctctgcacagcttgcgttcacattaaagactactattgcacagggtgaagcagaggccctgaacaggggcctggagggattgctggattgatcttgagaatgggatataaataatgcccgaagtttcaaggcgaaggccactaataacifcagacacalccccaacacagccctaccctggcctcagcagccctgacatcctgaggacacactgcccctgcttacttactgtaacccttacttactgtagtaactacgactatgctatggactcactggctcaaggaaacctcagaccctcaccgctcctcactcaggtgggtgggttctggcggcggcggctccgggtgggtgggttcctctctatataagtaagaaaccttggaaactggatattacagaggccaggccagctcctcaaaaggccctaaatctatctgggtctaaactggactcctggacagggcttcaactggactcaggtggatcaggaaacttttactgctgcaaaatcagcagaggtgggctgaaggtttggggattttattactgctgcaagggttacacatttctcactgctggctggggaccaggctggggctgaaatccggagggtgggtggatcccaggctgttgactcaggaaatcggcactaccacatcaccctggfgaacacagctcacactcaccttgcctcaagctggggctgctgtaacactgtaacactggcaactggggcctcctcaaaaggccctaaatctatctgggtctaaactggactcctggacagggcttcaactggactcaggtggatcaggaaacttttactgctgcaaaatcagcagaggtgggctgaaggtttggggattttattactgctgcaagggttacacatttctcactgctggctggggaccaggctggggctgaaatccggagggtgggtggatcccaggctgttgactcaggaaatcggcactaccacatcaccctggfgaacacagctcacactcaccttgcctcaagctggggctgctgtaacactgtaacactggcaactggggcctcctcaaaaggccctaaatctatctgggtctaaactggactcctggacagggcttcaactggactcaggtggatcaggaaacttttactgctgcaaaatcagcagaggtgggctgaaggtttggggattttattactgctgcaagggttacacatttctcactgctggctggggaccaggctggggctgaaatccggagggtgggtggatcccaggctgttgactcaggaaatcggcactaccacatcaccctggfgaacacagctcacactcaccttgcctcaagctggggctgctgtaacactgtaacactggcaactggggcctcctcaaaaggccctaaatctatctgggtccatgcaactgggtcccaggctccaggaaagggtttggaaatgggttggctcggcatalaaggaaataataataatgcaacatattatgccgattcagtgaaagacagggctcaccatccaggatgattcacaaggcattctctatctacaaaaggaaacaacttgaaaactggggactcgggtcactgctcggca</p>	<p>73</p>	<p>2G8HLxSEQ ID NO.12</p>	<p>artificial</p>	<p>NA</p>
<p>EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKORPEQGLEWIAWIDLENGDIKYAPKFOGKATITADTSSNTAYLQLSLSLSEDTAVYYCNPYYGSDNYAMDYWGQGTSTVSSGGGSGGGGGSDVVMVTQPLTSLVTIGQPASICKSSQLLYSNGKTYLNWILQRPQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYCVQGTFFPLTFGAGTKLELKSGGGGSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKR</p>	<p>ggcccaaggggactcgggtcactgctcggca</p>	<p>74</p>	<p>2G8HLxSEQ ID NO.12</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>

77	2G8HLxSEQ ID NO.16	artificial	NA	<p>gaggttcagctgcagcagctggggcagagcttgtaggagggggcctcagtcagggttccttcaggcagcagcttcctgcttc aacattaaagactactattttgacatgggtgaaagcagagggccggaacagggccggatggcctggatggatgacatctgaga atggatgataaataatgcccgaagtttcaaggcaggccactataactgcagacacatctccaacacagccttacctgca gctcagcagccctgacatctgaggaactccgctctattactgtaacctcccttactactagtagtaactactgactatgctatggg ctacgggggtcaaggaaacctcagcaccgctcctcagggggtgggttctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc tgatgttgatgaccagacaccactctttgctggctaccattggaaaccagccctctactctgcaaggccaagtcagag cctctatatagtaatggaaaacctatttgaactggatattacagagggcagccagctccaaaagcgcctaatctatctggt gctaaactggactctggagtcctgacaggttctgagaggttctgagaggtgagcaggaacagattttacgctgaaatcagcagatg gaggctggagatttgggagtttattactgctgcaagggtacacatcttctcagctgcggcgggcaaaagcctgggagcct gaaatccggagggtgggagctcagaggttttactgctcaccaggtccagcaatcagctgctcaggggggagaaaggctcacc atgacctgcagctgccagctcaagtgtaaggattacatgaactgggtaccagcaagcaagcaagcctcccacaagaatggatt tatgactcatcaaaactggctctggagctcctgctcagctgagctggcagctggggctgaggccttattctcacaatcagc agcatgggagctgaaagatgctgccacttactgcccagcagctgagggctgctgaaaccacacgctcgggggagggggacc gctacaanaatiacaggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt gggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt tgggtaaaacaagggcctggagcaggctggaatggatggatgatacattaactcctagcagctgcttataactaatiacaacaga aticaaaggacaaggccacatgactgcagacaatcctcagtagacccatcagcaactgagtagccctgacatctggaggga ctctgacgtcttacttgcaagctcggcaagctccactatgattacaacgggttctcctactggggccaaggagctctgggtca ctgctctgca</p>
78	2G8HLxSEQ ID NO.16	artificial	AA	<p>EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVVKRPEQGLEWIAWI DLENGDIKYAPKFGKATITADTSSNTAYLQLSLLTSED TAVYYCNPPYYGS NYDYAMDYWGQTSVTVSSGGGGGGGGGGSDVVMQTPLTSLVITIG QPASICKSSQSLLYSNGKTYLNWILQRPQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYCVQGTHFPLTFGAGTKLELKSGGGGSQVVL TQSPAIMSAFPEKVTMTCSASSVSVMNWFYQKSGTSPKRWYDSSKLSAG VPARFSGSGGTSYSLTISMETEDAATYCCQWSRNPPTFGGKLTITGGG GSGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPASVKMSCKASGYTFTRSTRMHWVK QRPQGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCASPQVHYDYNFPPYWGQGLTVTVA</p>
79	2G8HLxSEQ ID NO.14	artificial	NA	<p>gaggttcagctgcagcagctggggcagagcttgtaggagggggcctcagtcagggttccttcaggcagcagcttcctgcttc aacattaaagactactattttgacatgggtgaaagcagagggccggaacagggccggatggcctggatggatgacatctgaga atggatgataaataatgcccgaagtttcaaggcaggccactataactgcaacacatctccaacacagccttacctgca gctcagcagcctgacatctgaggactccgctcttactgtaacctcccttactactgtaggtagtaactactgactatgctatgggga</p>

			<p>ctactgggggtcaaggaaacctcagtcaccgtctcctcagtggtgggttctggctggccggcgccggtgggtgggtgggttc tggatgggtggagcccgactcactacttgcggtiaccattggacaaccaggcctctctctcgtcgaaggcacaagtcagag cctctatataagtaatggaaaaacatttgaaactggatattacagagaccaggcccaagctcctcaaaagcgcctaatactatctgggt gctaaactggactctggagtccttgacaggggttactggcagtgatcagaaacagatllaacgctgaaaatcagcagatgg gagcctgagattgggggtttactgctgcaaggttacacattttctcaccgttctgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt gaaatcggaggggtggtggatcccagggctggcagcagcctgggggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt gatgtcctggcaaggctctggctacacctttactagatctagcagtgactggtaaaaaagggccctggacaaggggtggaa tggattggatacattaaactgagctgcttatacaattcaaatcaaggcaagggccacattgactggcagcaaa alcctccagtlacagcclacatgccaactgagtagcctgacatctgaggactctgactctattactggcgaagtccggcaagtc actatgattacaacgggttctctactggggccaaaggactctggcactctgctgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt cggctcgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt tgacctgagtcggcctcaaggttaagtlacatgaactgggtaccagcaggaagtcaggcaccctcccccaaaaagatgggtt atgactcaccaaaactgggttctggaggtcctgctcggctcagtgaggcgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt gcatggagactgaagtgctggcacttactggcaggcagtgaggctgtaacccacacacgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt gctacaattaca</p> <p>EVQLQQSGAELVRSASVKLSCTASGFNIKDYIHLHWVVKRPEQGLEWIAWI DLENGDIKYAPKFGKATITADSSNTAYLQSSLTSEDIAVYYCNPYYIGS NYDYAMDYWGQTSVTVSSGGGGGGGGSDVMTQPLTSLVTIG QPASICKSSQLLYSNGKTYLNWILQRPQSPKRLIYLVKLDGVPDRFTGS GSGDTFTLKISRVEAEDLGVYVQVQGTGTHFPLTFGAGTKLELKSGGGGSVQL QQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRSTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSS AYTNYNQFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSTSESAVYYCASPVHYDYN GFPYWGQGLVTVSAGGGGGGGGGSVVLTQSPAIMSAFPGEKVTM TCSASSSVSYMNWYQKSGTSPKRWYDSSKSLASGVPARFSGSGGTSYSLTI SSMETEDAATYYCQQW\$RNPPTFGGKIQIT</p> <p>5'-SAGGTGCAGCTCGAGGAGTCAGGACCT-3' 5'-GAGGTCCAGCTCGAGCAGCTGAGCCT-3' 5'-CAGGTCCAACTCGAGCAGCCTGGGGCT-3' 5'-GAGGTTTCAGCTCGAGCAGCTGGGGCA-3' 5'-GAGGTGAAGCTCGAGGAGCTGGAGGA-3' 5'-GAGGTGAAGCTCTCGAGTCTGGAGGT-3' 5'-GAAGTGAAGCTCGAGGAGTCTGGGGGA-3'</p>
80	2G8HLxSEQ ID NO.14	artificial	AA
81	Cebador 5' VH	artificial	NA
82	Cebador 5' VH	artificial	NA
83	Cebador 5' VH	artificial	NA
84	Cebador 5' VH	artificial	NA
85	Cebador 5' VH	artificial	NA
86	Cebador 5' VH	artificial	NA
87	Cebador 5' VH	artificial	NA

88	Cebador 5' VH	artificial	NA	5'-GAGGTTTCAGCTCGAGCAGCTGGAGCT-3'
89	Cebador 5' VH	artificial	NA	5'-GGGCTCGAGCACCATGGRATGSAAGCTGKGTMATSCCTCTT-3'
90	Cebador 5' VH	artificial	NA	5'-GGGCTCGAGCACCATGGRATGSAAGCTGKGTMATSCCTCTT-3'
91	Cebador 5' VH	artificial	NA	5'-GGGCTCGAGCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT-3'
92	Cebador 3' VH	artificial	NA	5'-GAGGAATTCGAATCGAACTGGACAGGATCCAGAGTTCC-3'
93	Cebador 3' VH	artificial	NA	5'-CGGAATTCGAATGACATGGACATCTGGGTCAATCC-3'
94	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT-3'
95	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT-3'
96	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT-3'
97	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT-3'
98	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT-3'
99	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT-3'
100	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT-3'
101	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-GGGAGCTCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'
102	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-GGGAGCTCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'
103	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-GGGAGCTCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'
104	Cebador 5' VL	artificial	NA	5'-GGGAGCTCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'
105	Cebador 3' VL	artificial	NA	5'-GAGGAATTCGAATCGAACTGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'
106	Cebador 3' VL	artificial	NA	5'-CGGAATTCGAACAACACTCTTCTCCACAGTGTGACC-3'
107	Cebador 3' VH	artificial	NA	5'-TATGCAACTAGTACAACCAATCCCTGGG-3'
108	Cebador 3' VL	artificial	NA	5'-GCGCCGCTAGAAITTAACACTCATTCCTGTGAA-3'
109	5-10Lhxdesinmuni -zado (di) anti- CD3	artificial	AA	ELVMTQSPSSLTIVTAGEKVTMSCKSSQLNSGNQKNLYLTWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVDRFTGSGGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTF GAGTKLEIKGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGY AFTNYWLGWVKQRPHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEFKGKATLTADKSSSTA YMQSSLTFEDSAVYFCARLRNWDPEMDYWGQGTITVTVSSGGGSDVQLV QSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRG YTNVADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHYCLDY WGQGTITVTVSSGEGTSTGSGGGGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQSVSYMNWYQQKPKAPKRWYDTSKVASGVPARFSGSGGTDYSLTNS LEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIK
110	VH de tipo humano	artificial	AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARI

111	VH de tipo humano	artificial	NA	<p>RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGGTLVTVSS</p> <p>gaggcagctgcicgagctcggaggaggattggcagcctggaggcattgaaac teatgagccctggattaccctcaataccctacccatgaactgggctccaggct ccaggaaagggttggatggctcgcataagaagaataataataatgcaaca tattatgccgattcagtgaaagacaggttaccatcaccagatgattcaaaaaaac gcctatcacaatgaacaactgaaaactggagactgctgctactactggtgaga catgggaacttggtaagctacgttctggttgcctactgggccaagggactctg gtcaccgtctctca</p>
112	VH: CDR3	murina	AA	HGNFGNSYVSWFAY
113	VH: CDR3 corta	murina	AA	VSWFAY
114	VH: CDR2	murina	AA	RIRSKYNNYATYYADSVKD
115	VH: CDR1	murina	AA	TYAMN
116	VL: CDR3	murina	AA	ALWYSNLWV
117	VL: CDR2	murina	AA	GTNKRAP
118	VL: CDR1	murina	AA	RSSTGAVTTSNYAN
119	VH: CDR3	murina	AA	PQVHYDYNPFY
120	VH: CDR2	murina	AA	YINPSSAYTNYNQFKD
121	VH: CDR1	murina	AA	GYTFRSTMH
122	2G8 LHxSEQ ID NO. 146	artificial	AA	<p>DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQLLYSNGKTYLNWILQRPQSPKRLIY LVSKLDSGVPDRFTGSGGTDFTLKISRVEAEDLVYYCVQGTFFPLTFGAGT KLELKGSGGGGGGGSEVQLQQSGAELVRSVASVLSCTASGFNIKD YYLHWVKRPEQGLEWIAWIDLENGDIKYPKFGKATITADTSSNTAYLQL SSLTSEDATAVYYCNPYYGNSYDYAMDYWGQTSVTVSSGGGGSEVKLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY VSWFAYWGGTLVTVSSGGGGGGGGSELVVTQESALTTSPGETVT LTCRSSTGAVTTSNYANWQEKPDHLFTGLIGGTTNKRAPGVPARFSGSLIGD KAALTTGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLHHHHHH</p>
123	2G8 LHxSEQ ID NO. 146	artificial	NA	<p>gatgtgtagaccagaccacacacttctcgttaccattggacaaccagccctctcttccaagtcaagtcagagc ctctatataagtaatggaaaaacatttgaactggatattacagagccagccagctcacaaggccctaaatctctggg tctaaactggacttggagctccctgacaggttactggcagtgatggaaacagatttaccgctgaaatcagcagagtg</p>

124	5-10 LHxSEQ ID NO. 146	artificial	AA	<p>aggctgaggattgggaagttaactgcgcaagggtacacatttctcactcaggcttcgggctggggaccagaagctggggagctg aaagggtgggtgggtttctggccggccggctccgggtgggtgggtttctgggtttctgggtttcaagctgcaagctggggcagagct tgtgaggctcaggggccctcagicaagttgtcctgacacagcttcaggcttcaacattaaagactactatttggcactgggtggaaagc agaagccctgaacaggccctggaggtggattgcttgattgcttggaatgggtgataataaataatgccccgaaagtttccagggg caaggccactataactgcagacacatctcacaacacagcctacctgcagctcagcagcctgacatctgagggacacctggccc tctattactgtaatccctattactacggtagtaactacgactatgctatggactactggggcaaggaacctcagacacctggcctc ctccggaggtgggtggatccgggtgaaagcttctgggtcggaggggattgggtcagcctggaggggttcattgaaactct catggcagccctggattaccctcaaacctacgcatgaaactgggtccgccaagctcaggaaggggtttggaaatgggt tgcctgcataaagaagtaataataatgaacataatgccaacatattgcccagttcagtgaaagacagggttcacacctccagagatga ttcaaaaaaacacctccctactacaacatgaacaacttgaacaactggagacactgcccgtgactactggtgagacatggggaaac ttggtaataagctactgttctgggttctgctactggggccaaagggactctggctaccgctcccaaggggtgggtctggctggc ggccggctccgggtgggtgggtttctgagctcgttggactcaggaatctgcactcaccacatcaccctgggtgaaacagctc acactcattgtcgtcgaagtactggggctgttacaactgtaacatgccaactggggctcaagaaacacagatcatttatttc actggctaaatgggtgaaacaaaggcagcaccaggtgctggccagattctcagcctccctgattggagacaaggct gccctcacatcacaggggcacagactgaggatgaggcaataatttctgctctatgggtacagcaaacctctgggggttctg gtggaggaaaccaactgactgctcaatcattacatcatcat</p> <p>ELVMTQSPSSLVTAGEKVTMCKSSQSLNNGNQKNYL TWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVDRFTGSGSDFTLTSSVQAEDLA VYVCQNDYSYPLTF GAGTKLEIKGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGY AFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFP GSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSLTFEDSAVYFCARLRNWDPEMDYWGQGT TVT VSSGGGGSEVKKLE SGGGLVQPGGSLKLSCAAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYCVRHGNFGNS YVSWFAYWGQGLTVTSSGGGGGGGGSELVVTQESALTTSPTGETV TLTCRSSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGD KAALITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWFVFGGGTKLTVLHHHHHH</p>
125	5-10 LHxSEQ ID NO. 146	artificial	NA	<p>gagctcgtgatgacacagctccctccctgactgtagacagcagggaggaggaaaggctactatgagctgcaagctcagctcag agctcgtfataacagtggaatacaaaaagaactacttggactggtagcagcagaaaccaggggcagcctctctaaactgttggatct actggggccatccactaggggaatctgggggtcccctggatccttcacagggcaggtggatctggaaacagatttacttccaccatcag cagtgctcagggctgaaagacctggcagtttattactgcaagaatgattatagttatccctcagcttcacgttctgggtgggaccagaagc ttgagatcaaaagggtgggtttctggcggcggcggcgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt ggagctgagctgggtgaaaggcctggggacttcagtgaaagataccctgcaaggcttctggalacccttcactaaactactactgctaggg ttgggtgaaaggcagggggccctgggacatgggacttggagttgggatatttttccctgggaagtggtaataatccactactacaatgag</p>

126	FN18 VH	Híbridoma	NA	<p>aaagttaaaggcaaaagccacactgactgacagacaataatctcagcacaagcctataatgacagctcagtagcctgacattggag gactctgctctattctctgcaagacgaggaactgggacgagcctatggactactggggcgaagggaccacagggctcacc gtctccggaggggtggatccggagctgaaagctctcggagctggaggggagatggctcagccctggagggctcaltgaa actctatgtagcagcctcggaltaccctcaaacctaccgccaatgaaactgggctccgagggctccagaaagggtttggaa tgggttgcctgcataaagaaataataataataatgcaacataattatgccaattcagaaagaaagacagggttcaccatctccaga gatgattcaaaaaaacactgctctacaaatgaaacaactgaaaaactggagacacggcctggctactactggtggagacatg ggaaactggtaataagctactggtttctggtttcttactggggcgaaggggactctggcctcctcctcaggggtgggt ctggcggcggcggctccgagctgagggctgggtctgggtctggttggactcagggaaatcggcactaccacatcaccctgggtgaaa cagttcacactactgctcaagactggggctggttacaactagtaactatgccaactgggccaagaaaaccagatca tttattcactgggtctaaagggtaccacaagggcaccagggtggcctggcagattcagggctccctggattgggagaca aggctggcctcaccatcacaggggcacaagactgaggggcaataataatttctggctctatgggtacagcaaacctctgggt gtcgggtggaggaaacaaactgactgctctacatcaccatcatcat</p>
127	FN18 VH	Híbridoma	AA	<p>caggteagctgcaagctgaaagctgaaactggcaagaccctggggcctcagtgaaagatgctcctggcaaggcttctggccta cacccttactgactacacgatacactgggtaaaacagaggcctggacagggtctggactgggattggatatttaattccttagca gtgaatctactgaatacaatcggaaatcaaggacagaccatattgactgcaagacagatctcacaaccacagcctacatgc aaactgagcagcctgacatctgaggactcggcgttacttactgttcaaggaaaggggagaaactacttggtaaacggttactg gtactgctgctggggcgcaggaccctggctcaccgctcctca</p> <p>QVQLQQSEAEELARPGASVKMSCKASGYTFTDYTIHWLKRQPGQGLDWIGYF NPSSSETEYNRKFDRILTADRSSTTAYMQLSLSLTSSEDSAVYYCSRKGEKLL GNRYWYFDVWGAGTSVTVSS</p>
128	FN18 VL	Híbridoma	NA	<p>gacattgtagtcacagctccatcctccctagcgtgtagtgaggagaaagggtactactatgagcctggcaagctcagctcagag ccttttataatagtagcaatacaaaagaaactactggcctggctaccagaaaggccaaggggcagctcctcaaaattgctgattaact gggcataccaccagggaaatctggggctcctgctcctcagcagggcagggatctagagacagatttcactctcaccatcagca gtggaaggctgaaagacctggcagtttattctgctcagcaattttatgattatcctccgacgttcgggtggaggccacaaggctgg aaatcaaa</p>
129	FN18 VL	Híbridoma	AA	<p>DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLL LINWASTRESGVDRFTGSGSRITDFLTISSVKAEDLAVYFCQQFYSPPTFGG GTKLEIK</p>
130	scFv VH-VL FN18	artificial	NA	<p>caggteagctgcaagctgaaagctgaaactggcaagaccctggggcctcagtgaaagatgctcctggcaaggcttctggccta cacccttactgactacacgatacactgggtaaaacagaggcctggacaggggtctggactggattggatatttaattccttagca gtgaatctactgaatacaatcggaaatcaaggacagggaccatattgactgcaagacagatcctcaaccacagcctacatcgc aaactgagcagccctgacatctgaggactcggcggctctattactgttcaaggaaaggggagaaactacttggtaaaccttactg gtactcagatgctggggcgcaggaccctcgtcaccgtctcctcaggggtgggtgggttctgggcggcggggcctccgggtg</p>

131	scFv VH-VL FN18	artificial	AA	<p>gfggggtictgacatigtgatgacagtcacagtcctccatccctccctagctgtgctcagttggagagaaagggtactatgagctgcaagt ccagtcagagccctttttatagtagcaaacaaaagaactacttggccctggtaaccagagaaagccagagcaagccaggcagctctctaaatt gctgattaactgggcatccaccaggggaatctggggtccctgctgcttcacagggcagtggtgactagacagatttactctc accatcagcagtgtaggagctgaagaccggcagtttattcttcagcaattttatagttatcctccgacgttccggggagcc accaagctggaaatcaaa</p> <p>QVQLQQSEAEELARPGASVKMSCKASGYTFTDYTIHWLKRQPGQGLDWIGYF NPSESTEYNRKFDRILTADRSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCSRKGEKLL GNRYYWYFDVWGAGTSVTVSSGGGGGGGGSDIVMSQSPSSLA VSVG EKVTMSCKSSQLLYSSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLLINWASTRESGVDRF TGSGRTRDTFTLISSVKAEDLAVYFCQFYSPPTFGGGTKLEIK</p>
132	scFv VL-VH FN18	artificial	NA	<p>gacattgtagtcacagtcctccctccctagctgtgctcagttggagagaaagggtactatgagctgcaagtcacagtcagag ccttttatagtagcaaacaaaagaactacttggccctggtaaccagagaaagccagggcagctctctaaattgctgattaact gggcatccaccaggggaatctggggctccctgctgcttcacagggcagtgatctagacagatttactctcaccatcagca gtgtgaaaggctgaaagacctggttattcttctcagcaattttatagttatcctccgacgttccggggagggcaccagctggg aaatcaaaagggtgggttctggcggcggcctgggtgggtgggttctcagggcagctggcagcagctggaagct gaactggcaagacctggggccctcagtgaaagatgctctgcaaggcttctggctacacccttactgactacacagatacactggg taaaacagagggcctggacagggctggactggatggatatttaatttaactcctagcagtgaaatctactgaatacaatcgggaaatc aaggacagggaccatattgactgcagacagatcccaaccacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctggaggac tggggctattactgttcaagggaaggggggaactacttggtaaccgttactgggtacttgggtacttggggggcagggggacc tcggtcaccgctcctca</p> <p>DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQLLYSSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLL LINWASTRESGVDRFTGSGSRTRDTFTLISSVKAEDLAVYFCQFYSPPTFGG GTKLEIKGGGGGGGGGGVQLQSEAEELARPGASVKMSCKASGYTF TDYTIHWLKRQPGQGLDWIGYFNPSESTEYNRKFDRILTADRSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCSRKGEKLLGNRYWYFDVWGAGTSVTVSS QDGNNEEMGGITQTPYKVISIGTIVLTCPQYPGSEILWQHNDKNIIGDEDDKN IGSEDEHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD</p>
133	scFv VL-VH FN18	artificial	AA	<p>DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQLLYSSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLL LINWASTRESGVDRFTGSGSRTRDTFTLISSVKAEDLAVYFCQFYSPPTFGG GTKLEIKGGGGGGGGGGVQLQSEAEELARPGASVKMSCKASGYTF TDYTIHWLKRQPGQGLDWIGYFNPSESTEYNRKFDRILTADRSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCSRKGEKLLGNRYWYFDVWGAGTSVTVSS QDGNNEEMGGITQTPYKVISIGTIVLTCPQYPGSEILWQHNDKNIIGDEDDKN IGSEDEHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD</p>
134	Parte extracelular de CD3 épsilon	ADNc humano; NM_000733	AA	<p>QDGNNEEMGGITQTPYKVISIGTIVLTCPQYPGSEILWQHNDKNIIGDEDDKN IGSEDEHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD</p>
135	Parte extracelular de CD3 épsilon FN18+	ADNc de cynomolgus; AB073993	AA	<p>QDGNNEEMGGITQTPYKVISIGTIVLTCPQYPGSEILWQHNDKNIIGDEDDKN FLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSKPEDASHHLYLKRARVCENCMEMD</p>

136	Parte extracelular de CD3 épsilon FN18-	ADNc de cynomolgus; 073994	AA	QDGNEEMGSITQTPYQVSI SGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKGDSGDQL FLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLLYLKARVCENCMEMD
137	Parte extracelular de EpCAM	ADNc humano	AA	QEEVCENYKLA VNCVFNRRQCQCTSVGAQNTVICSKLA AKCLVMKAEM NGSKLGRRAKPEGALQNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAG VRRTDKDTTEITCSERVTYWIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLD PKFITSILYENNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSHK MDLTVNGEQLDLDPGQTLIYVDEKAPEFSMQGLK
138	Parte extracelular de EpCAM	ADNc de chimpancé	AA	QEEVCENYKLA VNCVFNRRQCQCTSIGA QNTVICSKLA AKCLVMKAEMN GSKLGRRAKPEGALQNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGV RRTDKDTTEITCSERVTYWIIELKHKAREKPYDGKSLRTALQKEITTRYQLDP KFITNILENNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSHK DLTVNGEQLDLDPGQTLIYVDEKAPEFSMQGLK
139	Parte extracelular de EpCAM	ADNc de Rhesus	AA	IDENTICAL WITH CYNOMOLGUS EPCAM SHOWN IN FIG. 6 AND SEQ ID NO. 48
142	Parte extracelular de CD3 gamma humana	ADNc humano: NM_000073	AA	QSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKKWN LGSNAKDPGRMYQCKGSKPLQVYRMCQNCIELN
143	Parte extracelular de CD3 delta humana	ADNc humano: NM_000072	AA	FKPIEELEDRVFNCSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGT DIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPAT
144	Parte extracelular de CD3 gamma de cynomolgus	ADNc de cynomolgus : NM_000073	AA	QSFEE NRKLN VYNOEDGSVLLTCHVKNTNITWFKEGKMIDILTAHKNKWNL GSNTKDPGRVYQCKGSKDKSKTLQVYRMCQNCIELN
145	Parte extracelular de CD3 delta de	ADNc de cynomolgus:	AA	FKIPVEELED R VFKCNTSVTWVEGTVGTLLTNTRLDL GKRILDPRGIYRCN GTDIYKDKESA VQVHYRMCQNCVELDPAT

155	scFv EGFRvIII LH	artificial	AA	gcaaggccacattgactgtagacaaggcttcagcacagccctacacggaccctccgacgctcgaaggtcggattctgcag gtctattacgcacaagagcagaggcctatggactactggggtgtaaggaaccicagaccgctccctcc DVVMTQTPLTLVITIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPGQSPKRLI YLVSKLDSGVPRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYCVQDTHFPQIFGGG TKLEIKGGGGGGGGGSEVQLQQSGPELLKPGASVKISCKTSGYTFTEY TIHWVKQSHGKSLEWIGGIDPNNGGTMYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYTDL RSLTSEDSA VYYCTRAEAMDYWGQGTSTVTVSS
156	CAIX LHxSEQ ID NO.10	artificial	NA	gacattgtgatgacccagctcaaaagattcattgccacaacagtaggagacagggtcagacaccctgcagggccagfca gaaatgggttctgctgctggatacaacagaaaccaggacaatctcctaactactgatttactacagcatccaatcggta cactggagctccctgactgcttcaacagcagtgatctgggacagattcactcaccattagcaaatagcagctcgaagac ctggctgattttttctcaacaatatagcaactatccgtagacgctcggtaggacccaagcctgaaatcaaaagggtgg tggttcggcggcggcggctccggctgggtggctgctggagctcggtagcctggtagcctggggggaggctttaggaggcttg gagggctccctgaaaciccctggcagcctcggattcacttaactatcactatcactcactgagacactgtagaaaggccgaltcaccatt aggagctggagtgtagcccaatgtaggggtatccctacacacggcggacactgtgaggggacaagcctgttcttactgtagca tcaaaggacaalgccaaagaaacacctgtaccctgcaatgagcagctgaaagctgtagggacaccggctcctcctgggaltccg gacaccgctcgggctactttttactggacttactgagggtcagggaaaccctgacccgctcctcgggaggctgggaltccg aggtagaagctctcagctcgggagggatggctcaggcctaaagggtcattgaaacitcactgtagccctctggattcac ctcaatatcctacgccatgaaactgggtccgccaggctcccaaggcgaagggttggaaatgggttctcgcataaagaagtaaata aataattatgcaacataattatgccgattcagtagaagacaggctcaccatcaccagagattgattcacaagaagcattctctatctac aaatgaaacaactgaaactggagacacagccatgtactactgctgtagacaactggaaactcggtaatagctacgtttcctg gtttgcttactggggccaaggactcctgtagctcctggcaggctgggtggctgggtcggcggcggcggctccggctgggtgg tggttctcaggctggttggtagcaggaaatctgcaactcaccacatcaccctgggtgaaacaagcacaactcactgtcgcitcaagta ctggggctggttaacaactgtaactgccaactgggtccaaaggaaacccagatcatttiaticactgggtctaatagggtggtaacc aacaaaggctcaccagggtgctcagattctcaggctcctgattgggagacaaggctgccccaccattcacaagggggc acaagctgaggatgaggcaatattctgctctatggtaacgcaacctcgggggttctgggtgggaggaacccaacctgact gtccia
157	CAIX LHxSEQ ID NO.10	artificial	AA	DIVMTQSRFMSTTVGDRVSIICKASQNVVSAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS NRYTGVPRFTIGSGGTDFTLTISNMQSEDLADFFCQQYSNYPWFVGGTKL EIKGGGGGGGGGGSDVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFSNYI MSWVRQTPEKRIELVAAINSDDGITYYLDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LKSEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSEVKKLESAGGLV QPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWRVQAPGKGLVWARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDQSILYLQMNNLKTEDTAMYVCVRHGNFGNSYVSWFA

161	LHxSEQ ID NO.10	artificial	AA	<p>ctcttataataatggaaaaccctatttgattgatttacagagccagccagctccaaagccctaatctatcttggtat ctaactggactctggagtccttgacaggttacttgscagtgatcaggaacaagattttacactgaaaatacagcagagtgg aggctgagggattgggaatttacttactgctgfcagagatacacatttctcagacattcggggagccaccagagctggaaatc aaaggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggct gctgaaagccctggggctcagtgaaagatacctggcaagactctggatacacattcactgaaatacacacatacactggctgaaag cagagccatggaaagccctggagtgaggtattgacttaacaatggctgacagccctccagccctggactgatacacaagaaatc-aaagg gcaagccacattgactgtagacaagctccagcagcactacacggacccctccagccctccagccctggactgaggtattcgcag gtctattactgcacaaaggcagggctatggactactggggctcaaggaaacccacagcaccctcctccggagggctggctggga tccgaggtgaaagctcggagctggagggaggtggctgagcccaaaaggctcattgaaactcctcagcagccctcctggat tcacctcaataacctaccgcatgaactggggctccagggctccagggcaaggggtttggaaatgggttgcctccgacataaagaagta aataataatgacaactggaaactggagacagccatgactactgtggagacatgggaaacccagatcatttaccctggctaaagctacgcttt tclacaatgaaactggaaactggagacagccatgactactgtggagacatgggaaacccagatcatttaccctggctaaagctacgcttt cctggcttactgagggcagggactctggctactgctcctgagggctggctggctggctggctggctggctggctggctggctggct gtggcttctcagggctgactgaggaactgacactcaccacatcaccctgggaaacccagatcatttaccctggctaaagctacgcttt agactggggctgttacaactgtaactatgccaaactggggctcaagaaacccagatcatttaccctggctaaagctacgcttt accacaagcggagctccagggctgctggcagactcagggctcctgattggagacaagggctggcctcaccacacaggg ggcacagactgaggaggaataatattctgctctatggtacagcaaacctggggctgggttccggggaggaaccaaactg actgctccta</p>
162	EGFRvIII- LHxSEQ ID NO.10	artificial	AA	<p>DVVMQTPLTL SVTIGQPASISCKSSQSLYSNGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLI YLVSKLDGVPDRFTGSGGTDFTLKISRVEAEDLGIYCVQDTHFPQTFGGG TKLEIKGGGGGGGGGGSEVQLQSGPELLKPGASVKISCKTSGYTFTEY TIHWVKQSHGKSLEWIGIDPNNGTMYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYTDL RSLTSEDSAVYYCTRAEAMDYWGQTSVTVSSGGGGSEVKLLESGGGLVQP KGSLLSCAAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDSQSILYLQMNLLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVWFAYW GQGTLVTSAGGGGGGGGGGGGQA VVTQESALTTSPGETVTLICRSSTG AVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGTGNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTTIG AQTEDEAIYFCALWYSNLSVWFGGGTKLTVL DIKQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYI NPSRGYTNYNQKFKDKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDD HYCLDYWGQGTLLTVSSVEGGGGGGGGGGVDDIQLTQSPAIMSASPGE KVTMTCRASSSVSYMNYQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVYRFRFSGSGSGT SYSLTSSMEAEADAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELK</p>

163	desinmunizado(di)- anti CD3	artificial	AA	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTRYTMHWVRQAPGGLEWIGY INPSRGYTNVADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDD HYCLDYWGQGTIVTVSSGEGTSTGSGGSGGGADDDIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSYMNWYQQKPKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGT DYSLTINSLEAEADAITYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK
164	VL: CDR3	murina	AA	QQWSRNPT
165	VL: CDR2	murina	AA	DSSKLLAS
166	VL: CDR1	murina	AA	SASSSVSYM
167	VL de tipo humano	artificial	NA	gagctgtgtgactcaggaaacctcacaccgtatcactggtggaacagtcacactcactgtcctgctgctgactgggg ctgttaaacatgcaaciatgccaactgggtccaaacaaaaccaggctagcccccgggtggttaaggggtgiaccaaca agcggcaccaggctactctccagactcagggctcctgctgtggagggcaggctccccaccctcagggggctacag ccaggatgaggcagaataattactgtcctctatgtgtacagcaacctgtgggtgttcggtggaggaaccaactgactgct cta
168	VL de tipo humano	artificial	AA	ELVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAALTLGTVQPEDEAEYICALWYSNLRVWVFGGG TKLTVL
169	VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110) x VL de tipo humano (SEQ ID NO. 168) scFv	artificial	NA	gaggtgcagctgctgagctggaggaggtgggcagccggggtcattgaaactcactgtgagccctgctgattc accitcaatcctaccgcatgaaactgggtcggccaggctccaggaaaaggttggatggtgctgcataagaagtaaa tataataattgcaacatattatgccgaticagtgaaagacagggttccatccagagatgattcaaaaaaacactgccat ctacaaatgaacaactigaaaaaactgaggacacigccggtactactgtgtgagacatgggaacttggtaatagtactgtt ctggtttgcttactggggccaagggactcgggactcaccgctcctcagggggtgggtcctggcgggccggctccgggtgg tgg'tggctcagctcgtgactcaggaacctcactcaccgtatcactggtggaaacagtcacacactactgctgctcgc gactgggggtgtacaactagcaactatgccaactgggtccaaacaaaacaccagggtcagggcaccctgggtcctaaatggg gtaccacaacaaagccaccagggtactcctgccagattcaggctcctgctgtggagggcaaggctgcccaccctctcag gggtacagccagaggatgaggcagaataattactgtcctcattggtacagcaacctgtgggtgctgggtggaggaca ctgactgtccta
170	VH de tipo humano (SEQ ID NO.110) x VL de tipo humano (SEQ ID NO. 168) scFv	artificial	AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNHWVRQAPGKGLIEWARI RSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFA YWQGTLVTVSSGGGGGGGGGGSELVTVQEPSLTV SPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGQAPRGLIGGINKRAPGTPARF SGSLLGGKAAALTLGTVQPEDEAEYICALWYSNLRVWVFGGGTKLTVL
171	EGFR _{HL} x SEQ	artificial	NA	caggtgcagctgcagcagctggggctcgtgatcctggtaagcctggggccctcagtgagatgcttcgcaaggctcttgaca

<p>174</p>	<p>EGFR LH x SEQ ID NO. 170</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>	<p>gfgaagccctggggccacagatgctcctgcaaggcttctggacacacttaccactgacigtgtataaactgaggctggaaca gtagcctggacagggcccttgagtgatgagacagattatccaggacttgctgttacttactacaatgagattttcaagggc aaggccacactgactgcagacaatectcacaacagctccacattcaacacagcagcctgacatctgaggactctgcggct tattctgtgccatctacttactcaggaccctggttttcttattgsgggccaaaggcgactcctgctactgctcttccgggggt ggctggctccaggctgagctgggagctcggggaggatggctggacccctggagggcttggaaactciccatgicagc ctctggattccaccitcaalactaccatgaaactggctccggccagggcccaaggaaaggcttggaaactgctccata agaaagtaataataaataaataatgcaacatattatgcccattcagtgaaagacaggttaccatctccagatgattcaaaaac actgcttatctacaataatgaacaacttgaaaaactgaggacactgctgtactactgtgagacatgggaaacttcggtaata gctacgtttccctgggtttcttactgaggccaaagggactcctggcactgctcctcagggctctggctggctggctggcgg ctccggctggctgggttctagaccggttgactcaggaacctcactcaccgtatcaccctggctggaacagctcacactcactt gctcctcactggggctgttacaactagcaactatggcaactgggctcacaacacacagggccacagcccccgtggct ctaataggctggctacaacagccgacaccagctcctgaccagattcaggctccctgctggagggcaaggcctgcccctc accctcagggggtacagccagaggatgaggcagaataaiactgctcctatggtacagcaacctcggggctggctggga ggaaccaaactgactgctctacatcaccatcattaggctgac</p>
<p>175</p>	<p>EGFR HL x SEQ ID NO. 194</p>	<p>artificial</p>	<p>NA</p>	<p>DIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASQSVSSSTYSYHWHYQQKPGQPPKLLITY ASNLESGVPRFSGSGSDFTLDIHPVEEDDSSTYYCQHSWEIPFTFGSGTKL EIKGGGGGGGGGGQQVQLQSGPDLVKPGASVKMSCKASGHTFTDCV IIVVKRAGQGLEWIGQIYPTGSTRSYNEIFKGLATLADKSSNTVHIQLSSL TSEDSA VYFCALSTLHGTWFSYWGQFLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFTNYAMNWRVQAPKGLEWVARIKSYNNYATYYA DSVKDRFTISRDSDKNTAYLQMNNLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGQTVVTEPSSLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGK AALLSGVQPEDEAEYICALWYSNLWYFGGGLKTLVLIHHHHH*VD caggctgcagctgcagcagctcggggcctgactcctggagggcctgaggccctcagtgaaagtgctcctgcaaggcttctggaca caacttccactgactggtataacttgggtgaaacagagagctggacaggccctgagtgagatggacagattatccagggg actggctgtctiactacaatgagatttcaaggccaaaggccacactgactgcagacaacactcccaacacagctccacattca actcagcaggccctgacatcgaggactcctggctatttctgcccctactcattattacagggaccctggcttcttattggg gccaaaggactcctggctactcctcctcggctgggtctggctcggcggcgccctccggctggctgggtggctgacatgg actgaccagctcaggctctctaccctgctcctggggcgaggcccaccactcactcagggccagccaaaggctcag ttcatctactatagttatatacactgggtaccaacagaaacacagcagcccaaccctccatcactcactgacatgacccaacct agaatcggggcctccaggttcagtgccagctggggtctgaggacagactccacctccatcctctgaggggagg atgattctcaacatattactgacagcacagctgggggattcatttaccgctgggggacaaagttggaaataaaatccg</p>

176	EGFR HL x SEQ ID NO. 194	artificial	AA	<p>gaggtggctcccagaccgttgactcaggaaaccttaccaccggtatcaccctggaggcaacagtcacaciacacttgctg ctcgtccactggggctggttiacaactagcaactgccaactgggccaacaacaaagaggtcagagccaccccggtggtctaat agggtaccacaacagcggccaccagagtgactctcctgcaagatctcagggctcctcctgcttgaggcaaggctgcccctcacc ctcagggggttacagccagagatgagcagaatattactgtctctatgctacagcaacccttgagggtgttctgaggagaa cgaactgactgctcctaggtgggtttgctgctggcggccctgggctccgggtggtggtggctgcaagctggtggggt ctggaggagattgggtgagccggagggtcatgaaacacactcagccctgagctggaatcaccctcgaacacacacacacacacat gaactgggtcccgccaggccagggaagggttggatgggtgctgctgcaataaggaagataataataatgcaacacat tatgccgattcagtgaaagacagggtcaccatcaccagatgattcaaaaacactgacctatcacaaaatgaaacactgaa aactggagacacgctgactactgtgagacatgggaactgctgaatgctacgctttcctgggtgggttctgcttactaggggcc aagggactcgggtcacccgtccacacatcaccatcatcattaggctgac</p>
177	EGFR LH x SEQ ID NO. 194	artificial	NA	<p>QVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCKASGHTFTDCVIIVVKQRAGQGLEWIGQI YPGTGRSYNEIFKGAATLADKSSNTVHIQLSSLTSEDSAVYFCALSTLIHGT WFSYWGQGLTVSSGGGGGGGSDIVLTQSPASLPVSLGQRATIS CRASQSVSSSYIHWYQQKPKLLITYASNLESGVPARFSGSGGTDY TLDIHPVEEDDSSTYYCQHSWEIPFTFGSGTKLEIKSGGGGQTVVTQEPSLTV SPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPKQAPRGLIGTNRKRAPGTPARF SGLLGGKAALTLGGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGLTV LGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNGNSVSWFAWVGQGLTVTSSHHHH*VD</p>
				<p>gacattgctgacacagtcctccttccctctgcttccctgctcctggggcagagggccccaccatctcagggccagccaaa gtgctcagttctactatagttatatactggtatacactgtgtacacagaacagagacggcccccaaacctcctacacgtatgcat ccaacctaagaalctggggctcctggcaggtcagtgaggcagtggtggagacactcacccctgacatccctcctggg aggaggatgatttcacacatactgctcagcagctggggagattcattactggctggagagactggcagcaggccatgctgg aaagggtgggctggctgggtggggcggcggcggtggggtgttggcttggcttggagcggctggcagcagctggactcgtg gtgaaacctggggcctcagtgaaatgctcgaaggctcctggacacacttctcactgactggttataatctgggggaaaca gaggtcggagagggcctgagtggatggagattttccaggggactggctgcttactacacaaatgagatttcaaggggc aaggccacactgactgacagaacaaacctccaacacagtcacacitcacagccctgacatctgagagactcctggctc tattctgcccctatctacitcttaccggggactgggttttctggcccaaggagctcctggctcctcctcctccggga gggtgctcctcagaccgtgtgactcaggaaacctcactaccctgtatcacctggtgaaacagtcacactcactgtgct cgtccactggggctgttacaactagcaactatggcaactgggccaacaacagaggaagggcagcagcccgggtcttaatag gtgggtaccaacaagccggcaccaggactctcctgcccagatcaggctcctggaggaaggcggcctcaccctc cagggggtacagccagaggatggagcaagaattactgctctotatgggtacagcaacctctgggtggtggagggaacc</p>

<p>180</p>	<p>SEQ ID NO. 170 x EGFR HL</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>	<p>caccctgacatccctctggaggagatgattcaacataattactgacagcacagttggggagattccatttacgttcgg cfcggggacaagttggaaataaacaacatcacatcatcatttaggtcggac</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNITYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGSGTIVVTQEPSLT VSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGINKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLGVPQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTLTVLSGGGG SQVQLQSGPDLVKPGASVKMSCKASGHTFTDCVIWVKQRAGQGL EWIGQIYPGTGRSYNEIFKGTKATLTADKSSNTVHIQLSLSLSEDSAVYFCALS TLIHGTWFSYWQGLTVTVSSGGGGGGGGGGSDIVLTQSPASLPVSLG QRATISCRASQSVSSSTYSIHWYQKPGQPPKLLITYASNLESVPARFSGSG SGTDFLLDHPVEEDDSSTYYCQHSWEIPFTFGSGTKLEIKHHHHH*VD</p>
<p>181</p>	<p>SEQ ID NO. 194 x EGFR HL</p>	<p>artificial</p>	<p>NA</p>	<p>cagaccgtgacacaggaacactcactcaccgtatcacctggfggaaacagtcacacitcgtcgtccactggggg ctgttaacaactagcaactatccaactgggtccaacaaaaaacaaggtcagagcccccgtggtctaataagtggtaccaca agcgcgcacacaggtactcctcagattctcaggctccctgcttggaggcgaaggtgcctcaccctcaggggggtacag ccagaggatgaggcagaataattactgctcctatgtacagcaacctgggtgctgggggggaggaacaaactgactgctc ctagggtgggtgctggcggcggcctccgggtgggtgggtgctgggtgctgggtgctgggtgctgggtgctgggtgctgg gggtgagcctggagggtcattgaaactcctatgtagcagcctcgggttaccctcaatacctacggcctgagcctggc caggtccagggaaagggttggaaatgggttggctcgcataagaaagaaataataataatgcaacatattatgccgattcagt gaaagacaggttcaccatccagagatgattcaaaaaaacactgacctatctacaaaatgaacaacttgaaaactggagacact ggcgtgactactggtgagacatggggaacttcggtaatagctactgcttccctgggttgggttgggttgggttgggttgggt caccgtcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct cagtgaagatgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct ccttggatggatggacagattatccaggagctggctgcttactacaaatgagatttcaaggggcaaggccacactgactg cagacaaaatcccaacaacagtcacattcaactcagcagccctgacatctgaggactcctgggtctatttctgcccctacta ctcttattcaggacctggttttctattggggcacaaggactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct ggcgtccgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgg catctcagcagggcccaaggctcagctcacttacttacttacttacttacttacttacttacttacttacttacttacttacttactt cccaaaactcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct ttcaccctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcct gctcgggggacaaggtggaaataaacaacatcacatcaccatcatttaggtcggac</p>
<p>182</p>	<p>SEQ ID NO. 194 x EGFR HL</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>	<p>QTVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGVPQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGG</p>

183	SEQ ID NO. 170 x EGFR LH	artificial	NA	<p>TKLTVLGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVWARRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDAVYYCVRHGFNGNSYVWFAYWGQTLVTVSSSGGGGGS QVQLQSGPDLVKPGASVKMSCKASGHTFTDCVIIVVKQRAGQGL EWIGQIYPTGRSYNEIFKGTALADKSSNTVHIQLSSLTSEDSAVYFCALS TLIHGTWFSYWGQTLTVTVSSGGGGGGGGSDIVLTQSPASLPVSLG QRATISCRASQVSSSYIHVYQQKPPKLLITYASNLESGVPARFSGSG SGTDFTLDPVEEDDSITYCOHSWEIPFTFGSGTKLEIKHHHHHH*VD</p>
184	SEQ ID NO. 170 x EGFR LH	artificial	AA	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRH GNFGNSYVWFAYWGQTLVTVSSGGGGGGGGGSGQTVVTVQEPSLT VSPGGTVILTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGINKRAPGTPAR FSGSLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSGGGG SDIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASQVSSSYIHVYQQKPPKLLIT</p>

185	SEQ ID NO. 194 x EGFR LH	artificial	NA	<p>YASNLESGVPAFSGSGGTDFTLDIHPVEEDDSSTYYCQHSWEIPFFGSG TKLEIKGGGSGGGGGGQVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCKASGHTFT DCVIIWVKRAGQGLEWIGQIYPTGRTSYNEIFK GKATLTADKSSNTVHIQL SSSLTSEDSAVYFCALSTLHGTWFSYWGQGLTVTVSSHHHHH*VD cagaccgttgacaggaaactcaccgtatcacctggggaacagcaccctcacttgcctcaccactggggg ctgttaaacatagcaaciatgccaaactgggtccaacaaaaaacaggcagccaccctgggtctaaataggtgggtaccaca agcgcgcaaccaggctactcctccagattcaggtctcctgggtgggcaaggcctcaccctcaccctcaggggtacag ccaggatgaggcagaataatcactgctcctggtacagcaaccctgggtgctggggaacacaaactgacctgic ctagggtgggtgggtcggcggcggcggctccgggtgggtgctgcaagctgggtgggtgctgggtgggtggg gggtgagcctgggagggctcattgaaactcctggtgagcctcctggttcacccaatactacgccaatgaaactgggtccgc caggctccaggaaagggttgggaatgggtggcgcataagaaaggtaataataataatgcaacatattgcccagatcagt gaaagacagggtaccatccagagatgattcaaaaaaacacggctatctacaaaatgaaacatggaaacaggagacact gccgtgactactgtagacatgggaactcggtaataagctacgtttctgggttgggttgggtgggtgggtgggtggt caccgtctctcaccggagggtgggtccgacattgctggacacagctcctgcttcttaccctgctcctgggtgggtcaga gggccaccatcagtagggggcaggccaaaggctcagttcctactacttactatgatactacagctgggtacacagaaaccagg acagccaccacaaactcctacatgcatcccaacagtagaactcctgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgg gacagactcaccctgacatcctggtggagggatgattcctcaaatattcctgacacagctgggtgggtgggtgggtgg tactgtcggctcggggacaagggtgaaataaagggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgg aggtcagctgacagctggacctgatcgtgtagggcctggggctcagtgaaagatgctcctggcaaggctcctgggacaca ctctcactgactgtgtaatactgggtgaaacagagagcgggacaggcctgagtgaggtgggtgggtgggtgggtgggtgg ggctgttctactacaatgagatttcaaggcaggccacactgactgacagacaatcctccaacacagctcaccatccaact cagcaggctgacatctgaggactctgggtctattctgctccctcactcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt aaggagctcgggtcctcctccatcaccatcattagggtggac</p>
186	SEQ ID NO. 194 x EGFR LH	artificial	AA	<p>QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAALTSGVQPEDEAEYCALWYSNLWVFGGG TKLTVLGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNT YAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYCVRHGNFNSVSWFAYWQGTLLTVSSSSGGGGS DIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASQVSSSTSYIHWYQQKPKQPPLLITY ASNLESGVPAFSGSGGTDFTLDIHPVEEDDSSTYYCQHSWEIPFFGSG TKLEIKGGGSGGGGGGQVQLQQSGPDLVKPGASVKMSCKASGHTFT DCVIIWVKRAGQGLEWIGQIYPTGRTSYNEIFK GKATLTADKSSNTVHIQL SSSLTSEDSAVYFCALSTLHGTWFSYWGQGLTVTVSSHHHHH*VD</p>

187	CAIX HL x SEQ ID NO. 194	artificial	NA	<p>gacgtgaaagctcgtggagctggtgaggtgaggtctggtgaggtccctgaaactctctctgagcctctgggatcc actttcagtaactattacatgctttgggttcgccagactccagagaaagggtcggagtggtgaggtcagcggcatttaaataagtagatgg tggatcacctaciatatgacacctgtgaaaggccgattcaccatttcaagagacaatggcagcaacaccctgtactactgtgagca atggacagctcgtgaaagctcgtgagggacagccctgttttttactggtcagagaccggctcggctacttctcttgaactactggg tcaaggaaacctcagtcaccgtctcctcagtggtggttcttggcgccggcggctccggctgggtggtggttctgacattggtg atgacccagctcaaggatttcaccacaagtagggagacaggttagcaccctgcaaggcagtcagaaatggtgggt tctgctggtccctgggtatcaacagaaaccggacaattcttaaacactgatttiacacagcaccattccccaactggactactgggtg cctgacggcttcacagtgatgggtgacaggttccactctacccaattagcaatagcagctctgaaaggaccctggctgatttt ttctgtaacaatalagcaactccgtgacgttggggagccaccagctgggaaatacaaatccggaggggtgggtcc caggaccgttgggtgacaggaaccttcaccggttggagagccacactgggtgagaaatacaaatccggaggggtgggtcc ctgltiacaactagcaactagccactgggttccacaataaaaccaggctacagcccccgtgggtcctaataagggtttacccaaca agcggaccacagggttactcctggcagattcagggctccctgggtggagggcaagggctggcctcaccctctcaggggttacag ccagaggtggggcagaatattactggtcctctatgggtacagcaacctgggtggttgggtggagggaaaccacactgactgct ctagggtgggtggttctggcggcggcggcggcgggtgggtggttgggtgaggggtgaggggtgggtggtgggaggggggtggt gggtggcagccgtggaggggtcattgaaactctcagcctcctgggttaccattcaactaccgtgaaactgggtgggttgggtccg caggctccagaaagggttggaaatgggtgctggcagaagaaataataataataatgcaacatatattgcccagctgaticaggt gaaagacaggttaccatcctcagagatgattcaaaaaaacactggcctaactaacaaatgaaacactgaaaactggaggacact ggcgtgactactgtggagactgggaaactcggtaataggctggttctgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt caccgctctcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatcaccatc</p>
188	CAIX HL x SEQ ID NO. 194	artificial	AA	<p>DVKLVESGGGLVKLGSLKLSCAASGFTFSNYMSWVRQTPKRLLELVA NSDGGITYLDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTALFYCARHRS FSMDYWGQGTSTVSSGGGGGGGGGGSDIVMTQSQRFSMTTVDGDRV ITCKASQNVSAVAWYQKPGQPKLLIYASNRYTGVPDRFTGSGSDTFT LTISNMQSEDLADFFCQQYSNYPWTFGGGKLEIKSGGGGQTVVVTQEPSL VSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGTGNKRAPGTP FSGLLGGKAAALTLGVQPEDEAEYCALWYSNLWVFGGGKTLTLVGGGG SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGFTFNNTYAMNWRVQ APGKGLWVARIKSYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLT EDTAVYCYVRHGFNSVSWFAYWGGTLTVSSHHHHH*VD</p>
189	CAIX HL x SEQ ID NO. 170	artificial	NA	<p>gacgtgaaagctcgtggagctggtgaggttagtgaagctggaggggtccctgaaactctctctgagcctctgggatcc actttcagtaactattacatgctttgggttcgccagactccagagaaagggtcggagtggtgaggtcagcggcatttaaataagtagatgg tggatcacctaciatatgacacctgtgaaaggccgattcaccatttcaagagacaatggcagcaacaccctgtactactgtgagca atggacagctcgtgaaagctcgtgagggacagccctgttttttactggtcagagaccggctcggctacttctcttgaactactggg</p>

<p>gacaccgctcgggacttttctatggactactggggtcaaggaaacctcagtcacogctctcctctccgggaggtgggctc cgggctgcagctgggagtcggagggatgggagccctggagggcattgaaacctcattgcaagccctcctgggatt caccttaatactaccatgaactggctccggcctccagggaaaggggttggaaatggggtgctcgcataaagaaatgaa atataataatgcaacaatgattgaggaagagccaggtccaccatccagagatgattcaaaaaaacactgccc ctacaatgaaacactgaaactgaggaactgcccgtgactactgctgagacatgggaaacttggtaatagctactggtt ctgggttctactggggccaaaggacttggcaccgtctccaggtggggtggggttctggcggcggcggcggcggg ggggttctcagaccgttgactcaggaacctcactaccgtatcacctggggtggggtggggtggggtggggtg tcacggggctggtacaactgcaactatcccaactgggtcccaaaaaaacagggtcaggccaccctcaccctca gggtaccacaagcgcaccaggactcctgagattctcaggtccctgcttggaggcaaggctgcccctcaccctca gggtaccagccagagatggagcagaataactggtctatggtacagcaacctggggtggtggggtggggtggg actgactgctcctacatcaccatcatcattaggctgac</p>	<p>CAIX LH x SEQ ID NO. 170</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>	<p>DIVMTQSRFMS TVGDRV SITCKASQNVVSAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS NRYTGVPDRFTGSGGTDFTLTISNMQSEDLADFFCQQYSNYPWTFGGGTKL EIKGGGSGGGGGGSDVKLVESGGGLVKLGGSLKLSCAASGFTFSNY MSWVRQTPEKRLELVAAINSDDGITYLDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LKSEDTALFYCARHRSYFSDYWGQTSVTVSSSGGGSEVQLVESGGGL VQPGSLKLSCAASGFTFNTRYAMNWVYRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGFNGNSYVSWF AYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGQTVVTQEPSLTVSPGGTIVLTCTCR SSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGTINKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLHHHHHH*VD</p>
<p>193</p>	<p>scFv VL de tipo humano (SEQ ID NO. 168) x VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110)</p>	<p>artificial</p>	<p>NA</p>	<p>cagaccgttgactcaggaaacctcaccatcaccgtgggaaacagtcacactgctcgtccactgggg ctgtacaactagcaactatgcccaactgggtccaacaaaaaacccaggtcaggccccgtgggttaatagggtgtaccaaca aggcgcaccagggtactcctgcagattcagcctcctgctggggcaaggctggcctcaccctcaggggtacag ccaggatgagcagaataactgctcctatgtagcaaacctcgggtgctgggggtggggtggggtggggtggggtg ctagggtgggtgggtggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc ggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc caggctccaggaaagggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggtgggt gaaagacaggttaccatcagagatgattcaaaaaaacctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc ggcgtgactactggtgagacatgggaaactggtaatagctactggttctggttggggggggggggggggggggggg caccgtcctca</p>
<p>194</p>	<p>scFv de tipo humano (SEQ ID</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>	<p>QTVVTQEPSLTVSPGGTIVLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGG</p>

x VH de tipo humano (SEQ ID NO. 110)					
195	epitopo	artificial	AA		TKLTVLGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNT YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS
196	epitopo	artificial	AA		EFSELEQSGYYVC
197	5' EGFR XbaI	artificial	AA		EFSELEQSGYYVK
198	3' EGFR SalI	artificial	NA		GGTCTAGAGCATGCGACCCCTCCGGGACGGCCGGG
199	epitopo	artificial	NA		TTTTAAGTCGACTCATGCTCCAATAAATTCACCTGCT
200	epitopo	artificial	AA		QDGNEEMGSITQT
201	epitopo	artificial	AA		YYVSYPRGSPED
202	epitopo	artificial	AA		EFSEMEQSGYYVC
203	epitopo	artificial	AA		FSECE; X como en SEQ ID NO.: 204
204	epitopo	artificial	AA		QYPGSEILWQHND FSEXE, en la que X representa L (Leucina) o M (Metionina)
205	epitopo	artificial	AA		FSELE
206	epitopo	artificial	AA		FSEME
207	epitopo	artificial	AA		EFSEXEQSGYYVC, en la que X representa L (Leucina) o M (Metionina)

Abreviaciones:

- scFv = Fv monocatenario
- AA = secuencia de aminoácidos
- NA = secuencia de ácido nucleico
- L = región VL
- H = región VH

Código de una letra como se usa en el listado de secuencias:

- B = C o G o T
- D = A o G o T
- H = A o C o T
- K = G o T

N=A0C0G0T
R=A0G
S=C0G
V=A0C0G
W=A0T
Y=C0T

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente humano, que comprende un anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende
- 5 (i) un primer dominio de unión que se une con un CD3 de primate distinto de chimpancé, y
(ii) un segundo dominio de unión que se une con un antígeno de superficie celular,
- 10 en el que dicho dominio de unión se une con un epítipo de CD3 épsilon humano y de primate distinto de chimpancé, en el que el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos "FSEXE" (SEQ ID NO. 204), en la que "X" representa L (leucina) o M (metionina), y en el que el CD3-épsilon de primate distinto de chimpancé comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 135 o 136.
- 15 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el epítipo está en el intervalo de 15 aminoácidos +/- 3 aminoácidos.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el epítipo comprende 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos.
- 20 4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho primer dominio de unión, se localiza en dirección C terminal o N terminal del segundo dominio de unión.
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el segundo dominio de unión, se une con un antígeno de superficie celular humano y con el homólogo de primate distinto de chimpancé de dicho antígeno de superficie celular.
- 25 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 5, en la que el antígeno de superficie celular, es un antígeno tumoral.
- 30 7. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que el primer dominio de unión, comprende una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 2, 110 o 6 y una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 4, 148, 168 u 8.
- 35 8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la región VH del primer dominio de unión, comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y la región VL del primer dominio de unión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4.
- 40 9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la región VH del primer dominio de unión, comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 110 y la región VL del primer dominio de unión, comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 148 o SEQ ID NO: 168.
- 45 10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la región VH del primer dominio de unión, comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 y la región VL del primer dominio de unión, comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8.
- 50 11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que dicho antígeno tumoral es EpCAM, EGFR, EGFRvIII o carboanhidrasa IX (MN/CA IX).
12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicho anticuerpo monocatenario biespecífico, comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:
- 55 (a) una secuencia de aminoácidos como se representa en cualquiera de SEQ ID NO: 38, 40, 124, 42 o 44; y
(b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO: 37, 39, 125, 41 o 43.
- 60 13. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicho anticuerpo monocatenario biespecífico, comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de SEQ ID NO: 66, 68, 74, 76, 122, 70, 72, 78, 80, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190 o 192; y
(b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO: 65, 67, 73, 75, 123, 69, 71, 77, 79, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189 o 191.
- 65

14. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que al menos uno de dichos primer o segundo dominios de unión es humano, humanizado, con injertos de CDR y/o desimmunizado.
- 5 15. 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 14.
16. Una composición farmacéutica que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 15.
- 10 17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que dicho vector comprende además una secuencia reguladora que está unida operativamente con dicha secuencia de ácido nucleico definida en la reivindicación 15.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 16 o 17, en la que dicho vector es un vector de expresión.
- 15 19. Una composición farmacéutica que comprende un hospedador transformado o transfectado con un vector definido en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.
20. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende además un compuesto proteico capaz de proporcionar una señal de activación para células efectoras inmunitarias.
- 20 21. Un proceso para la producción de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, comprendiendo dicho proceso cultivar un hospedador definido en la reivindicación 19 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y recuperar el anticuerpo monocatenario biespecífico producido del cultivo.
- 25 22. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende además formulaciones adecuadas de vehículos, estabilizadores y/o excipientes.
- 30 23. Uso de un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 15, un vector como se define en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un hospedador como se define en la reivindicación 19, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, el tratamiento o el alivio de una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral o un trastorno inmunológico.
- 35 24. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de reivindicaciones 1 a 14, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 15, un vector como se define en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un hospedador como se define en la reivindicación 19, para uso en un método para la prevención, el tratamiento o el alivio de una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral o un trastorno inmunológico.
- 40 25. El uso de acuerdo con la reivindicación 23 o la composición farmacéutica, el anticuerpo monocatenario biespecífico, la molécula de ácido nucleico, el vector o el hospedador para el uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que dicha enfermedad tumoral es una enfermedad maligna, preferentemente cáncer.
- 45 26. El uso de acuerdo con la reivindicación 23 o 25, en el que dicha composición farmacéutica o el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 15, un vector como se define en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un hospedador como se define en la reivindicación 19 es adecuado para administrar en combinación con un fármaco adicional.
- 50 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 26, en el que dicho medicamento es un compuesto no proteico o un compuesto proteico.
- 55 28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicho compuesto proteico es capaz de proporcionar una señal de activación para células efectoras inmunitarias.
- 60 29. El uso de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en el que dicho compuesto proteico o compuesto no proteico, se administra simultáneamente o no simultáneamente con un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, con una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 15, con un vector como se define en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 o con un hospedador como se define en la reivindicación 19.
- 65 30. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 23 y 25 a 29, en el que dicha composición farmacéutica o dicho anticuerpo monocatenario biespecífico, dicha molécula de ácido nucleico, dicho vector, o dicho hospedador, van a administrarse a un ser humano.

31. Un kit que comprende un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 15, un vector como se define en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un hospedador como se define en la reivindicación 19.

5 32. Un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para uso en un método para evaluar la seguridad y/o la actividad *in vivo* y/o el perfil farmacocinético de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico en seres humanos, que comprende (i) administrar dicho anticuerpo monocatenario biespecífico a un primate distinto de chimpancé, (ii) medir dicha seguridad y/o actividad *in vivo* y/o dicho perfil farmacocinético de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico en dicho primate no humano y (iii) evaluar la
10 seguridad y/o la actividad *in vivo* y/o el perfil farmacocinético de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico en seres humanos.

15 33. El anticuerpo monocatenario biespecífico para el uso de la reivindicación 32, en el que dicha actividad *in vivo* es activación de linfocitos T, agotamiento de células diana tumorales, citotoxicidad, toxicidad, aparición de efectos secundarios adversos y/o liberación de citocinas.

34. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho epítipo se deduce por análisis de transferencia de Western, mapeo de epítipos o análisis de pepspot.

FIGURA 1

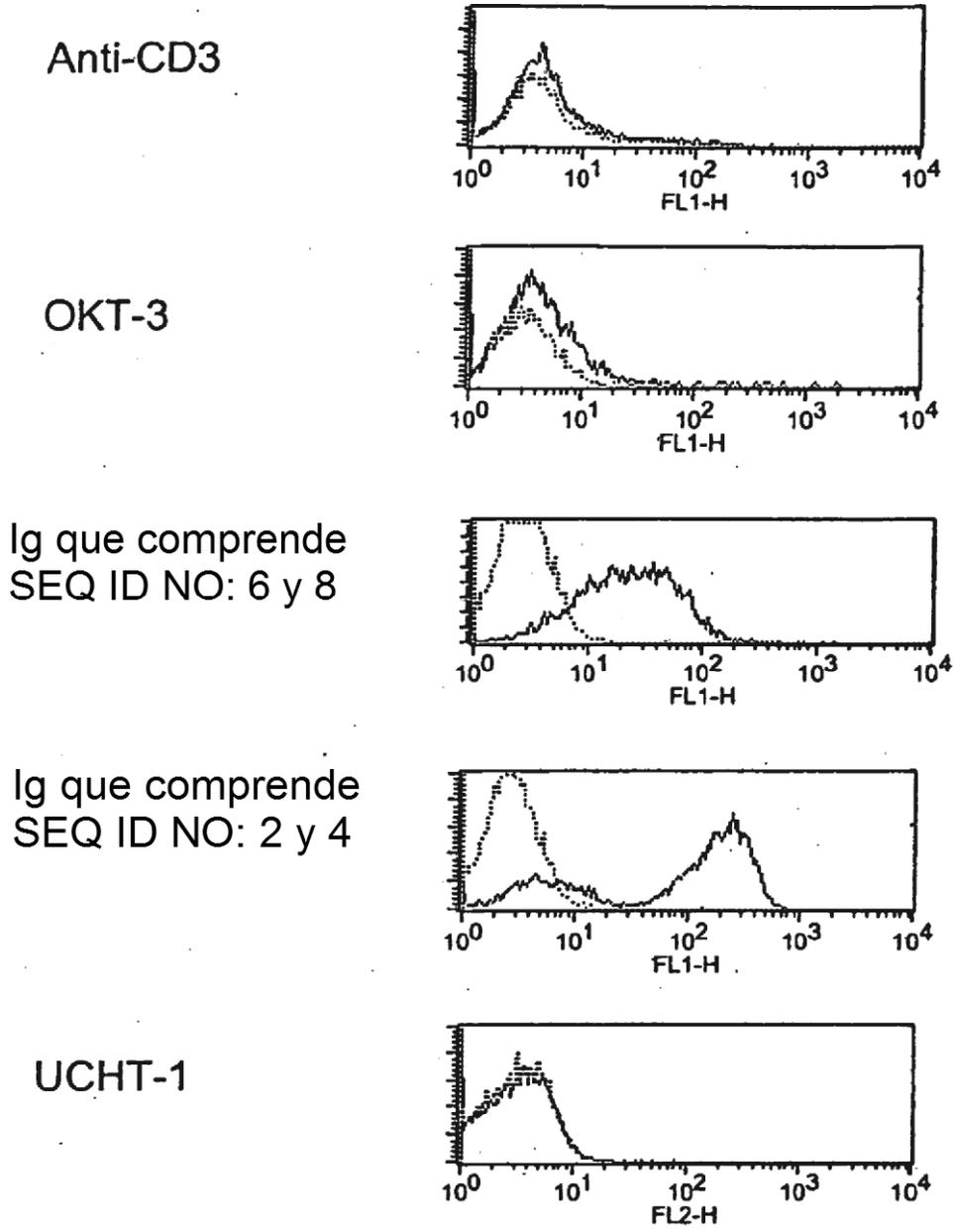


FIGURA 2

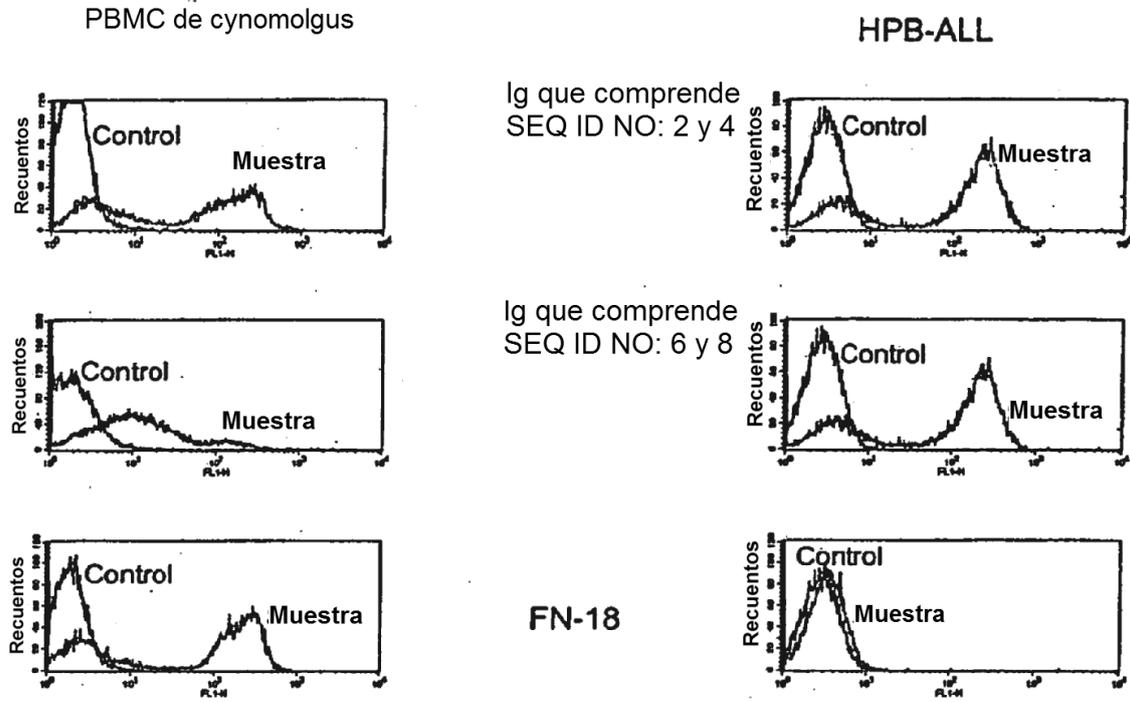


FIGURA 3

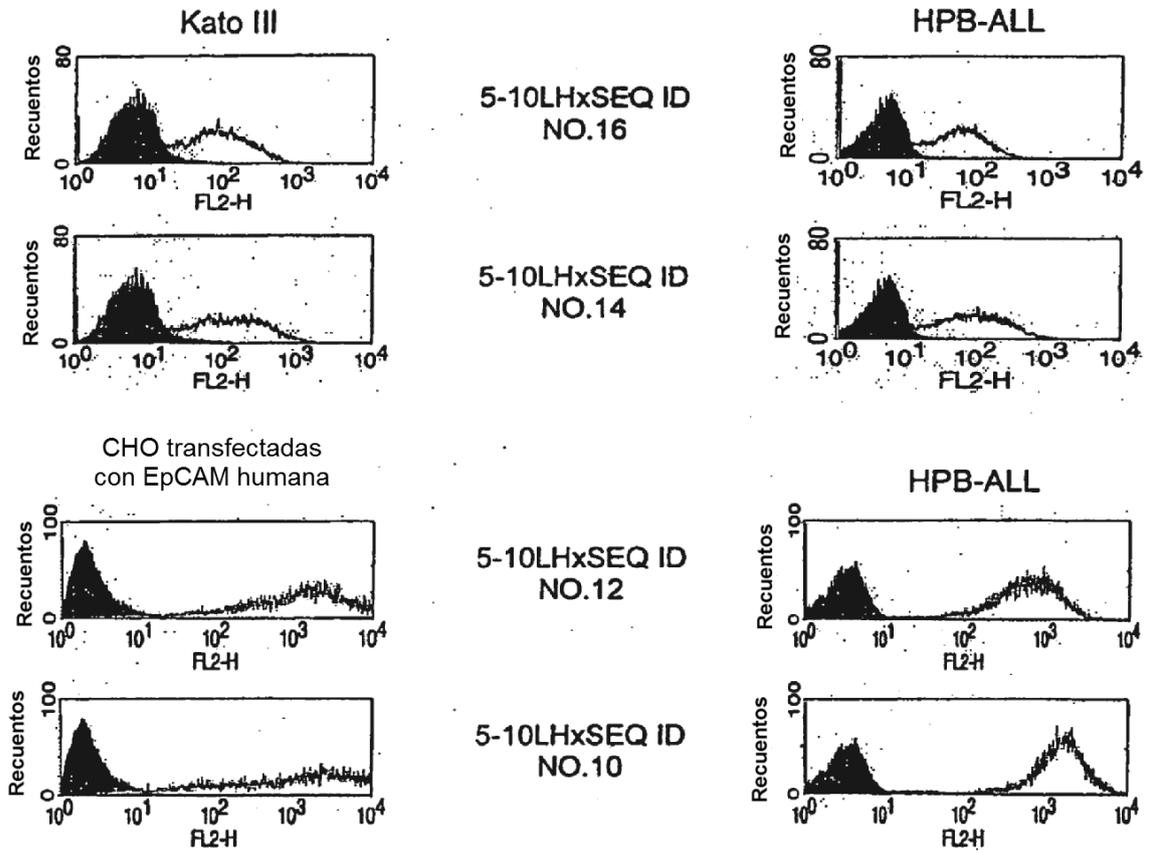


FIGURA 4

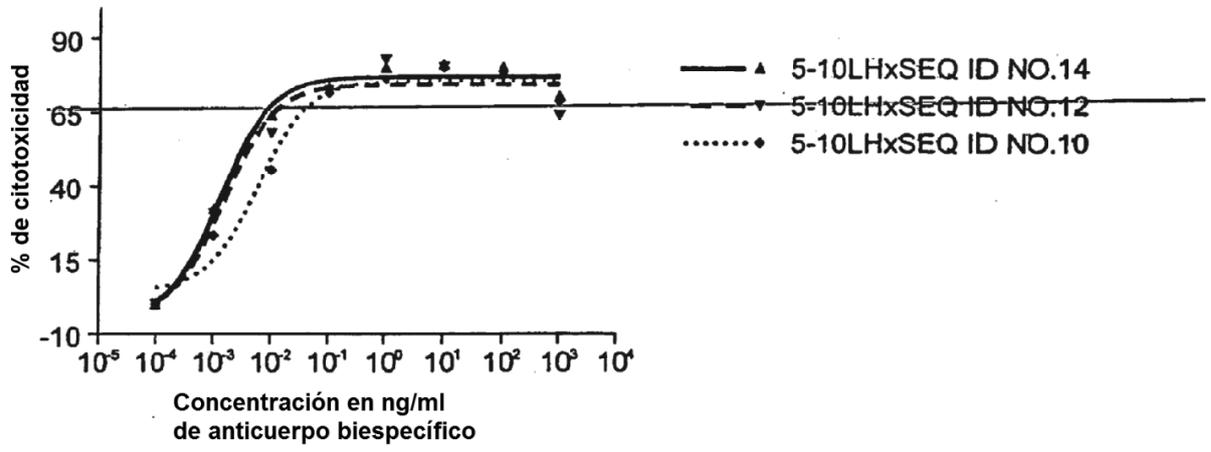


FIGURA 5

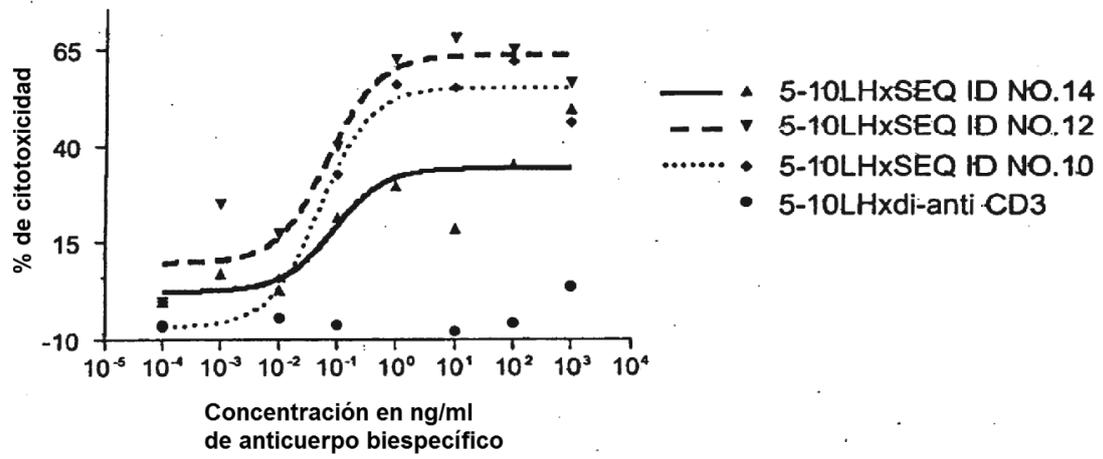


FIGURA 6

EpCAM humana	(1)	QEECVCENYKLAVNCFVNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAARKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNDG	
EpCAM cyno	(1)	QKECVCENYKLAVNCFLNDNGQCQCTSIGAQNTVLCCKLAARKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNDG	
		71	140
EpCAM humana	(71)	LYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGVRRTDKDEITCSEVRVYWIIEELKHKAREKPYDSKSLR	
EpCAM cyno	(71)	LYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGVRRTDKDEITCSEVRVYWIIEELKHKAREKPYDVQSLR	
		141	210
EpCAM humana	(141)	TALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDLQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLPHSKQMDL	
EpCAM cyno	(141)	TALAEAIKTRYQLDPKFITNILYEDNVIIDLQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLPHSKQMDL	
		211	280
EpCAM humana	(211)	TVNGEQLDLDPGQTLIIYVDEKAPEFSMQGLK	
EpCAM cyno	(211)	RVNGEQLDLDPGQTLIIYVDEKAPEFSMQGLK	

FIGURA 7

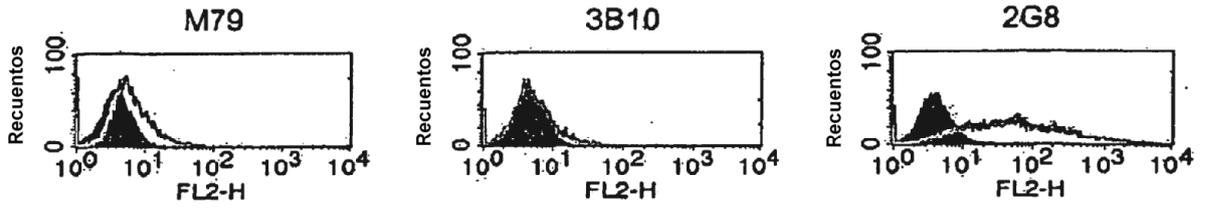


FIGURA 8

FIGURA 8 (A)

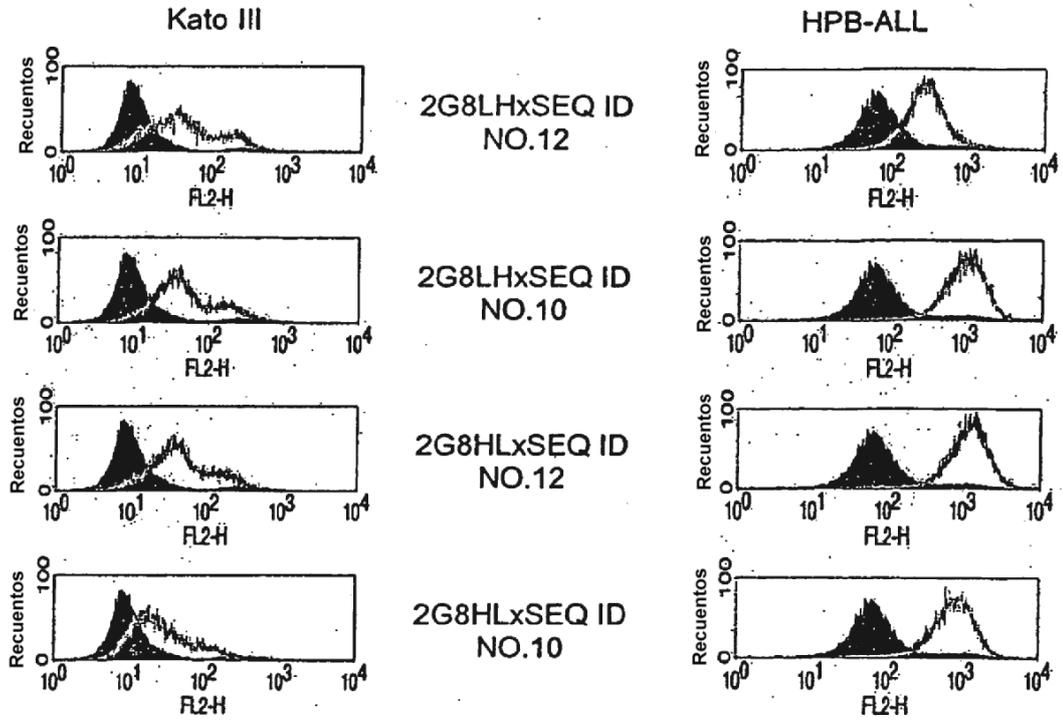


FIGURA 8 (B)

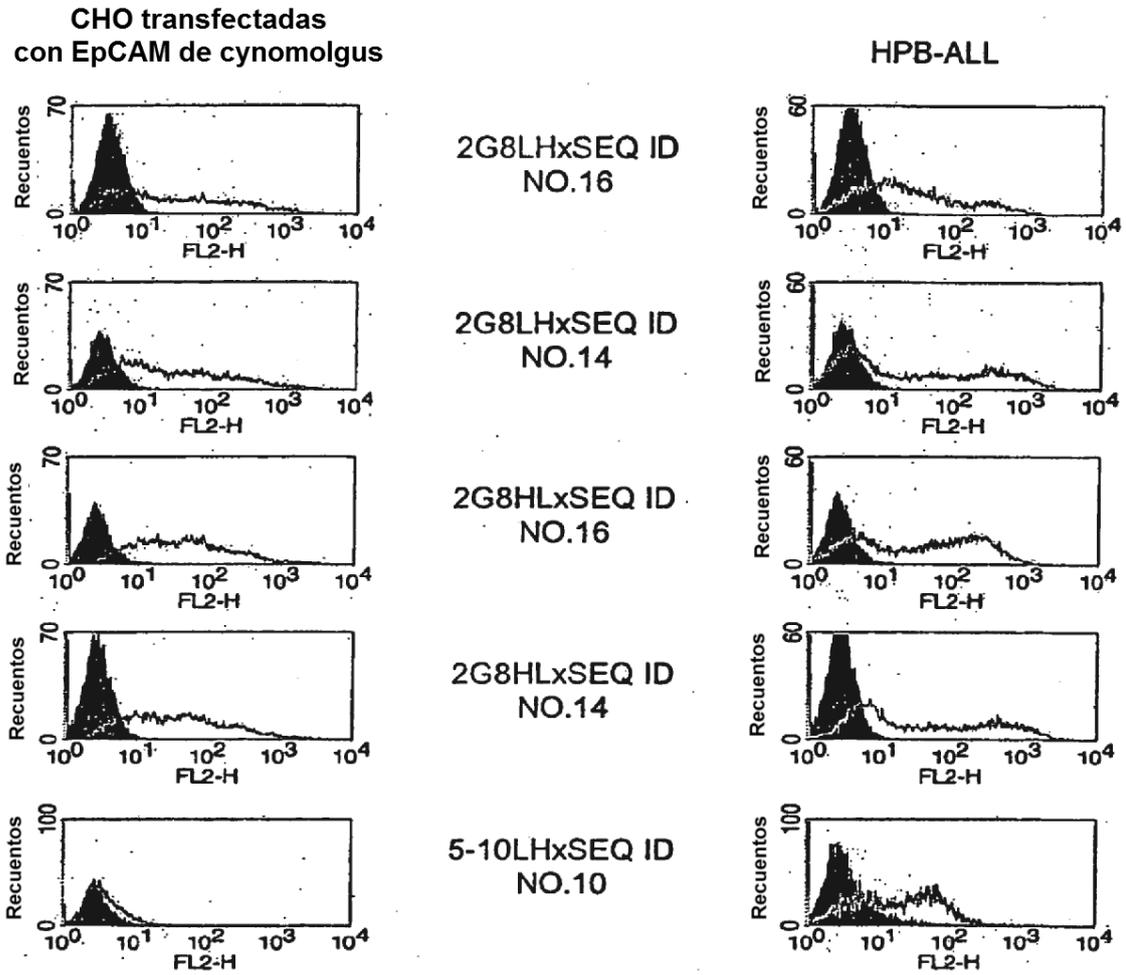


FIGURA 9

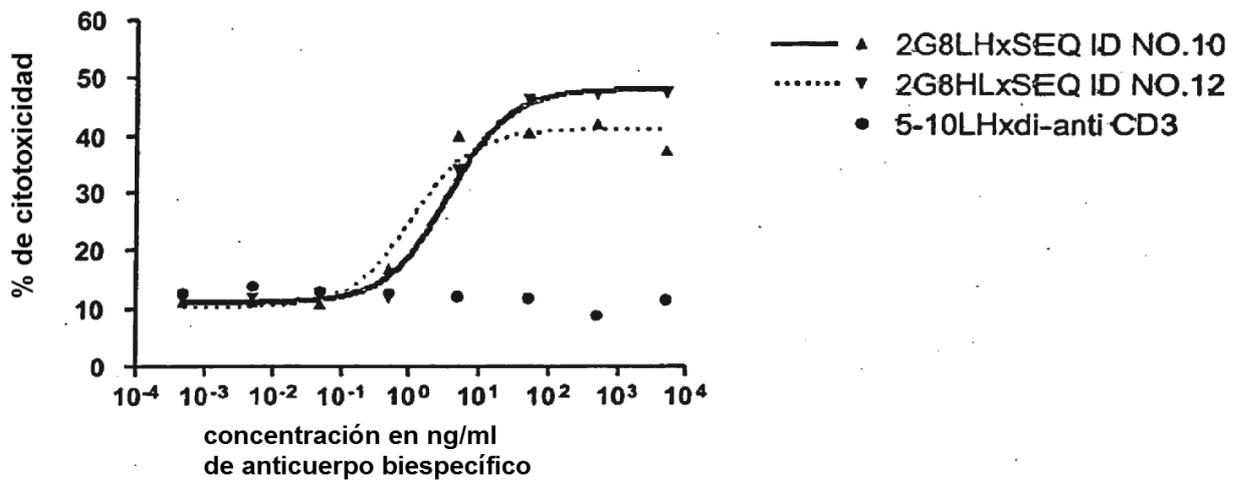


FIGURA 10

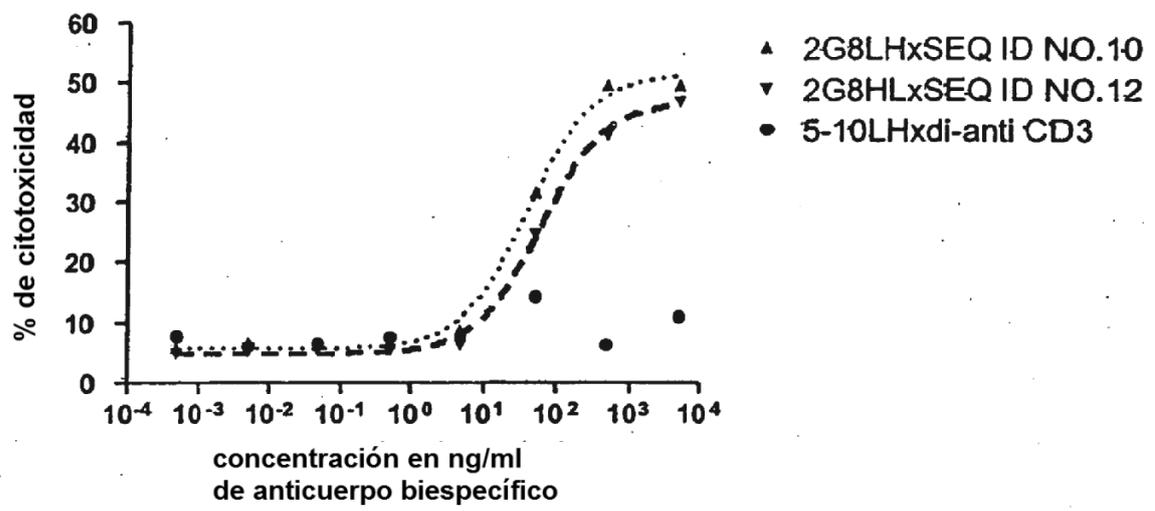


FIGURA 11

SEQ ID NO.2
hu3-73

EVKLESGGGLVOPKGSCLKLSCAASGFTFN
EVQLVPSGSGGLVOPGGSLKLSCAASGFTFS

SEQ ID NO.2
hu3-73

I II

TYAMN	WVROAPGKGLEWV	RI	RSKYNNYA
GSAMH	WVROASGKGLEWV	RI	RSKANSYA

SEQ ID NO.2
hu3-73

YYADSVKDRFTISRDDQSILYLQMNLLKT

AYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKT

SEQ ID NO.2
hu3-73/FR4huJ1

III

EDTAMYYCVR	HGNFGNSYVSWFAY	WGQGT
EDTAMYYCTR	-----	WGQGT

SEQ ID NO.2
hu3-73

VTVSA
VTVSS

FIGURA 12

```

      E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L K L
1    GAGGTGCAGC TGCTCGAGTC TGGAGGAGGA TTGGTGCAGC CTGGAGGGTC ATTGAAACTC
      CTCCACGTCG ACGAGCTCAG ACCTCCTCCT AACCACGTCG GACCTCCCAG TAACTTTGAG

      S C A A S G F T F N T Y A M N W V R Q A
61   TCATGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAAT ACCTACGCCA TGAAGTGGGT CCGCCAGGCT
      AGTACACGTC GGAGACCTAA GTGGAAGTTA TGGATGCGGT ACTTGACCCA GGCGGTCCGA

      P G K G L E W V A R I R S K Y N N Y A T
121  CCAGGAAAGG GTTTGGAAATG GGTGCTCGC ATAAGAAGTA AATATAATAA TTATGCAACA
      GGTCTTTCC CAAACCTTAC CCAACGAGCG TATTCTTCAT TTATATTATT AATACGTTGT

      Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T
181  TATTATGCCG ATTCAGTGAA AGACAGGTTT ACCATCTCCA GAGATGATTC AAAAAACT
      ATAATACGGC TAAGTCACTT TCTGTCCAAG TGGTAGAGGT CTCTACTAAG TTTTTTGTGA

      A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R
241  GCCTATCTAC AAATGAACAA CTTGAAAAC T GAGGACTG CCGTGTACTA CTGTGTGAGA
      CGGATAGATG TTTACTTGTT GAACTTTGA CTCCTGTGAC GGCACATGAT GACACACTCT

      H G N F G N S Y V S W F A Y W G Q G T L
301  CATGGGAACT TCGGTAATAG CTACGTTTCC TGGTTTGCTT ACTGGGGCCA AGGGACTCTG
      GTACCCTTGA AGCCATTATC GATGCAAAGG ACCAAACGAA TGACCCCGGT TCCCTGAGAC

      V T V S S
361  GTCACCGTCT CCTCA
      CAGTGGCAGA GGAGT

```

FIGURA 13

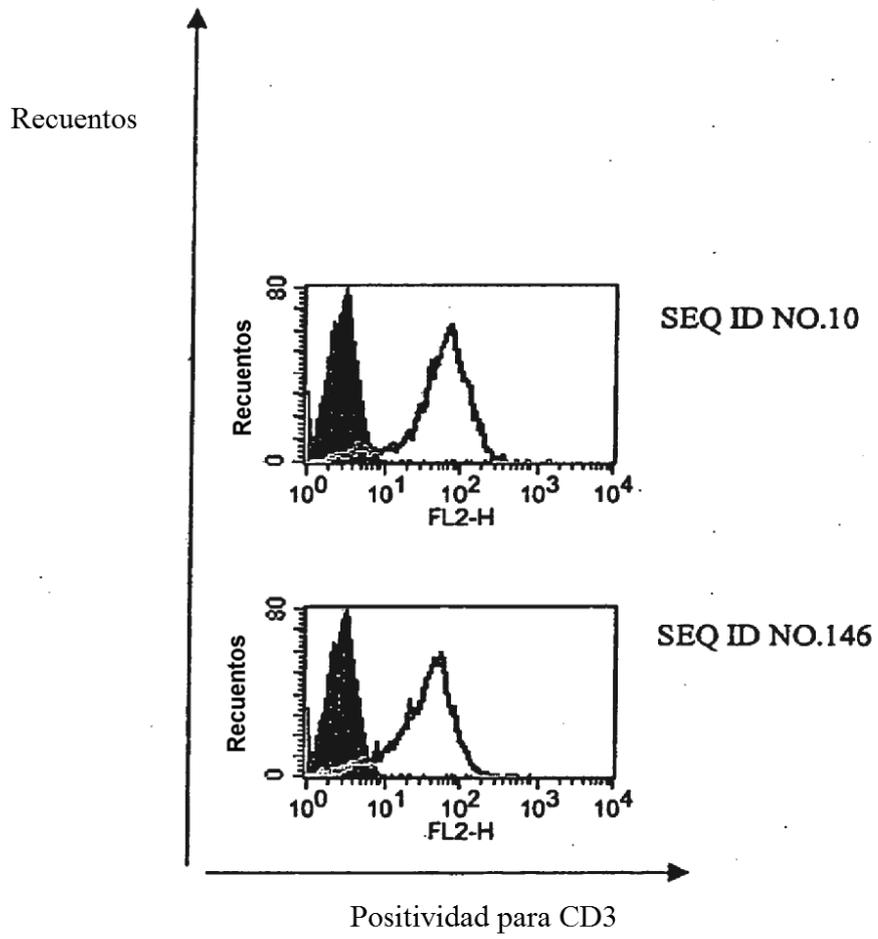


FIGURA 14

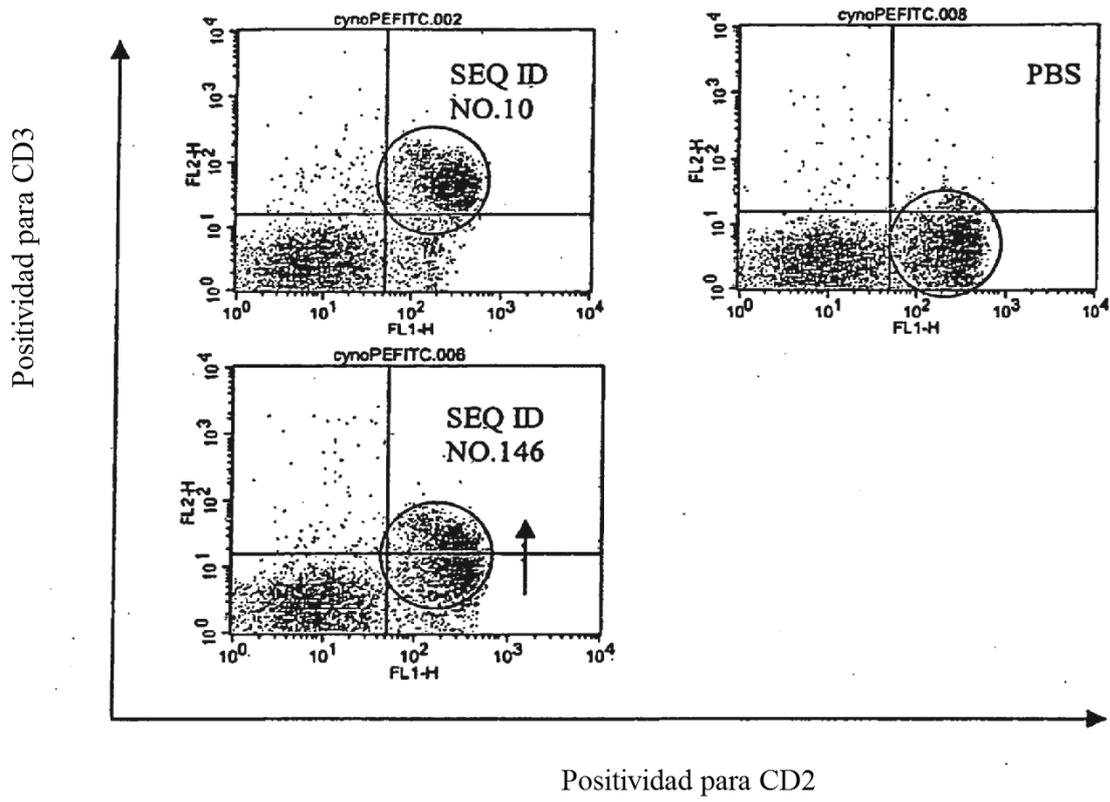


FIGURA 15

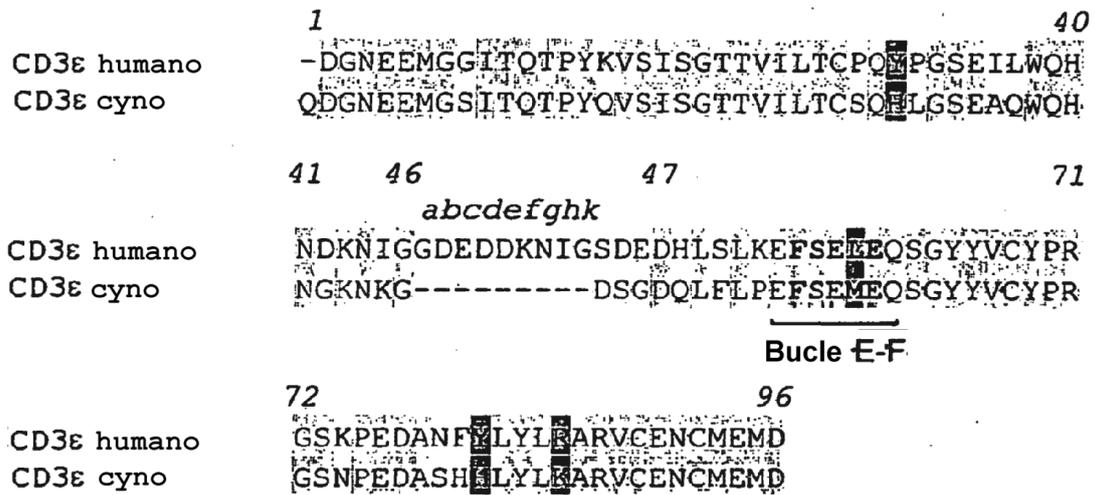


FIGURA 16

1 QDGNEEMGSITQT
 2 GNEEMGSITQTPY
 3 EEMGSITQTPYQV
 4 MGSITQTPYQVSI
 5 SITQTPYQVSISG
 6 TQTPYQVSISGTT
 7 TPYQVSISGTTVI
 8 YQVSISGTTVILT
 9 VSISGTTVILTSS
 10 ISGTTVILTSSQH
 11 GTTVILTSSQHLG
 12 TVILTSSQHLGSE
 13 ILTSSQHLGSEAQ
 14 TSSQHLGSEAQWQ
 15 SQHLGSEAQWQHN
 16 HLGSEAQWQHNGK
 17 GSEAQWQHNGKNK
 18 EAQWQHNGKNKGD
 19 QWQHNGKNKGD SG
 20 QHNGKNKGD SGDQ
 21 NGKNKGD SGDQLF
 22 KNKGD SGDQLFLP
 23 KGDSGDQLFLPEF
 24 DSGDQLFLPEFSE
 25 GDQLFLPEFSEME
 26 QLFLPEFSEMEOS
 27 FLPEFSEMEOSGY
 28 PEESEMEOSGYVY
 29 FESEMEOSGYVSY
 30 EMEOSGYVSYPR
 31 EQSGYYVSYPRGS
 32 SGYYVSYPRGSNP
 33 YYVSYPRGSNPED
 34 VSYPRGSNPEDAS
 35 YPRGSNPEDASHH
 36 RGSNPEDASHHLY
 37 SNPEDASHHLYLK
 38 PEDASHHLYLKAR
 39 DASHHLYLKARVS
 40 SHHLYLKARVSEN
 41 HLYLKARVSENSM
 42 YLKARVSENSMEM
 43 LKARVSENSMEMD

FIGURA 17

1 DGNEEMGGITQTP
 2 NEEMGGITQTPYK
 3 EMGGITQTPYKVS
 4 GGITQTPYKVSIS
 5 ITQTPYKVSISGT
 6 QTPYKVSISGTTV
 7 PYKVSISGTTVIL
 8 KVSISGTTVILTS
 9 SISGTTVILTSPQ
 10 SGTTVILTSPQYP
 11 TTVILTSPQYPGS
 12 VILTSPQYPGSEI
 13 LTSPQYPGSEILW
 14 SPQYPGSEILWQH
 15 OYPGSEILWOHND
 16 PGSEILWOHNDKN
 17 SEILWOHNDKNIG
 18 ILWOHNDKNIGGD
 19 WOHNDKNIGGED
 20 HNDKNIGGEDDK
 21 DNIGGEDDKNI
 22 NIGGEDDKNIGS
 23 GGEDDKNIGSDE
 24 DEDDKNIGSDEDH
 25 DDKNIGSDEDHLS
 26 KNIGSDEDHLSLK
 27 IGSDEDHLSLKEF
 28 SDEDHLSLKEFSE
 29 EDHLSLKEFSELE
 30 HLSLKEFSELEQS
 31 SLKEFSELEQSGY
 32 KEFSELEOSGYV
 33 FSELEOSGYVSY
 34 ELEQSGYVSYPR
 35 EQSGYVSYPRGS
 36 SGYVSYPRGSKP
 37 YVSYPRGSKPED
 38 VSYPGSKPEDAN
 39 YPRGSKPEDANFY
 40 RGSKPEDANFYLY
 41 SKPEDANFYLYLR
 42 PEDANFYLYLRAR
 43 DANFYLYLRARVS
 44 NFYLYLRARVSEN
 45 YLYLRARVSENSM
 46 YLRARVSENSMEM
 47 LRARVSENSMEMD

FIGURA 18

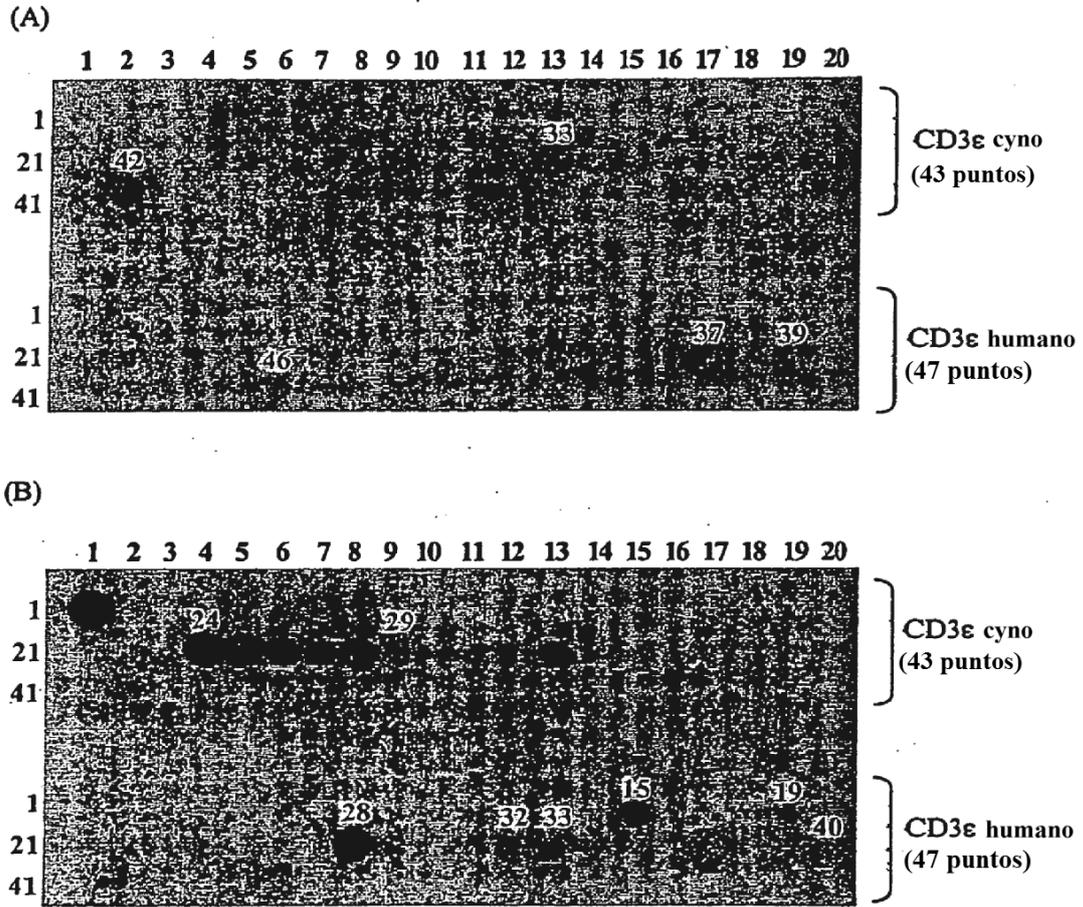


FIGURA 19

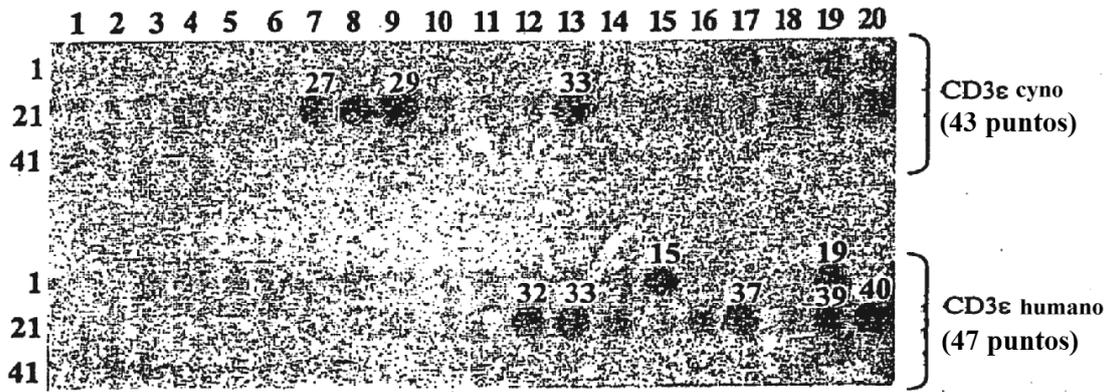


FIGURA 20

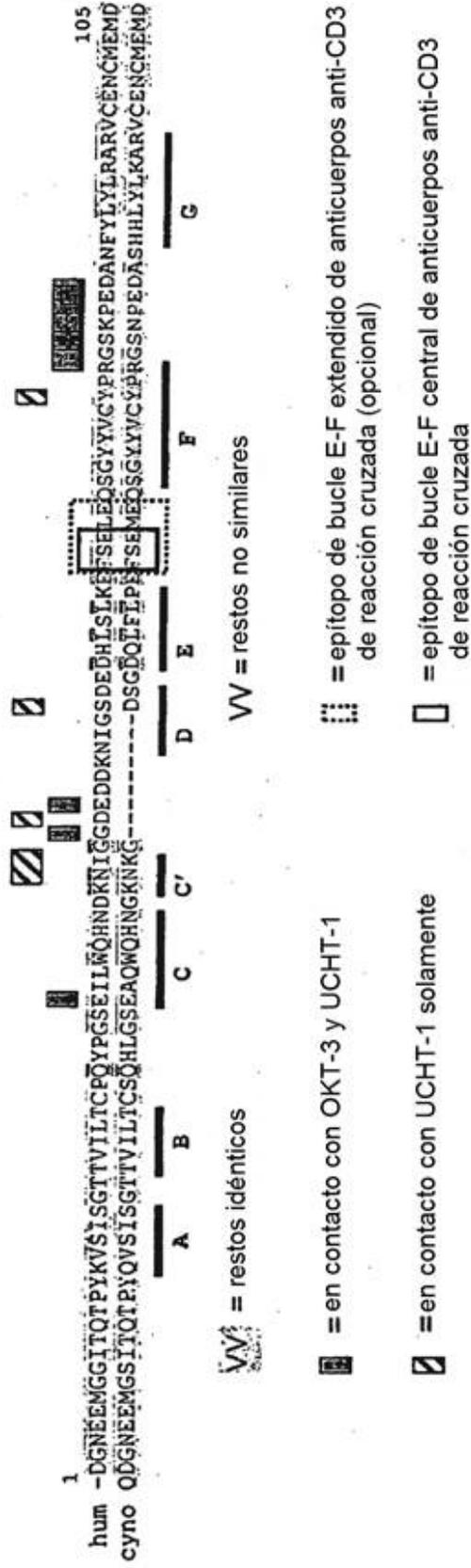


FIGURA 21

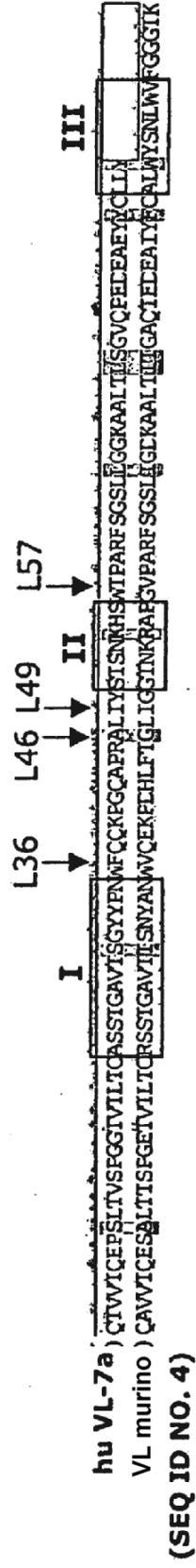


FIGURA 22

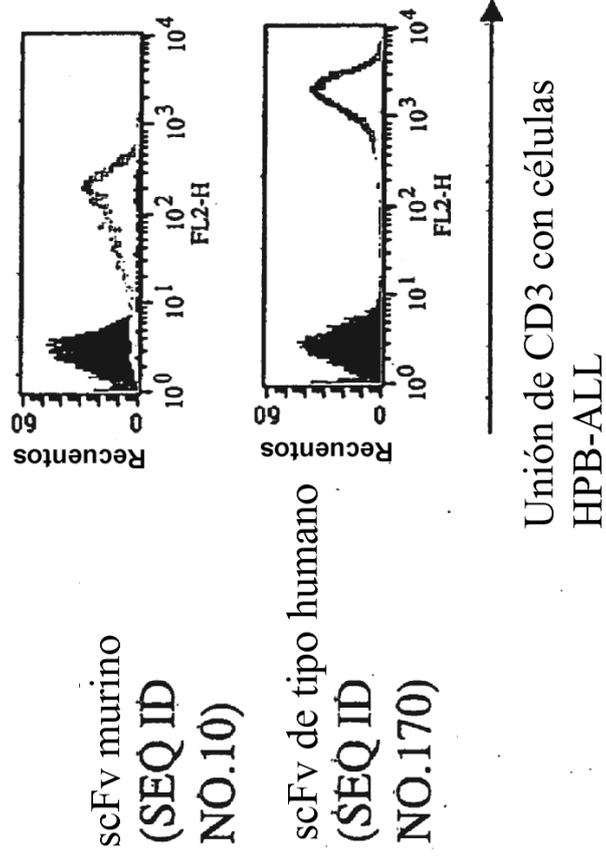


FIGURA 23

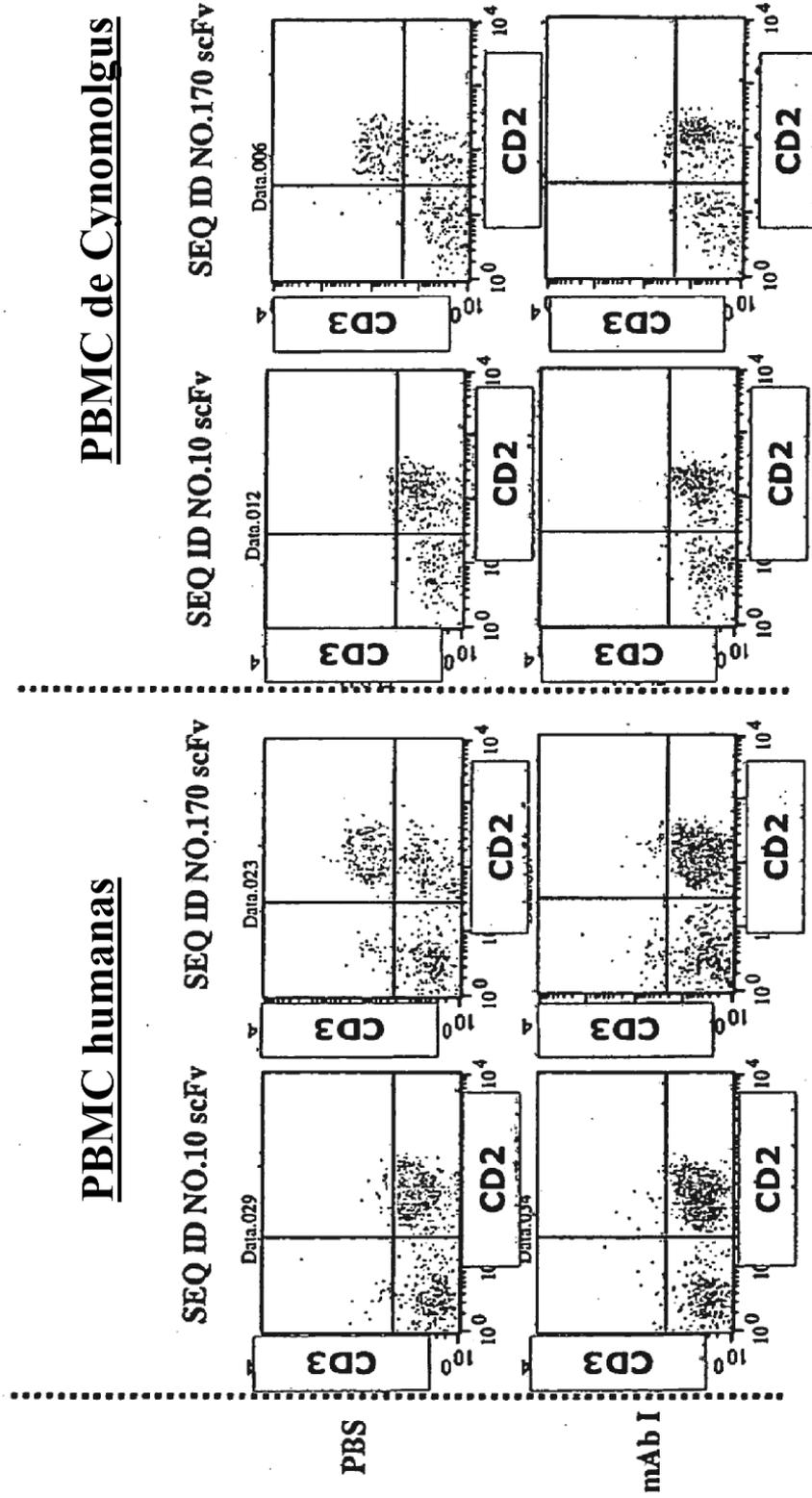
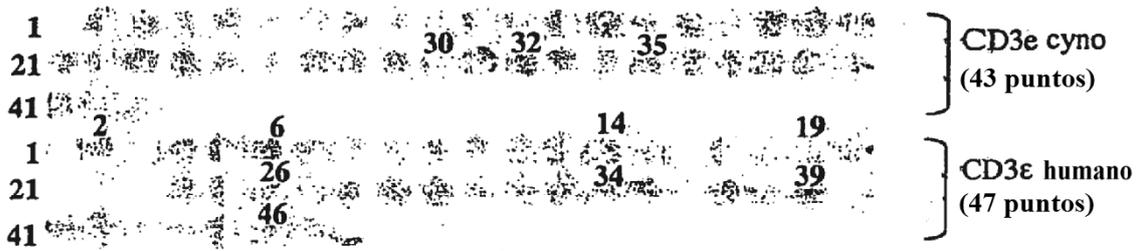


FIGURA 24

(A)



(B)

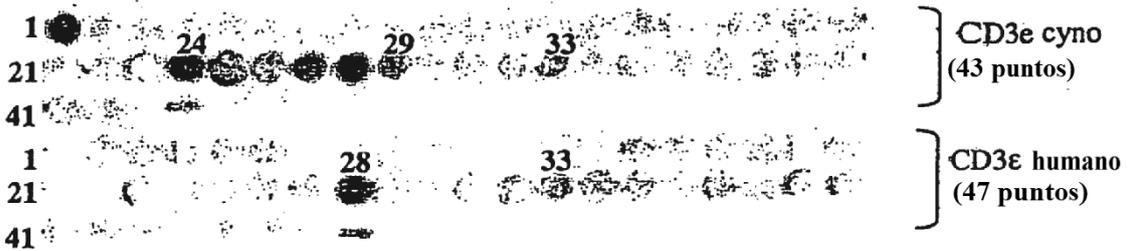


FIGURA 25

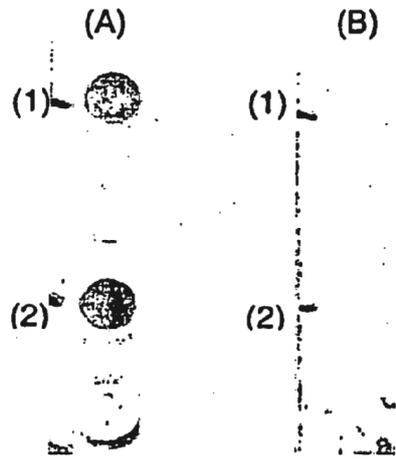


FIGURA 26
CAIX HL X SEQ ID NO. 194

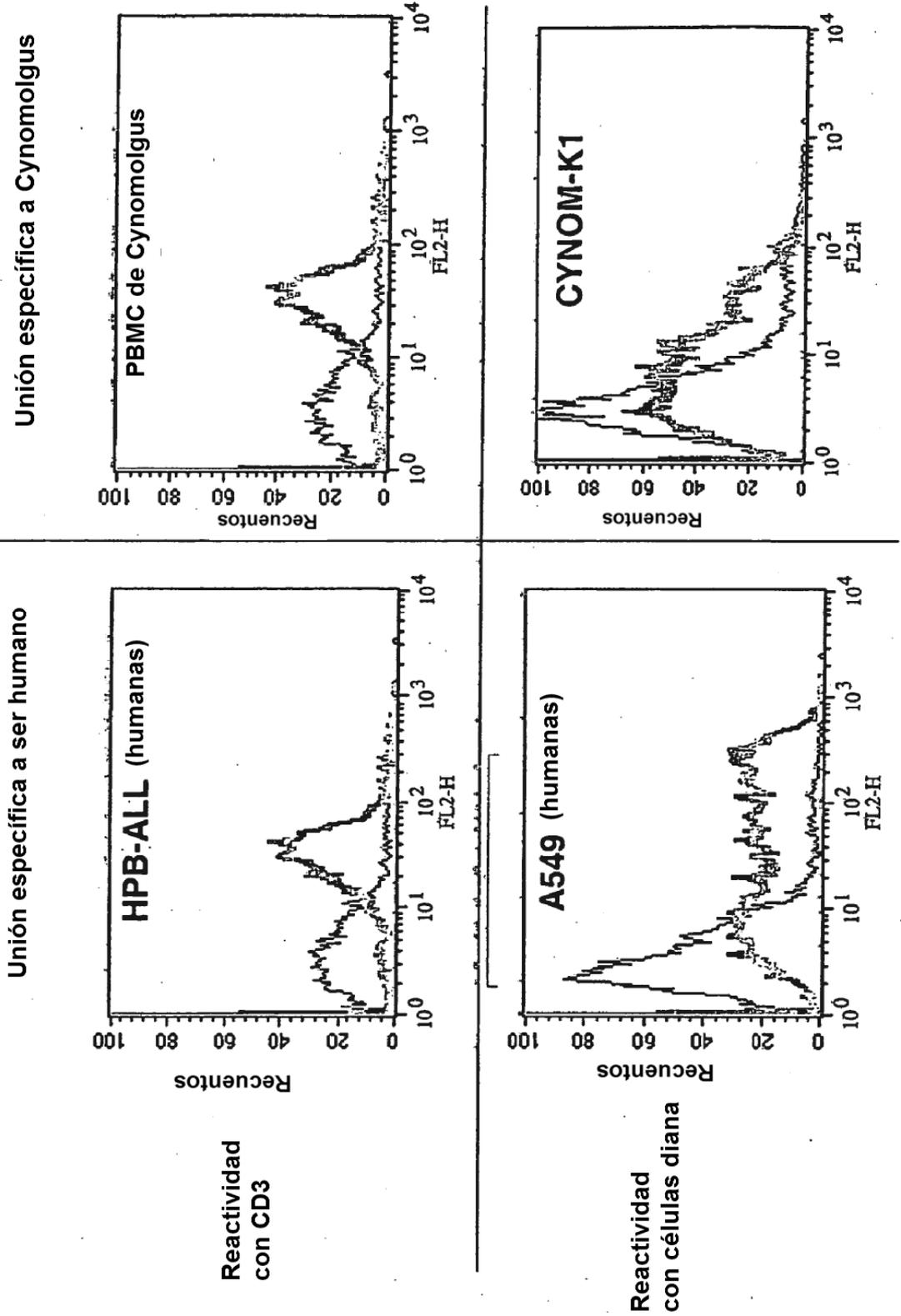


FIGURA 27

CAIX HL X SEQ ID NO. 170

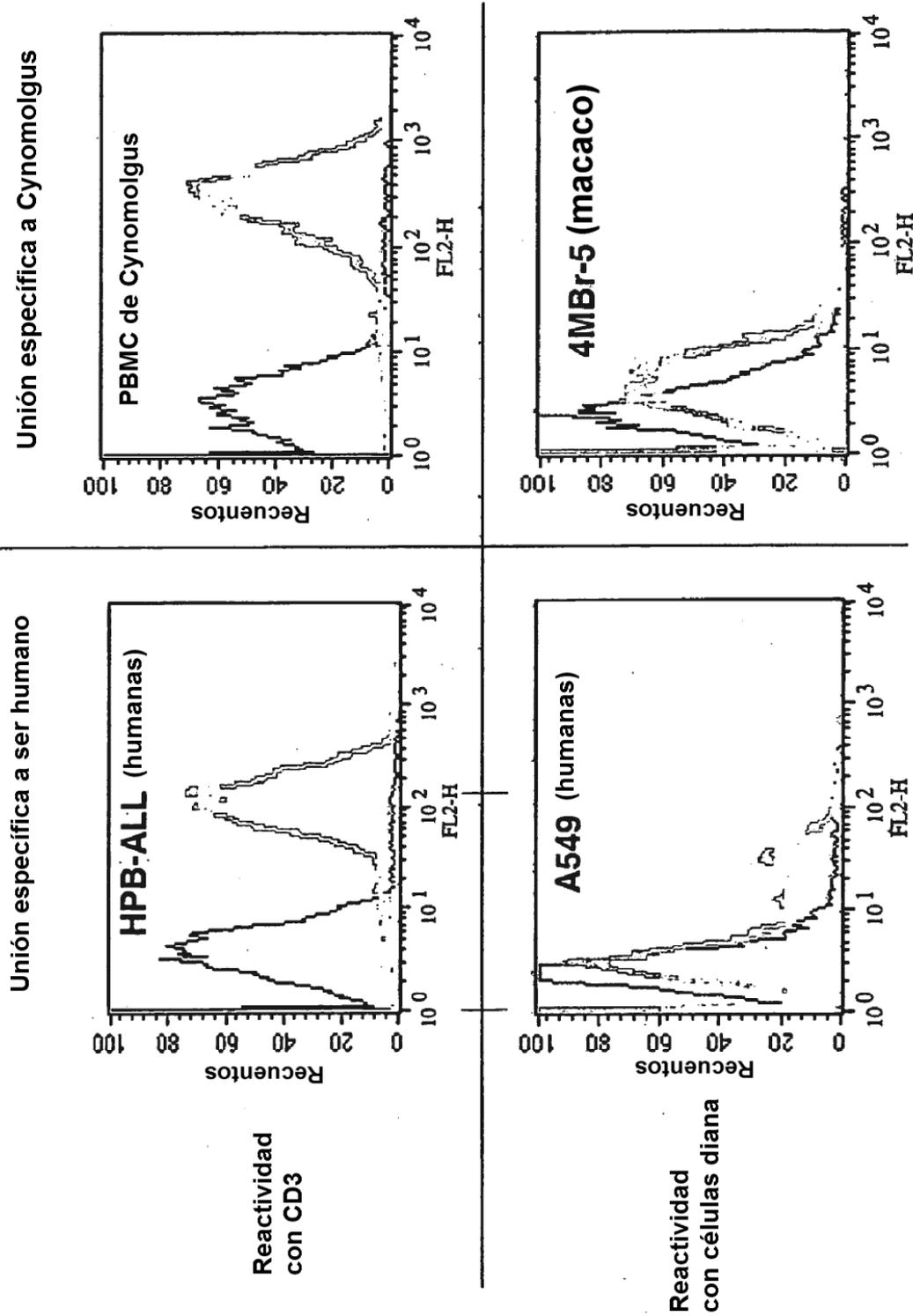
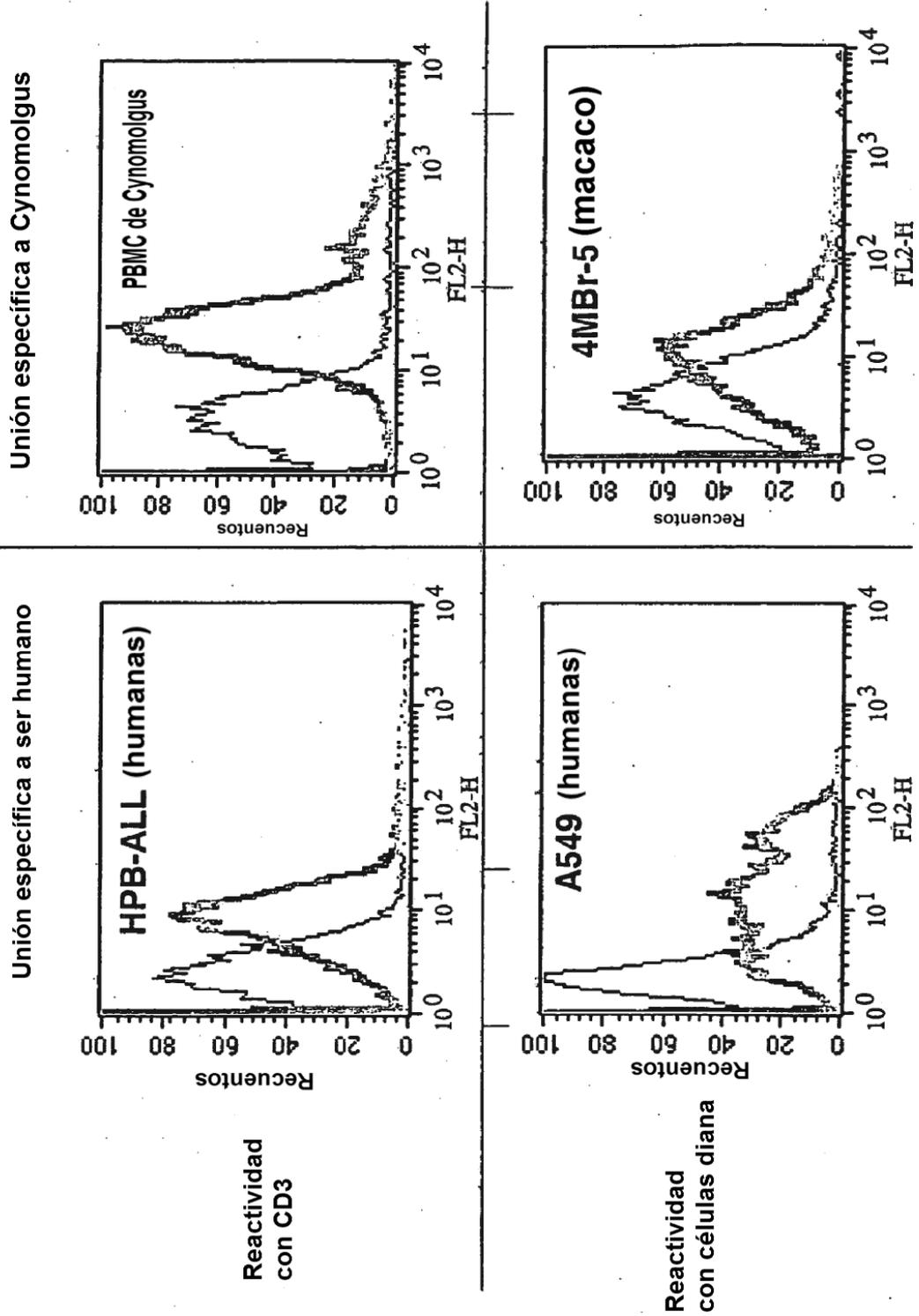


FIGURA 28

CAIX LH X SEQ ID NO. 170



EGFR HL X SEQ ID NO. 170

FIGURA 29

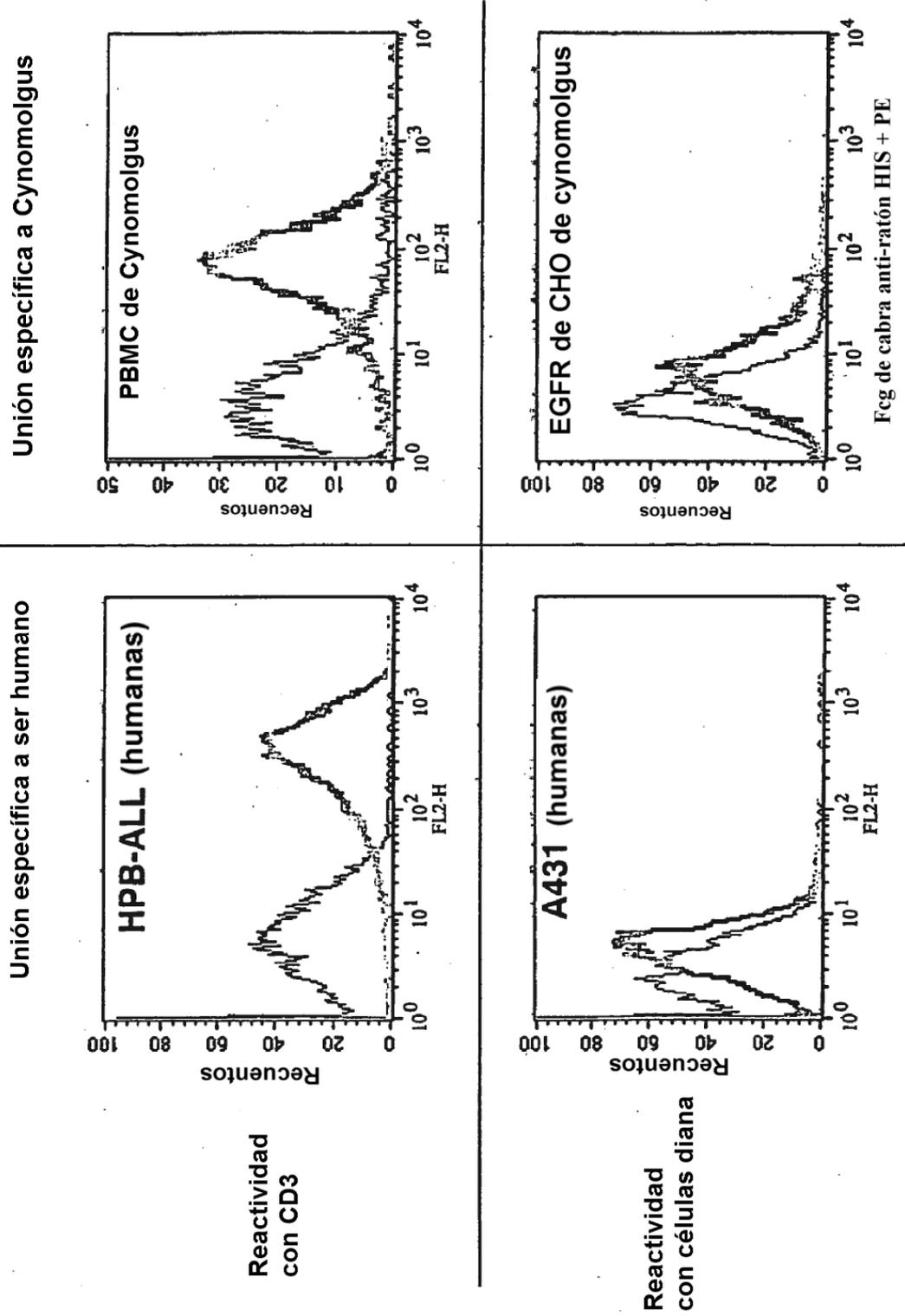


FIGURA 30
EGFR LH X SEQ ID NO. 170

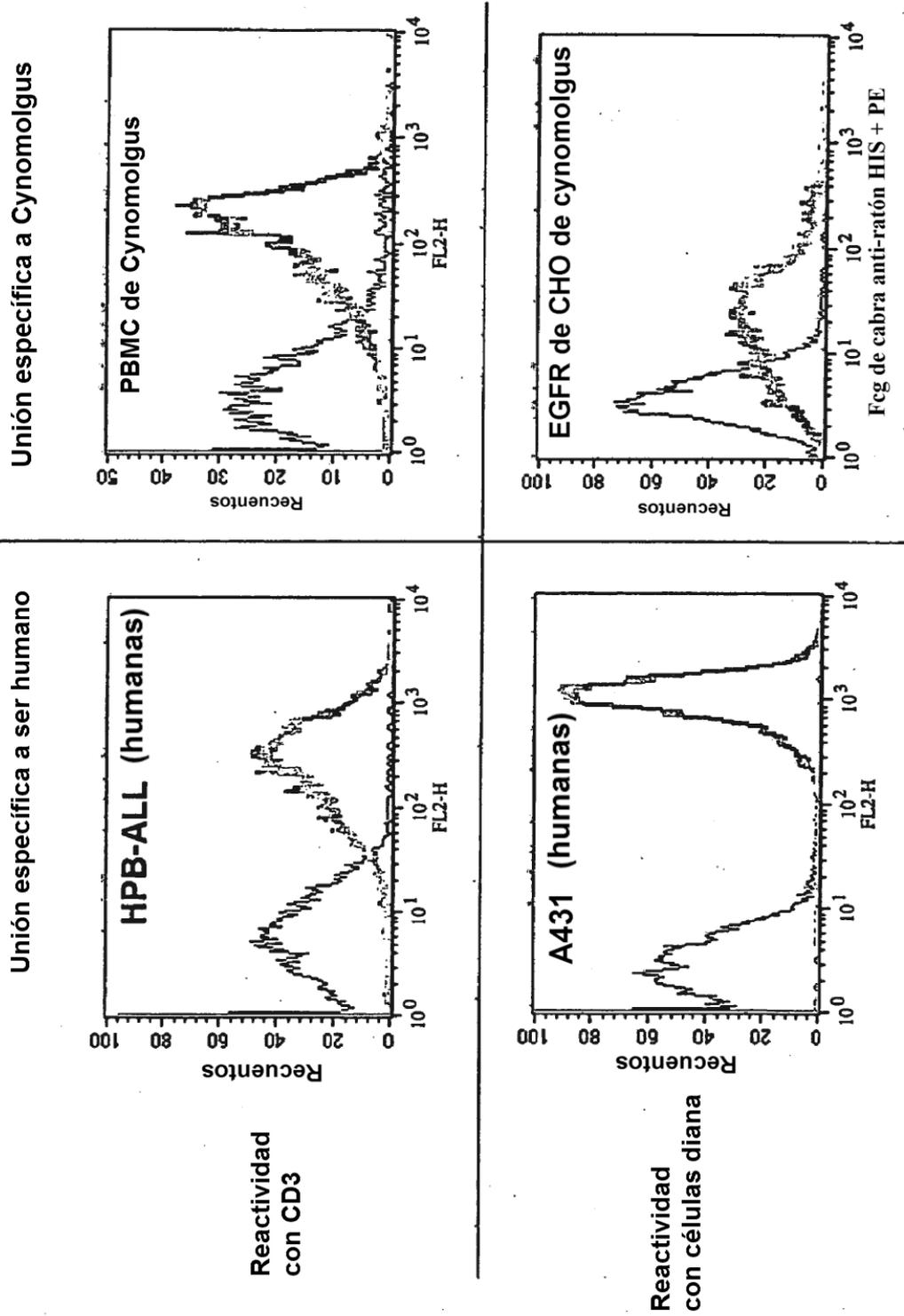


FIGURA 31
EGFR HL X SEQ ID NO. 194

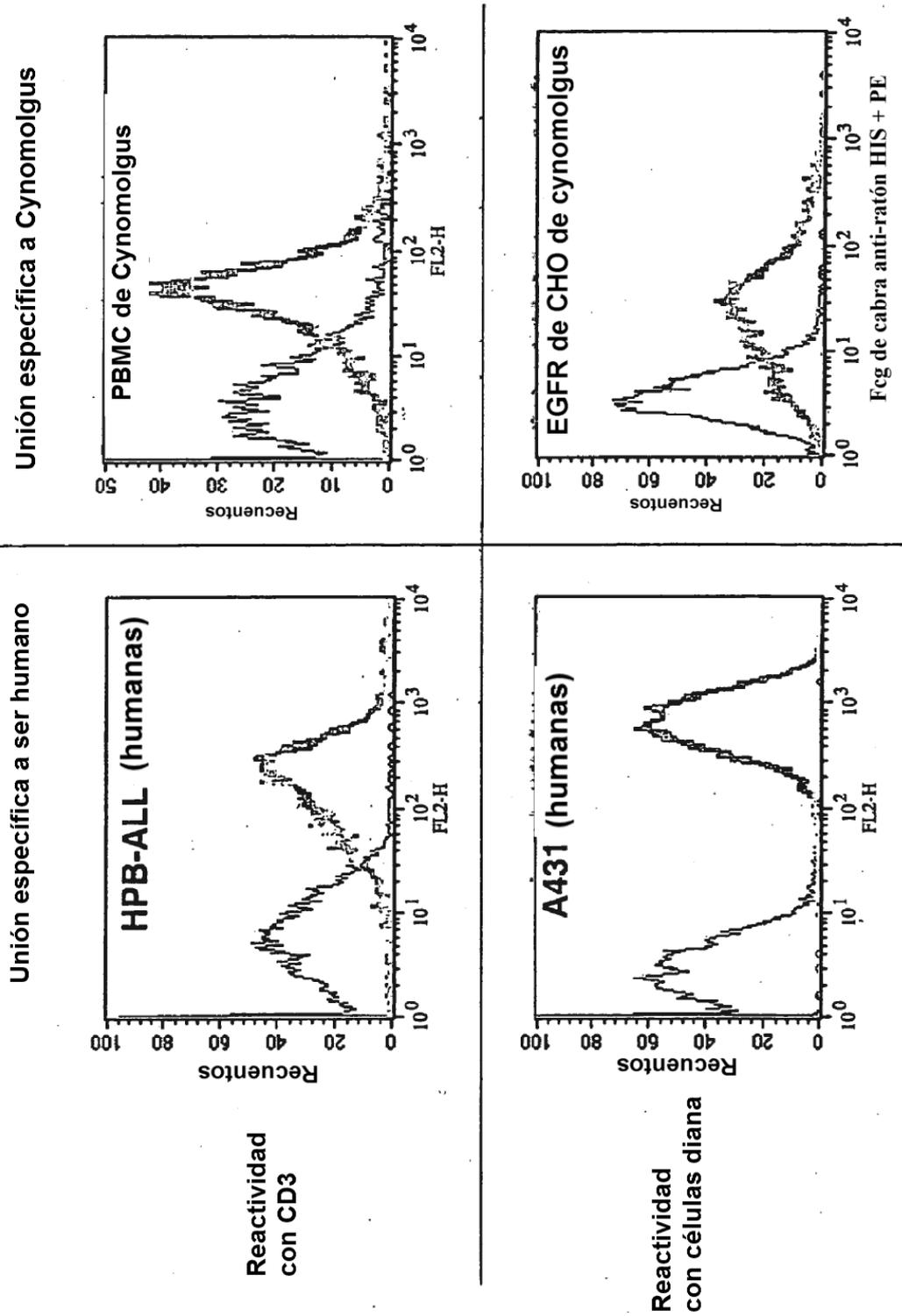


FIGURA 32 EGFR LH X SEQ ID NO. 194

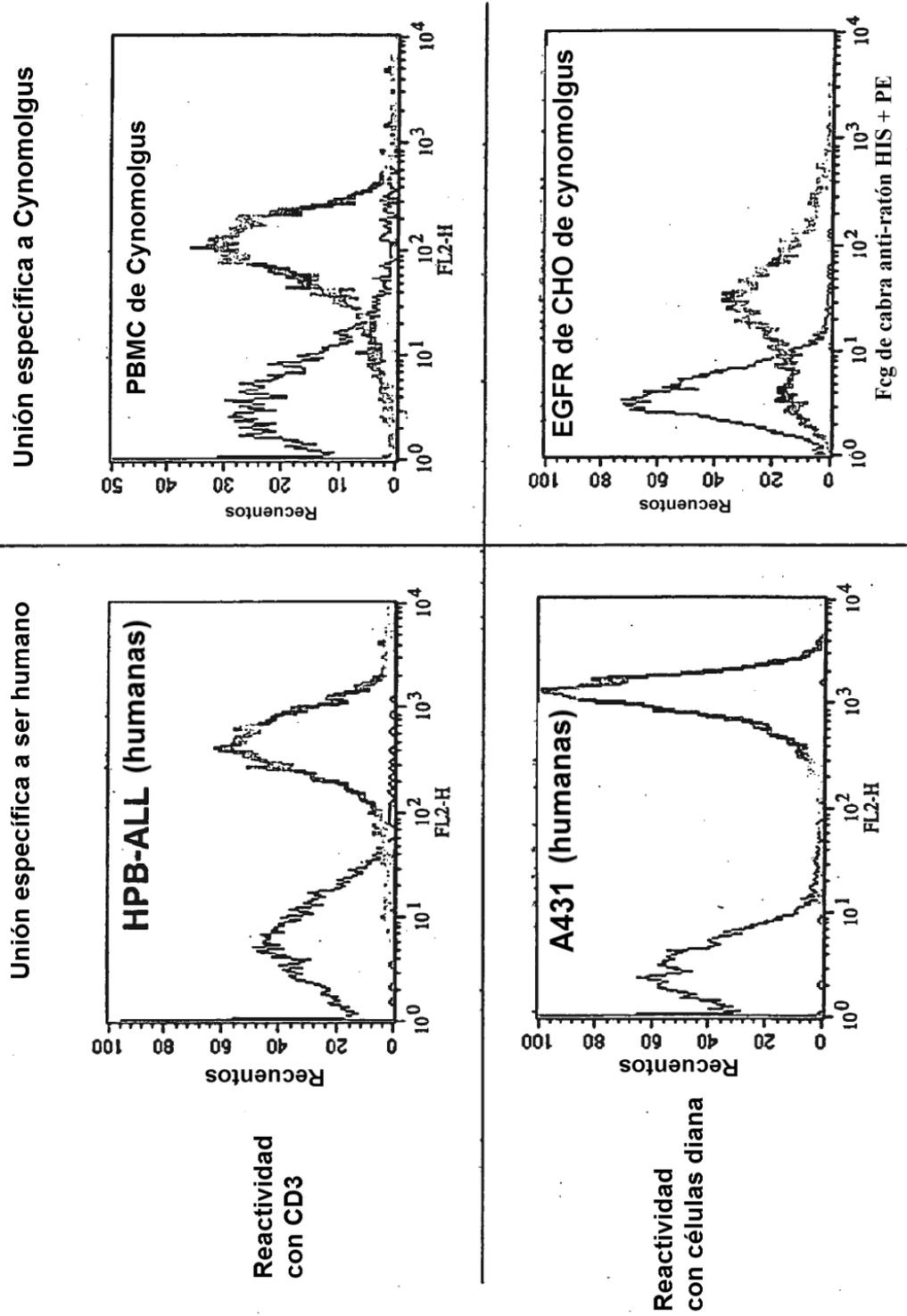


FIGURA 33 SEQ ID NO. 170 x EGFR HL

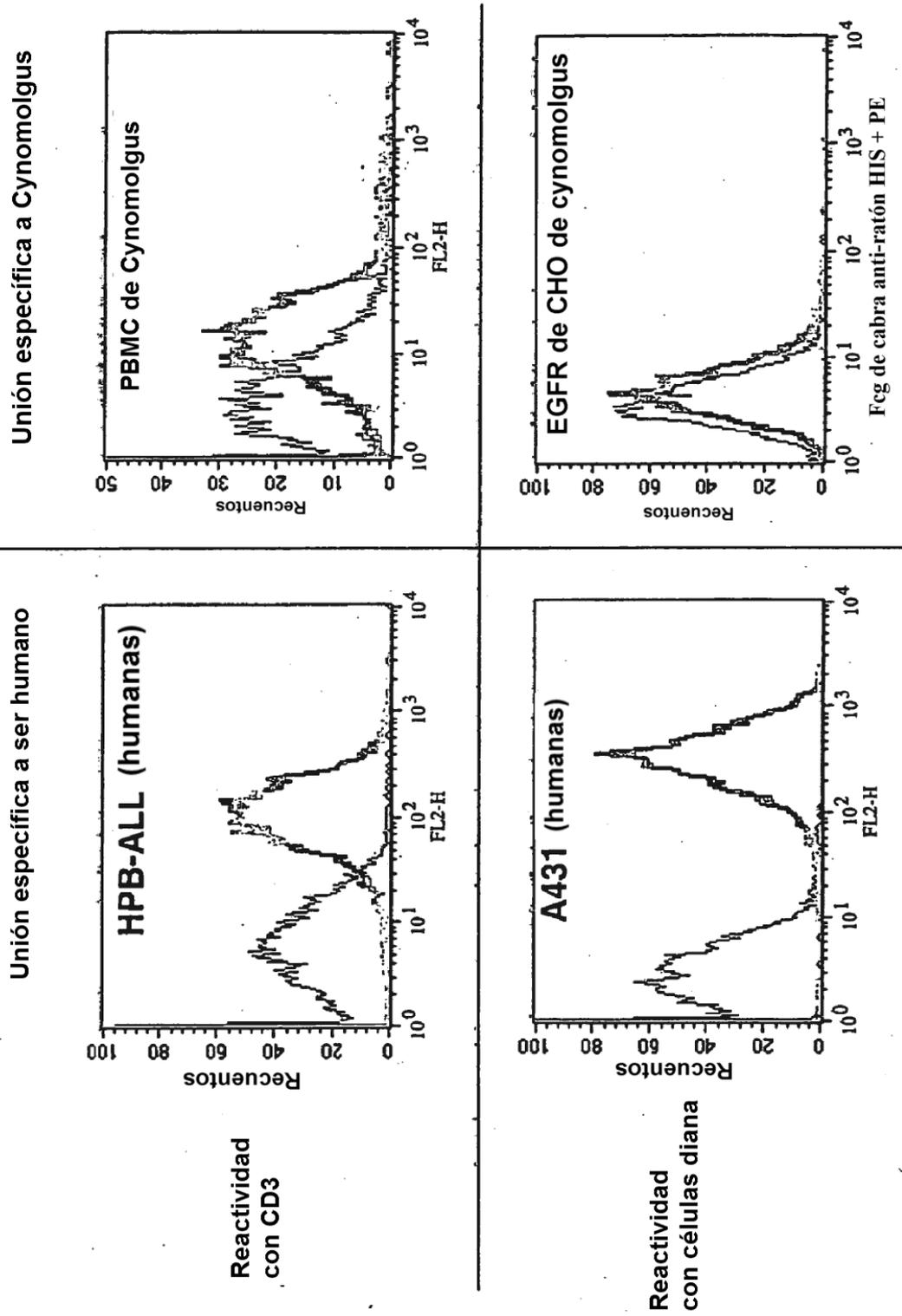


FIGURA 34

SEQ ID NO. 170 x EGFR LH

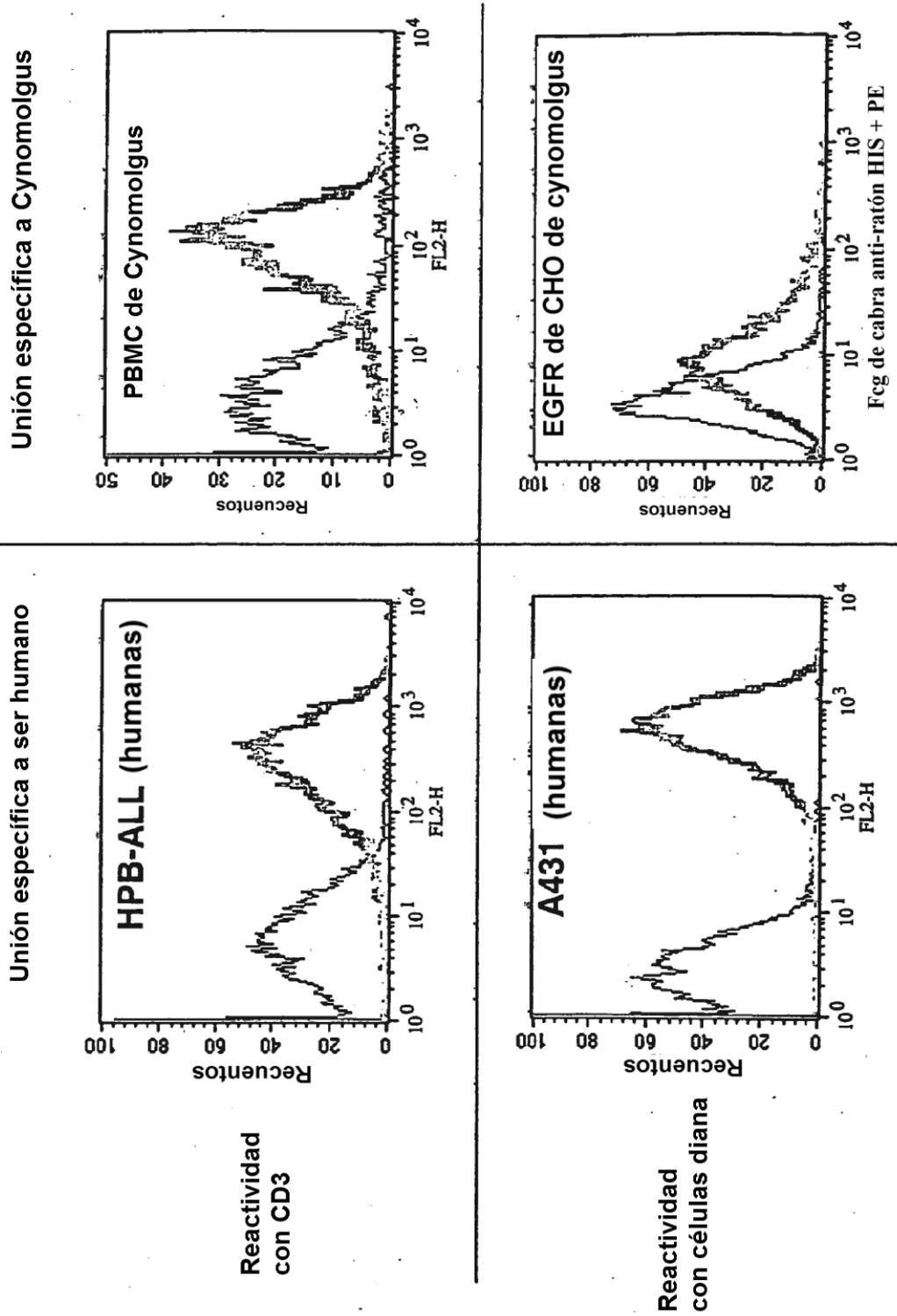
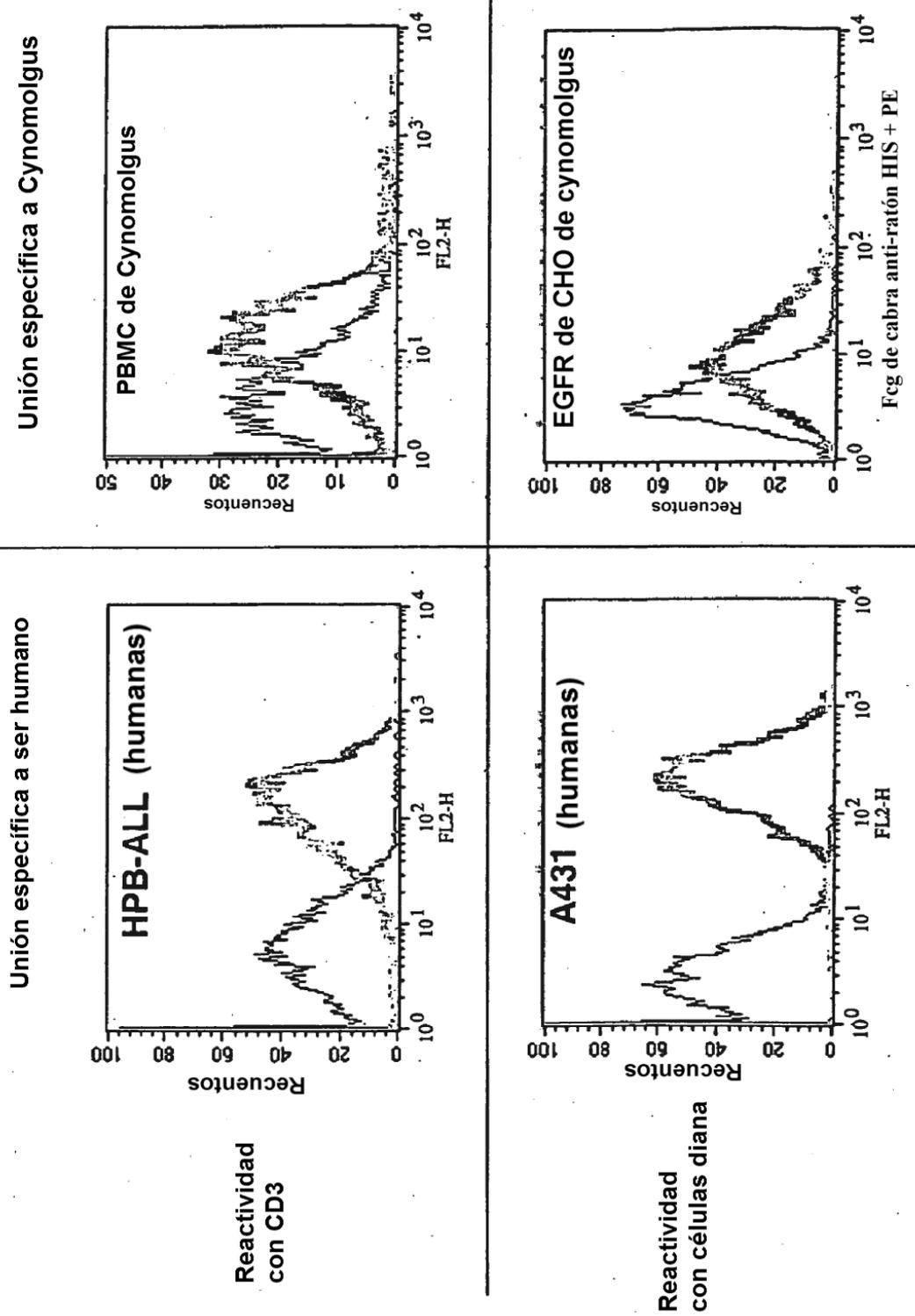


FIGURA 35

SEQ ID NO. 194 x EGFR HL



SEQ ID NO. 194 x EGFR LH

FIGURA 36

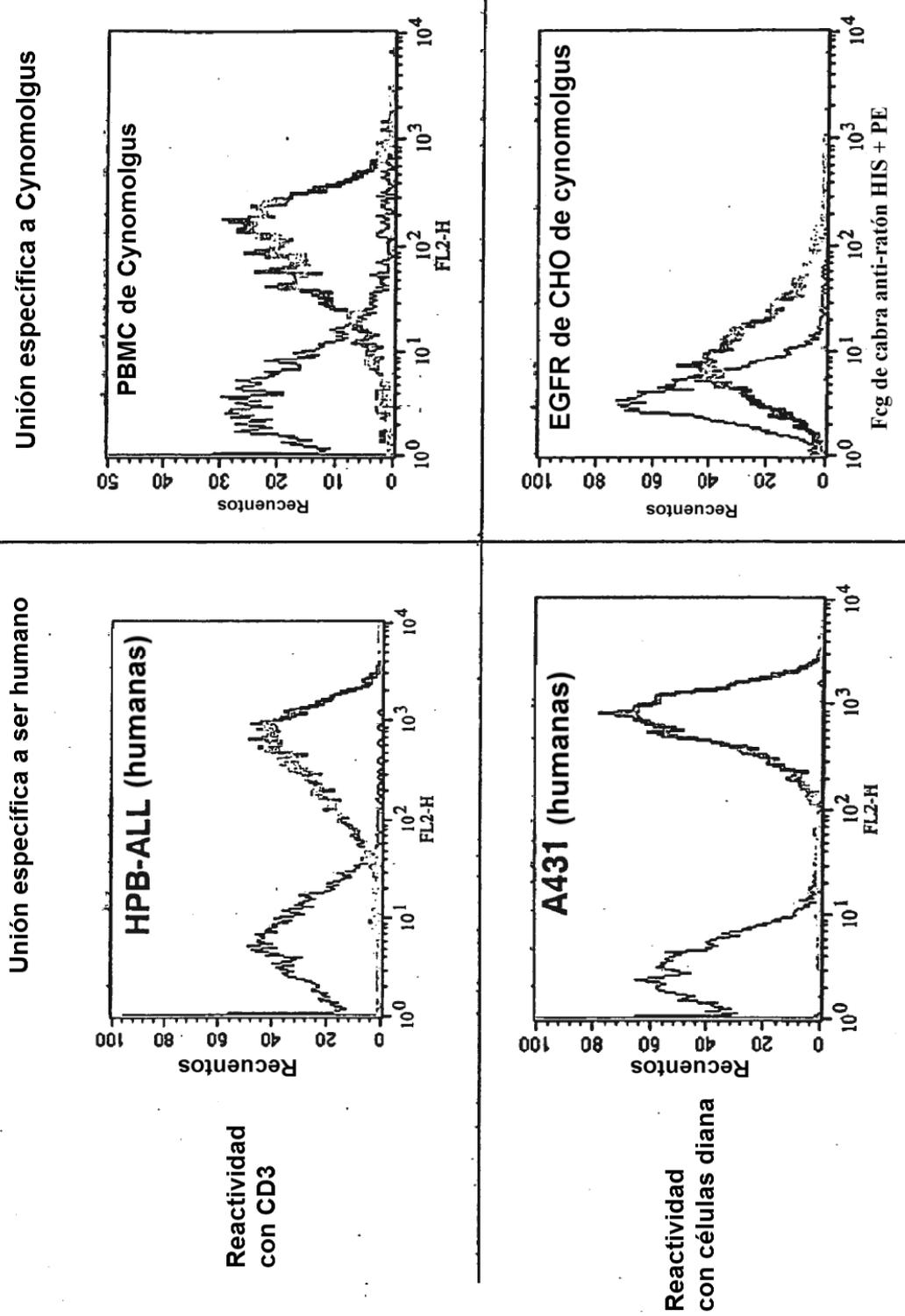
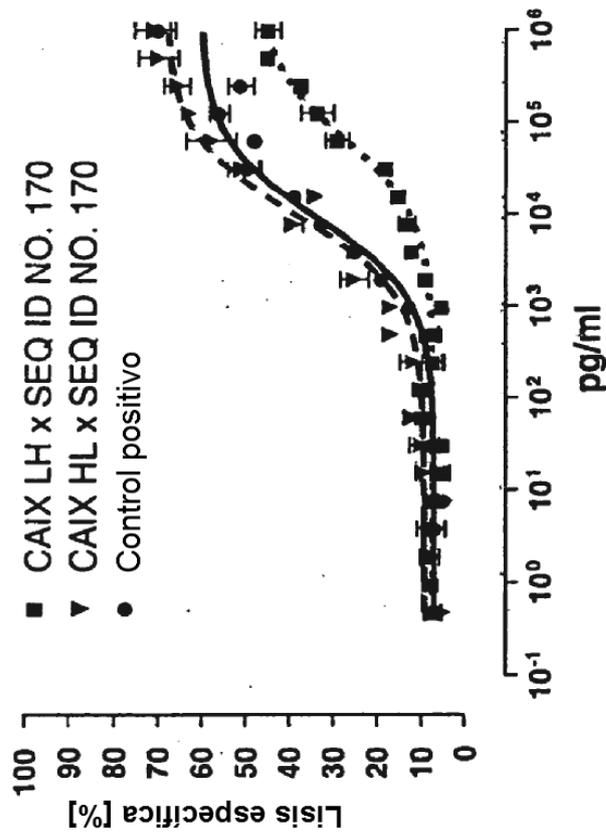


FIGURA 37

Células efectoras: linfocitos T CD8⁺ humanos estimulados
 Células diana: A549 (humanas)



Células efectoras: linfocitos T CD8⁺ de cyno. estimulados
 Células diana: 4MBr-5 (macaco)

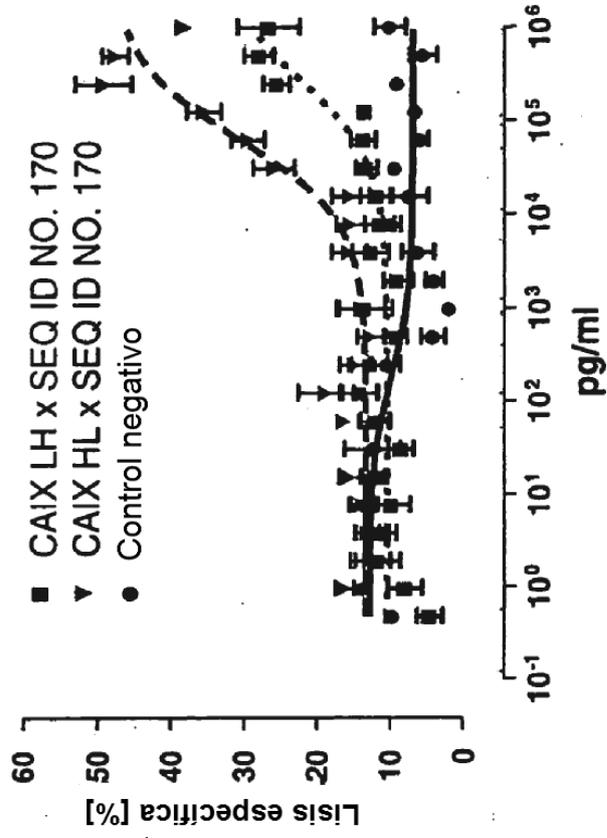


FIGURA 38

CAIX HL x SEQ ID NO. 194
Células efectoras: linfocitos T CD8⁺ estimulados
Células diana: A549

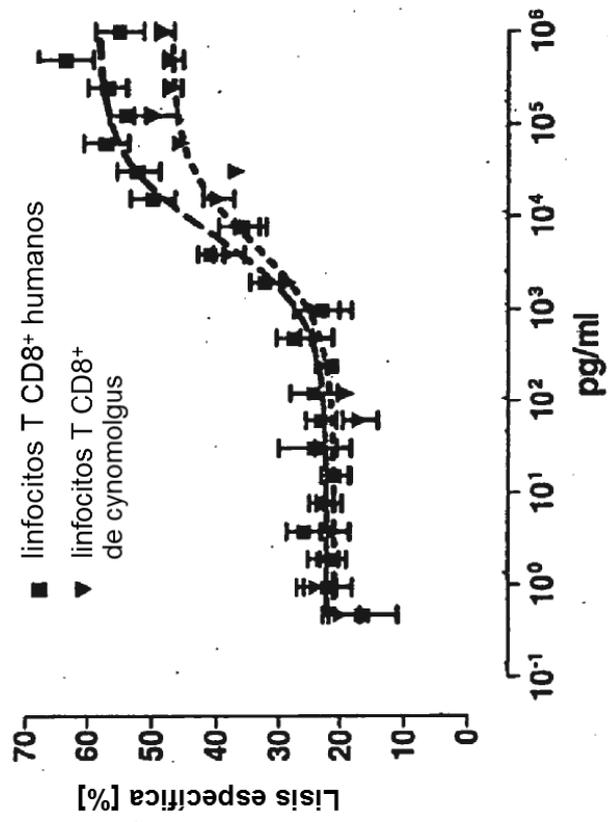


FIGURA 39

Células efectoras: linfocitos T CD8⁺ de cynomolgus estimulados
 Células diana: CHO transfectadas con EGFR de cynomolgus
 Las mediciones mostradas en esta figura se realizaron en un único ensayo

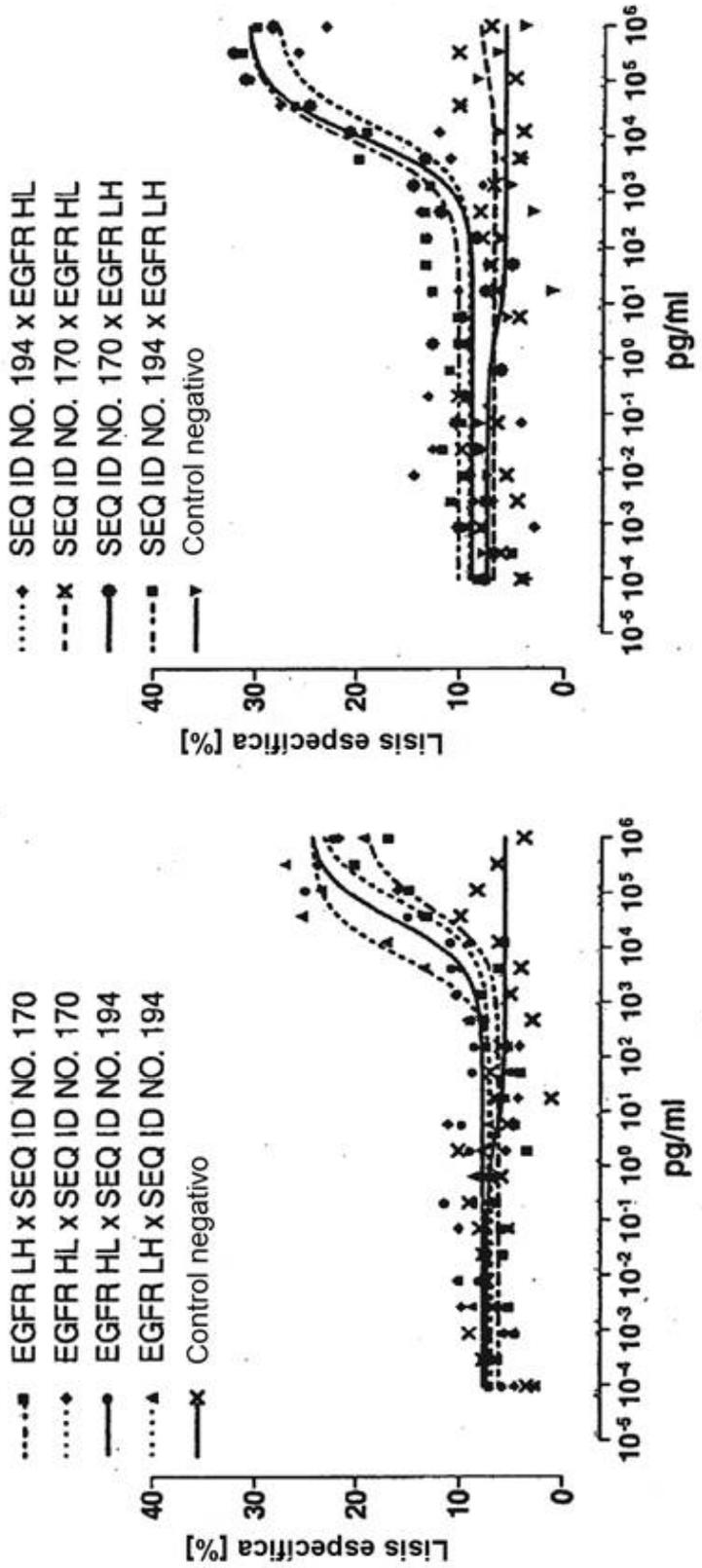


FIGURA 40

Células efectoras: linfocitos T CD8⁺ humanos estimulados
 Células diana: A431 (humanas)

Las mediciones mostradas en esta figura se realizaron en un único ensayo

