

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 950**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/EP2014/055223**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14718334 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2970449**

54 Título: **Moléculas de unión monocatenarias que comprenden ABP del extremo N**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792073 P

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

15.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KUFER, PETER;
LUTTERBUESE, RALF;
HOFFMANN, PATRICK y
NAHRWOLD, ELISABETH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 753 950 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

Moléculas de unión monocatenarias que comprenden ABP del extremo N

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico monocatenario que comprende al menos tres dominios de unión, en donde el primer dominio de unión se une a albúmina de suero y está situado en el extremo N del segundo dominio de unión, el segundo dominio de unión se une a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana en donde la molécula superficial es un antígeno de tumor, y el tercer dominio de unión se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T. Además, la invención proporciona métodos para la producción de dicha molécula de unión, una secuencia de ácidos nucleicos que la codifica, un vector que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos, y una célula hospedadora que expresa la molécula de unión de la invención. Además, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión de la invención, métodos de tratamiento que comprenden la etapa de administrar una molécula de unión de la invención y el uso médico de una molécula de unión de la invención.

Antecedentes de la invención

15 Una elevada semivida, en general, es útil en aplicaciones *in vivo* de inmunoglobulinas, especialmente anticuerpos y lo más especialmente fragmentos de anticuerpos de pequeño tamaño. Es probable que dichos fragmentos (Fvs, Fvs unidos por disulfuro, Fabs, scFvs, dAbs) sufran una rápida eliminación del cuerpo; así, mientras son capaces de llegar a la mayoría de las partes del cuerpo rápidamente, y son rápidos de producir y fáciles de manipular, sus aplicaciones *in vivo* se pueden limitar por su breve persistencia *in vivo*.

20 Se conocen en la técnica moléculas biespecíficas, tales como la molécula de unión al antígeno biespecífica dimérica del formato de dímero en tándem que es específico para CD3 y CD19 (véase el documento de patente EP 2 361 936 A1). Las moléculas biespecíficas adicionales, tales como anticuerpos BiTE® (acoplador biespecífico de linfocitos T), son construcciones de proteína recombinante preparadas a partir de dos anticuerpos monocatenarios (scFv) flexiblemente unidos. Un scFv de anticuerpos BiTE es específico para un antígeno de superficie asociado a tumor seleccionado sobre células diana; el segundo scFv es específico para CD3, una subunidad del complejo de receptor de linfocitos T sobre linfocitos T. Por su diseño particular y unión bivalente, los anticuerpos BiTE son excepcionalmente aptos para unir transitoriamente linfocitos T a células diana y, al mismo tiempo, activan potentemente el potencial citolítico inherente de los linfocitos T contra células diana. Las moléculas BiTE son proteínas pequeñas con un peso molecular inferior al corte renal que probablemente podrían dar como resultado una semivida más corta, una característica que es compartida por BiTEs con muchos otros formatos de anticuerpo (véase, por ejemplo, WOLF E ET AL: "BiTEs: bispecific antibody constructs with unique antitumor activity", DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 10, no. 18, 15 de septiembre de 2005 (15-09-2005), páginas 1237-1244, o el documento de patente WO 2010/037838 A2. En realidad, mientras que es deseable, por una parte, tener una molécula de unión pequeña, puesto que, por ejemplo, puede alcanzar rápidamente su localización designada en el cuerpo y también puede alcanzar la mayoría de las partes del cuerpo, el "tamaño" de dicha molécula de unión no es favorable en lo que respecta a, en particular, la eliminación renal ya que son rápidamente eliminadas de la sangre (véase, por ejemplo, KONTERMANN R E: "Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies", BIODRUGS: CLINICAL IMMUNOTHERAPEUTICS, BIOPHARMACEUTICALS AND GENE THERAPY, ADIS INTERNATIONAL, FR, vol. 23, no. 2, 1 de abril de 2009 (01-04-2009), páginas 93-109, o el documento de patente WO 2009/147248 A2. También puede ocurrir que dicha molécula de unión se degrade más rápido, puesto que no tiene, por así decirlo, buena protección natural, a menos que se establezca antes, por ejemplo, por cambios de aminoácido. Así, es un acto de equilibrio entre el tamaño pequeño y la estabilidad/eliminación renal. Por tanto, es deseable tener disponible una molécula de unión, en particular, una molécula de unión biespecífica que sea mejorada en su estabilidad y/o retardada en su eliminación renal, teniendo así una elevada semivida global en suero, pero ventajosamente todavía tan pequeña que se pueda fabricar con buen rendimiento y/o se manipule convenientemente.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico monocatenario que comprende al menos tres dominios de unión, en donde

- 50 (a) el primer dominio de unión se une a albúmina de suero, comprende SEQ ID Nos. 2, 4 o 6, y está situado en el extremo N del segundo dominio de unión;
- (b) dicho segundo dominio de unión se une a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana en donde la molécula superficial es un antígeno de tumor; y
- (c) el tercer dominio de unión se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T,
- 55 en donde los tres dominios están consecutivamente en una cadena de polipéptidos en el orden desde el extremo N hasta el extremo C

- el primer dominio de unión;
- el segundo dominio de unión; y
- el tercer dominio de unión.

5 La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico monocatenario que comprende al menos tres dominios de unión comprendidos en una cadena de polipéptidos, en donde

(a) el primer dominio es capaz de unirse a albúmina de suero y está situado en el extremo N del segundo dominio de unión;

(b) dicho segundo dominio es capaz de unirse a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana; y

10 (c) el tercer dominio es capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T,

en donde el porcentaje de molécula de unión monomérica expresable [en relación con la cantidad total de molécula de unión] depende del orden del primer y segundo dominio de unión en dicha molécula de unión.

15 En una realización, el anticuerpo biespecífico de la invención se caracteriza de tal forma que al menos uno de los dominios de unión, preferentemente el segundo y/o tercer dominio de unión, sea un scFv o anticuerpo de un solo dominio.

También en una realización del anticuerpo biespecífico de la invención la molécula también comprende uno o más polipéptidos heterólogos adicionales.

20 Un anticuerpo biespecífico de la invención también puede comprender una marca His como polipéptido heterólogo. Se prefiere para la molécula de unión de la invención que la marca His se sitúe en el extremo C del tercer dominio de unión.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico, en donde

(a) el primer dominio de unión es capaz de unirse a albúmina de suero de primate humano y no humano;

(b) el segundo dominio de unión es capaz de unirse a la molécula de la superficie celular sobre una célula de primate humano y no humano, y

25 (c) el tercer dominio de unión es capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T sobre una célula de primate humano y no humano.

En una realización, el anticuerpo biespecífico según la invención se caracteriza por que el primer dominio de unión capaz de unirse a albúmina de suero deriva de una biblioteca combinatoria o un dominio de unión de anticuerpo.

En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención

30 • el segundo dominio de unión se une a la molécula de la superficie celular sobre una célula diana con una afinidad (KD) de ≤ 100 nM; y

• el tercer dominio de unión se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T con una afinidad (KD) de ≤ 100 nM.

35 En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención, la molécula de unión muestra actividad citotóxica en un ensayo *in vitro* que mide la lisis de células diana por células efectoras en presencia de 10 % de albúmina de suero humano.

En una realización preferida del anticuerpo biespecífico de la invención, la molécula consiste en una única cadena de polipéptidos.

En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención

40 (a) el segundo dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpo; y/o

(b) el segundo dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpo.

45 En una realización preferida del anticuerpo biespecífico de la invención, el segundo dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T es capaz de unirse a un epítipo de cadena CD3 ϵ humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 2, 4, 6 u 8 del documento de patente WO 2008/119567 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID NO: 37).

En una realización preferida de la invención, el segundo dominio de unión es capaz de unirse a CD33 o CEA.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la invención se caracteriza por una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NOs: 8, 12, 16, 20, 24, 26, 30 o 34.

5 Una realización alternativa de la invención proporciona un método para la producción de anticuerpo biespecífico de la invención, comprendiendo el método la etapa de:

- seleccionar anticuerpos biespecíficos que comprenden un dominio de unión, que es capaz de unirse a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana, que comprenden en el extremo N un dominio de unión que es capaz de unirse a albúmina de suero.

En una realización el método de la invención comprende además la etapa de:

- 10
- añadir al anticuerpo un dominio de unión adicional, que es capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T.

Proporcionando una realización la invención una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica una molécula de unión de la invención.

15 La invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la invención. La invención proporciona una célula hospedadora transformada o transfectada con la secuencia de ácidos nucleicos de la invención o con el vector de la invención.

20 En una realización, la invención proporciona un proceso para la producción de un anticuerpo biespecífico de la invención o producido por un método de la invención, comprendiendo dicho proceso cultivar una célula hospedadora de la invención en condiciones que permiten la expresión de la molécula de unión de la invención o producida por un método de la invención y recuperar la molécula de unión producida del cultivo.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de la invención, o producido según el proceso de la invención.

25 Según una realización de la invención, el anticuerpo biespecífico de la invención, o el anticuerpo biespecífico producido según un método de la invención, es para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmunitaria.

Por tanto, en una realización, la invención proporciona un kit que comprende un anticuerpo biespecífico de la invención o producido según un método de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención, o una célula hospedadora de la invención.

30 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1:

Gráfico de un perfil de elución de la purificación de IMAC de un anticuerpo biespecífico SA-21-CEAxCD3. 1: Captura, 2: Lavado de muestra no unida, 3: Pre-elución Imidazol 50 mM, 4: Elución Imidazol 500 mM. Línea azul: Absorción óptica a 280 nm, línea roja: absorción óptica a 254 nm.

35 **Figura 2:**

Gráfico de un perfil de SEC para un anticuerpo biespecífico SA-21-CEAxCD3. Pico 1: Agregados (moléculas no de unión) en volumen vacío. Pico 2: Dímero de anticuerpo biespecífico. Pico 3: Monómero de anticuerpo biespecífico. Pico 4: Contaminantes de bajo peso molecular y sales. Absorción óptica a 280 nm, línea roja: absorción óptica a 254 nm.

40 **Figura 3:**

Actividad citotóxica de anticuerpos biespecíficos CD33 como se mide en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 18 horas en presencia de 10 % de HSA. Células efectoras: linfocitos T CD8 humanos enriquecidos estimulados. Células diana: células CHO transfectadas con CD33 humano. Relación entre células efectoras y diana (E:D): 10:1.

45 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones:

Se debe observar que, como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias al plural, a menos que el contexto indique claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "un

reactivo" incluye uno o más de dichos reactivos diferentes y referencia a "el método" incluye referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos habituales en la técnica que se podrían modificar o sustituir por los métodos descritos en el presente documento.

5 A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" precediendo a una serie de elementos se debe entender que se refiere a cada elemento en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Dichos equivalentes pretenden estar englobados por la presente invención.

El término "y/o", en cualquier sitio donde se use en el presente documento, incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

10 El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa dentro de $\pm 20\%$, preferentemente dentro de $\pm 15\%$, más preferentemente dentro de $\pm 10\%$, y lo más preferentemente dentro de $\pm 5\%$ de un valor o intervalo dado.

15 En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implica la inclusión de un número entero establecido o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de número entero o etapa. Cuando se usa en el presente documento el término "que comprende", se puede sustituir con el término "que contiene" o "que incluye", o algunas veces cuando se usa en el presente documento con el término "que tiene".

20 Cuando se usa en el presente documento "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa, o componente no especificado en el elemento de reivindicación. Cuando se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación.

En cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede sustituir con cualquiera de los otros dos términos.

25 El término "molécula de unión" o "construcción de anticuerpo" en el sentido de la presente divulgación indica cualquier molécula capaz de unirse (específicamente) a, interaccionar con o reconocer la molécula diana. Para el segundo dominio de unión, dicha molécula diana es una molécula de la superficie celular sobre una célula diana. Para el tercer dominio de unión, dicha molécula diana es el complejo de receptor de CD3 de linfocitos T.

30 El término "molécula de unión monocatenaria" define, a propósito de la presente invención, que las moléculas de unión desveladas en su forma más simple son monómeros. Las moléculas o construcciones pueden incluir partes proteínicas y partes no proteínicas (por ejemplo, conectores químicos o agentes de reticulación químicos tales como glutaraldehído). Así, la molécula de unión monocatenaria puede comprender según la invención conectores no peptídicos preferentemente para unir al menos dos de los dominios de unión. También en línea con la presente invención están los conectores peptídicos definidos en el presente documento.

35 Una molécula de unión, por así decirlo, proporciona el armazón para dicho uno o más dominios de unión de manera que dichos dominios de unión puedan unirse/interaccionar con la molécula superficial sobre una célula diana y complejo de receptor de CD3 sobre un linfocito T. Por ejemplo, dicho armazón se podría proporcionar por proteína A, en particular, el dominio Z de la misma (anticuerpos), ImmE7 (proteínas de inmunidad), BPTI/APPI (dominios de Kunitz), proteína de unión a Ras AF-6 (dominios PDZ), caribdotoxina (toxina de escorpión), CTLA-4, Min-23 (knottinas), lipocalinas (anticalinas), neocarzinostatina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición consenso de ankirina (Stumpp et al., Curr Opin Drug Discov Devel. 10(2), 153-159 (2007)) o tiorredoxina (Skerra, Curr. Opin. Biotechnol, 18, 295-304 (2005); Hosse et al., Protein Sci. 15, 14-27 (2006); Nicaise et al., Protein Sci. 13, 1882-1891 (2004); Nygren y Uhlen, Curr. Opin. Struc. Biol. 7, 463-469 (1997)). Una molécula de unión preferida es un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo biespecífico.

45 La definición de término "anticuerpo" incluye realizaciones tales como anticuerpos monoclonales, quiméricos, monocatenarios, humanizados y humanos, así como fragmentos de anticuerpos, como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpos o derivados comprenden además F(ab')₂, Fv, fragmentos scFv o anticuerpos de un solo dominio tales como anticuerpos o nanocuerpos de dominio, anticuerpos de un solo dominio variable o dominio variable único de inmunoglobulina que comprende simplemente un dominio variable, que podría ser VHH, VH o VL, que se une específicamente a antígeno o epítopo independientemente de otras regiones o dominios V; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), en el lugar citado; Kontermann y Dübel, Antibody Engineering, Springer, 2ª ed. 2010 y Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009. Dicho dominio variable único de inmunoglobulina engloba no solo un polipéptido de dominio variable único de anticuerpo aislado, sino también polipéptidos mayores que comprenden uno o más monómeros de una secuencia de polipéptidos de dominio variable único de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpos monovalentes en línea con la definición anterior describen una realización de un dominio de unión a propósito de la presente invención. Dichos fragmentos de anticuerpos monovalentes se unen a

un antígeno específico y también se pueden designar "dominio de unión al antígeno", "fragmento de unión al antígeno" o "región de unión al anticuerpo".

En línea con esta definición, todas las realizaciones anteriormente descritas del término anticuerpo se pueden englobar bajo el término "construcción de anticuerpo". Dicho término también incluye diacuerpos o anticuerpos de redireccionamiento de afinidad doble (DART). Se prevén además diacuerpos monocatenarios (bienespecíficos), diacuerpos en tándem (Tandab's), "minicuerpos" ejemplificados por una estructura que es del siguiente modo: (VH-VL-CH3)₂, (scFv-CH3)₂ o (scFv-CH3-scFv)₂, anticuerpos "Fc DART" y anticuerpos "IgG DART", y multicuerpos tales como triacuerpos. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina engloban no solo un polipéptido de dominio variable único de anticuerpo aislado, sino también polipéptidos mayores que comprenden uno o más monómeros de una secuencia de polipéptidos de dominio variable único de anticuerpo.

Se conocen en la técnica diversos procedimientos y se pueden usar para la producción de dichas construcciones de anticuerpo (anticuerpos y/o fragmentos). Así, se pueden producir derivados (de anticuerpo) por peptidomiméticos. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véanse, entre otros, la patente de EE.UU 4.946.778, Kontermann y Dübel (2010), en el lugar citado y Little (2009), en el lugar citado) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios específicos para polipéptido(s) elegido(s). Por tanto, se pueden usar animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados específicos para polipéptidos y proteínas de fusión de la presente invención. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica, que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen la técnica de hibridomas (Kohler y Milstein Nature 256 (1975), 495-497), la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica de hibridomas de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). Se puede usar resonancia de plasmones superficiales, como se emplea en el sistema BIAcore, para aumentar la eficiencia de anticuerpos de fago que se unen a un epítipo de un polipéptido diana, tal como CD3 épsilon (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). También se prevé en el contexto de la presente invención que el término "anticuerpo" comprenda construcciones de anticuerpo que se pueden expresar en un hospedador, como se describe en el presente documento más adelante, por ejemplo, construcciones de anticuerpo que se pueden transfectar y/o transducir mediante, entre otros, virus o vectores plasmídicos.

Además, el término "anticuerpo", como se emplea en la invención, también se refiere a derivados o variantes de los anticuerpos descritos en el presente documento que muestran la misma especificidad que los anticuerpos descritos.

Los términos "dominio de unión al antígeno", "fragmento de unión al antígeno" y "región de unión al anticuerpo", cuando se usan en el presente documento, se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. La parte del antígeno que es específicamente reconocida y unida por el anticuerpo se denomina el "epítipo", como se ha descrito en el presente documento anteriormente. Como se ha mencionado anteriormente, un dominio de unión al antígeno puede comprender normalmente una región variable de la cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH); sin embargo, no tiene que comprender ambas. Los fragmentos Fd, por ejemplo, tienen dos regiones VH y frecuentemente retienen alguna función de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen (1) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y CH1; (2) un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (3) un fragmento Fd que tiene los dos dominios VH y CH1; (4) un fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (5) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546), que tiene un dominio VH; (6) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, y (7) un Fv monocatenario (scFv). Aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite que se preparen como una única cadena de proteína en la que se emparejan las regiones VL y VH para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se evalúan para su función del mismo modo que los anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos por que se sintetizan por el cultivo de hibridomas, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar según la

presente invención se pueden preparar por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o se pueden preparar por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se puede aislar de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes sustancialmente correspondientes a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, los descritos por Kabat *et al.* (véase Kabat *et al.* (1991) en el lugar citado). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específicas de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs, y en particular, CDR3. El anticuerpo humano puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o más posiciones sustituidas con un resto de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Se enfatiza que la definición de anticuerpos humanos, como se usa en el presente documento, también contempla anticuerpos completamente humanos, que incluyen solo secuencias humanas no artificialmente y/o genéticamente alteradas de anticuerpos ya que aquellos se pueden obtener usando tecnologías usando sistemas tales como Xenomice.

Los ejemplos de "variantes de anticuerpo" incluyen variantes humanizadas de anticuerpos no humanos, anticuerpos "madurados por afinidad" (véase, por ejemplo Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30, 10832- 10837 (1991)) y mutantes de anticuerpo con función (funciones) efectora(s) alterada(s) (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.648.260, Kontermann y Dübel (2010), en el lugar citado y Little (2009), en el lugar citado).

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo generado *in vitro*" se refiere a un anticuerpo donde todo o parte de la región variable (por ejemplo, al menos una CDR) se genera en una selección de células no inmunitarias (por ejemplo, una presentación en fagos *in vitro*, chip de proteína o cualquier otro método en el que las secuencias candidatas se puedan probar para su capacidad para unirse a un antígeno). Este término excluye así preferentemente las secuencias generadas por transposición genómica en una célula inmunitaria.

El emparejamiento de VH y VL juntos forma un único sitio de unión al antígeno. El dominio CH más proximal a VH se designa CH1. Cada cadena L se une a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas denominadas regiones estructurales (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un armazón para las tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de la complementariedad, CDRs). Las CDRs contienen la mayoría de los restos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDRs se denominan CDR 1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, los constituyentes de CDR sobre la cadena pesada se denominan H1, H2 y H3, mientras que los constituyentes de CDR sobre la cadena ligera se denominan L1, L2 y L3.

El término "variable" se refiere a las porciones de los dominios de inmunoglobulina que presentan variabilidad en su secuencia y que participan en determinar la especificidad y afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, el (los) "dominio(s) variable(s)"). La variabilidad no está uniformemente distribuida en todos los dominios variables de anticuerpos; se concentra en sub-dominios de cada una de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Estos sub-dominios se denominan regiones "hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDRs). Las porciones más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se denominan las "regiones estructurales" (FRM). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras que existen de forma natural comprenden cada uno cuatro regiones FRM, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FRM y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno (véase Kabat *et al.*, en el lugar citado). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como, por ejemplo, citotoxicidad dependiente de anticuerpo y mediada por célula y activación del complemento.

Los términos "CDR", y su plural "CDRs", se refieren a una región determinante de la complementariedad (CDR) de las tres constituyen el carácter de unión de una región variable de la cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y tres constituyen el carácter de unión de una región variable de la cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDRs contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y se separan por secuencias de aminoácidos que comprenden regiones de armazón o estructurales. Los límites de CDR de definición exacta y las longitudes están sujetos a diferentes sistemas de clasificación y de numeración. Las CDRs se pueden denominar, por tanto, por Kabat, Chothia, contacto, o cualquier otra definición de límite, que incluyen el sistema de numeración descrito en el presente documento. A pesar de diferir los límites, cada uno de estos sistemas tiene cierto grado de solapamiento en lo que constituye las denominadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Las definiciones de CDR según estos sistemas pueden diferir, por tanto, en longitud y áreas de límite con respecto a la región estructural adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat, Chothia y/o MacCallum (Kabat *et al.*, en el lugar citado; Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196: 901; y MacCallum et al., J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Sin embargo, se prefiere la numeración según

el denominado sistema de Kabat. La CDR3 de la cadena ligera y, particularmente, CDR3 de la cadena pesada, puede constituir los determinantes más importantes en la unión al antígeno dentro de las regiones variables de la cadena ligera y pesada. En algunas construcciones de anticuerpo, CDR3 de la cadena pesada parece constituir el área de contacto principal entre el antígeno y el anticuerpo. Se pueden usar esquemas de selección *in vitro* en los que se varía CDR3 solo para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o determinar qué restos contribuyen a la unión de un antígeno.

"Que consiste esencialmente en" significa que la secuencia de aminoácidos puede variar aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 % con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: citada y todavía retener la actividad biológica, como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos de la invención son proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína "aislada" está sin acompañar por al menos algo del material con el que normalmente está asociada en su estado natural, por ejemplo que constituye al menos aproximadamente 5 %, o al menos aproximadamente 50 % en peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir desde 5 hasta 99,9 % en peso del contenido total de proteína dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína se puede preparar a una concentración significativamente más alta mediante el uso de un promotor inducible o promotor de alta expresión, de forma que la proteína se prepare a niveles de concentración elevados. La definición incluye la producción de una proteína de unión al antígeno en una amplia variedad de organismos y/o células hospedadoras que se conocen en la técnica.

Para secuencias de aminoácidos, se determina la identidad y/o similitud de secuencia usando técnicas convencionales conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, el algoritmo de alineamiento de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, preferentemente usando los parámetros por defecto, o por inspección. Preferentemente, el porcentaje de identidad se calcula por FastDB basado en los siguientes parámetros: penalización por desapareamiento de 1; penalización por hueco de 1; penalización por tamaño de hueco de 0,33; y penalización por unión de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento múltiple de secuencias de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos por parejas. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Los parámetros de PILEUP útiles incluyen un peso de hueco por defecto de 3,00, un peso de longitud de hueco por defecto de 0,10, y huecos de extremo ponderado.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; y Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Un programa de BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales están establecidos a los valores por defecto. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: alcance del solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125, umbral de palabra (T)=11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y se establecen por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de datos particular con la que se está buscando por comparación la secuencia de interés; sin embargo, los valores se pueden ajustar para aumentar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es BLAST con huecos como se informa por Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST con huecos usa puntuaciones de sustitución de BLOSUM-62; parámetro T umbral establecido a 9; el método de dos aciertos para provocar extensiones sin huecos, carga a longitudes de hueco de k un coste de 10+k; Xu establecido a 16, y Xg establecido a 40 para la etapa de búsqueda en base de datos y en 67 para la etapa de salida de los algoritmos. Los alineamientos con huecos son provocados por una puntuación correspondiente a aproximadamente 22 bits.

Generalmente, la homología, similitud o identidad de aminoácidos entre CDRs variantes individuales es al menos 80 % con respecto a las secuencias representadas en el presente documento, y más normalmente con homologías o identidades preferentemente crecientes de al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y casi 100 %. De una manera similar, el "porcentaje (%) de identidad de secuencias de ácidos nucleicos" con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de las proteínas de unión identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de nucleótidos en la secuencia codificante de la proteína de unión al antígeno. Un método específico utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 establecido a los parámetros por defecto, con alcance del solapamiento y fracción de solapamiento establecidos a 1 y 0,125, respectivamente.

Generalmente, la homología, similitud o identidad de secuencias de ácido nucleico entre las secuencias de nucleótidos que codifican CDRs variantes individuales y las secuencias de nucleótidos representadas en el presente documento es al menos 80 %, y más normalmente con homologías o identidades preferentemente crecientes de al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %, y casi 100 %.

Así, una "CDR variante" es una con la homología, similitud o identidad especificada con respecto a la CDR parental de la invención, y comparte función biológica, que incluye, pero no se limita a, al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de la especificidad y/o actividad de la CDR parental.

Aunque está predeterminado el sitio o la región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos, no se necesita predeterminar la mutación en sí. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se puede realizar mutagénesis al azar en el codón o región diana y cribar las variantes de CDR de la proteína de unión al antígeno expresada para la combinación óptima de actividad deseada. Se conocen bien las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tienen una secuencia conocida, por ejemplo, mutagénesis con cebadores M13 y mutagénesis por PCR. El cribado de los mutantes se hace usando ensayos de actividades de proteína de unión al antígeno, tales como la unión a una molécula de la superficie celular elegida sobre una célula diana.

El término "aminoácido" o "resto de aminoácido" se refiere normalmente a un aminoácido que tiene su definición reconocida en la técnica tal como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparagina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina (His o H); isoleucina (Ile o I); leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); prolina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V), aunque se pueden usar aminoácidos modificados, sintéticos, o raros, según se desee. En general, los aminoácidos se pueden agrupar por tener una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Cys, He, Leu, Met, Phe, Pro, Val); una cadena lateral negativamente cargada (por ejemplo, Asp, Glu); una cadena lateral positivamente cargada (por ejemplo, Arg, His, Lys); o una cadena lateral polar no cargada (por ejemplo, Asn, Cys, Gin, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp y Tyr).

El término "región hipervariable" (también conocida como "regiones determinantes de la complementariedad" o CDRs), cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que están (normalmente tres o cuatro regiones cortas de variabilidad de secuencia extrema) dentro del dominio de la región V de una inmunoglobulina que forman el sitio de unión al antígeno y son los principales determinantes de especificidad por antígenos. Existen al menos dos métodos para identificar los restos de CDR: (1) un enfoque basado en variabilidad de secuencias de especies cruzadas (es decir, Kabat *et al.*, en el lugar citado); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia, C. *et al.*, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Sin embargo, hasta el punto que dos técnicas de identificación de restos definen regiones de solapamiento, pero regiones no idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida. Sin embargo, en general, los restos de CDR se identifican preferentemente según el denominado sistema (de numeración) de Kabat.

El término "región estructural" se refiere a las porciones reconocidas en la materia de una región variable del anticuerpo que existen entre las CDRs más divergentes (es decir, hipervariables). Dichas regiones estructurales normalmente se denominan regiones estructurales 1 a 4 (FR1, FR2, FR3, y FR4) y proporcionan un armazón para la presentación de las seis CDRs (tres de la cadena pesada y tres de la cadena ligera) en el espacio tridimensional, para formar una superficie de unión al antígeno.

Normalmente, las CDRs forman una estructura de bucle que se puede clasificar como una estructura canónica. El término "estructura canónica" se refiere a la conformación de cadena principal que es adoptada por los bucles de unión al antígeno (CDR). A partir de estudios estructurales comparativos, se ha encontrado que cinco de los seis bucles de unión al antígeno solo tienen un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada estructura canónica se puede caracterizar por los ángulos de torsión del esqueleto de polipéptido. Los bucles correspondientes entre anticuerpos pueden tener, por tanto, estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la alta variabilidad de secuencias de aminoácidos en la mayoría de las partes de los bucles (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia *et al.*, Nature, 1989, 342: 877; Martin y Thornton, J. Mol. Biol., 1996, 263: 800). Además, existe una relación entre la estructura de bucle adoptada y las secuencias de aminoácidos que la rodean. La conformación de una clase canónica particular se determina por la longitud del bucle y los restos de aminoácidos que residen en posiciones clave dentro del bucle, así como dentro de la región estructural conservada (es decir, fuera del bucle). La asignación a una clase canónica particular se puede hacer, por tanto, basándose en la presencia de estos restos de aminoácidos clave. El término "estructura canónica" también puede incluir consideraciones en cuanto a la secuencia lineal del anticuerpo, por ejemplo, como se cataloga por Kabat (Kabat *et al.*, en el lugar citado). El esquema (sistema) de numeración de Kabat es una norma ampliamente adoptada para la numeración de los restos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo en un modo coherente y es el esquema preferido aplicado en la presente invención como también se menciona en cualquier parte en el presente documento. También se pueden usar consideraciones estructurales adicionales para determinar la estructura canónica de un anticuerpo. Por ejemplo, las diferencias no completamente reflejadas por la numeración de Kabat se pueden describir por el sistema

de numeración de Chothia et al. y/o revelar por otras técnicas, por ejemplo, cristalografía y modelado computacional bi o tridimensional. Por consiguiente, una secuencia de anticuerpos dada se puede poner en una clase canónica que permite, entre otras cosas, identificar secuencias de chasis apropiadas (por ejemplo, basadas en el deseo de incluir una variedad de estructuras canónicas en una biblioteca). Se describen en la bibliografía la numeración de Kabat de

5 secuencias de aminoácidos de anticuerpos y consideraciones estructurales como se describen por Chothia *et al.*, en el lugar citado, y sus implicaciones para analizar aspectos canónicos de la estructura de anticuerpos.

CDR3 es normalmente la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión al anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos restos de aminoácidos o más de 26 aminoácidos. Se conocen bien en la técnica las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de

10 inmunoglobulinas. Para una revisión de la estructura de anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988. Un experto en la técnica reconocerá que cada estructura de subunidad, por ejemplo, una estructura CH, VH, CL, VL, CDR, FR, comprende fragmentos activos, por ejemplo, la porción de VH, VL, o la subunidad de CDR que se une al antígeno, es decir, el fragmento de unión al antígeno, o, por ejemplo, la porción de la subunidad de CH que se une a y/o activa, por ejemplo, un receptor de Fc y/o

15 complemento. Las CDRs normalmente se refieren a las CDRs de Kabat, como se describen en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat *et al.* Otra norma para caracterizar el sitio de unión al antígeno es referirse a los bucles hipervariables como se describe por Chothia. Véase, por ejemplo, Chothia, et al. (1987; *J. Mol. Biol.* 227:799-817); y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4628-4638. Todavía otra norma es la definición de AbM usada por el software de modelado de anticuerpos Oxford

20 Molecular's AbM. Véase, en general, por ejemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Las realizaciones descritas con respecto a las CDRs de Kabat se pueden implementar alternativamente usando relaciones descritas similares con respecto a los bucles hipervariables de Chothia o a los bucles definidos por AbM.

La secuencia de genes de anticuerpo después del ensamblaje y la mutación somática es altamente variada, y se estima que estos genes variados codifican 10^{10} moléculas de anticuerpo diferentes (*Immunoglobulin Genes*, 2ª ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Por consiguiente, el sistema inmunitario proporciona un repertorio de inmunoglobulinas. El término "repertorio" se refiere a al menos una secuencia de nucleótidos derivada completa o parcialmente de al menos una secuencia que codifica al menos una inmunoglobulina. La(s) secuencia(s) se puede(n) generar por transposición *in vivo* de los segmentos V, D, y J de cadenas pesadas, y los segmentos V y

30 J de cadenas ligeras. Alternativamente, la(s) secuencia(s) se puede(n) generar a partir de una célula en respuesta a qué transposición ocurre, por ejemplo, estimulación *in vitro*. Alternativamente, parte o todas la(s) secuencia(s) se pueden obtener por corte y empalme de ADN, síntesis de nucleótidos, mutagénesis, y otros métodos, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.565.332. Un repertorio puede incluir solo una secuencia o puede incluir una pluralidad de secuencias, que incluyen aquellas en una colección genéticamente variada.

El término "molécula de unión" o "construcción de anticuerpo" en el sentido de la presente divulgación indica cualquier molécula capaz de unirse (específicamente) a, interactuar con o reconocer las moléculas diana sobre una molécula de la superficie celular sobre una célula diana y CD3. Dichas moléculas o construcciones pueden incluir partes proteináceas y partes no proteináceas (por ejemplo, conectores químicos o agentes de reticulación químicos tales como glutaraldehído).

En el supuesto caso de que se use un conector, este conector es preferentemente de una longitud y secuencia suficiente para garantizar que cada uno del primer, segundo y tercer dominios puedan retener, independientemente entre sí, sus especificidades de unión diferenciales. Lo más preferentemente y como se documenta en los ejemplos adjuntos, la molécula de unión de la invención es una "molécula de unión monocatenaria biespecífica", más preferentemente una Fv monocatenario biespecífico (scFv). Se conocen en la técnica las moléculas monocatenarias biespecíficas y se describen en el documento de patente WO 99/54440, Mack, *J. Immunol.* (1997), 158, 3965-3970, Mack, *PNAS*, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, *Cancer Immunol. Immunother.*, (1997), 45, 193-197, Löffler, *Blood*, (2000), 95, 6, 2098-2103, Bruhl, *Immunol.*, (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, *J. Mol. Biol.*, (1999), 293, 41-56.

Dichos dominios variables comprendidos en los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento se pueden conectar mediante secuencias conectoras adicionales. El término "conector peptídico" define, según la presente invención, una secuencia de aminoácidos por la que se unen entre sí las secuencias de aminoácidos del primer dominio, el segundo dominio y el tercer dominio del anticuerpo biespecífico de la invención. Una característica técnica esencial de dicho conector peptídico es que dicho conector peptídico no comprende ninguna actividad de polimerización. Entre los conectores peptídicos adecuados están aquellos descritos en las patentes de EE.UU. 4.751.180 y 4.935.233 o el documento de patente WO 88/09344. Una realización preferida de un conector peptídico se caracteriza por la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, es decir, Gly₄Ser, o sus polímeros, es decir, (Gly₄Ser)_x, donde x es un número entero 1 o mayor. Se conocen en la técnica las características de dicho conector peptídico, que comprenden la ausencia de la promoción de estructuras secundarias, y se describen, por ejemplo, en Dall'Acqua et al. (*Biochem.* (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (*Mol Immunol* (1992) 29, 21-30) y Raag y Whitlow (*FASEB* (1995) 9(1), 73-80). Se prefieren los conectores peptídicos que tampoco promueven estructuras secundarias. El enlace de dicho dominios entre sí se puede proporcionar por, por ejemplo ingeniería genética, como se describe en los ejemplos. Se conocen bien en la técnica los métodos de preparación de construcciones monocatenarias biespecíficas fusionadas y operativamente unidas y expresión en células de mamífero o bacterias

(por ejemplo, documento de patente WO 99/54440 o Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

5 Para conectores peptídicos, que conectan los dominios de unión en el anticuerpo biespecífico de la invención, se prefieren conectores peptídicos que comprenden solo un pequeño número de restos de aminoácidos, por ejemplo 12 restos de aminoácidos o menos. Así, se prefiere el conector peptídico de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 restos de aminoácidos. Un conector peptídico previsto con menos de 5 aminoácidos comprende 4, 3, 2 o un aminoácido(s) en donde se prefieren conectores ricos en Gly. Un aminoácido "individual" particularmente preferido en el contexto de dicho "conector peptídico" es Gly. Por consiguiente, dicho conector peptídico puede consistir en el aminoácido individual Gly.

10 El término "multiespecífico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo biespecífico de la invención que comprende al menos es capaz de unirse a al menos un antígeno o diana adicional.

15 También se prevé que el anticuerpo biespecífico de la invención tenga, aparte de adición a la especificidad por albúmina de suero y además de su función para unirse a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana y CD3, una función adicional. En este formato, la construcción de anticuerpo es un construcción de anticuerpo multifuncional por direccionamiento de células a través de unión a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana, mediación de actividad de linfocitos T citotóxicos mediante la unión de CD3 y proporcionando una función adicional tal como un dominio constante Fc completamente funcional que media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediante el reclutamiento de células efectoras como células NK, una marca (fluorescente etc.), un agente terapéutico tal como, por ejemplo, una toxina o radionúclido, y/o medios para potenciar la semivida en suero, etc.

20 El término "dominio de unión" caracteriza, a propósito de la presente invención, un dominio que es capaz de unirse específicamente a / interactuar con un epítipo diana dado o un sitio diana dado sobre la molécula de la superficie celular diana sobre una célula diana y CD3.

25 Se pueden obtener dominios de unión de un donante de dominio de unión tal como, por ejemplo, un anticuerpo. Se prevé que un dominio de unión de la presente invención comprenda al menos dicha parte de cualquiera de los dominios de unión anteriormente mencionados que se requiere para unirse a/interaccionar con un epítipo diana dado o un sitio diana dado sobre la molécula de la superficie celular sobre una célula diana y CD3.

30 Se prevé que el dominio de unión de los donantes de dominio de unión anteriormente mencionados se caractericen por que parte de estos donantes que es responsable de la unión de la diana respectiva, es decir, cuando esa parte se retira del donante de dominio de unión, dicho donante pierde su capacidad de unión. "Pierde" significa una reducción de al menos 50 % de la capacidad de unión cuando se compara con el donante de unión. Se conocen bien en la técnica los métodos de mapeo de estos sitios de unión – está, por tanto, dentro del conocimiento habitual del experto localizar/mapear el sitio de unión de un donante de dominio de unión y, así, "obtener" dicho dominio de unión de los donantes de dominio de unión respectivos.

35 El término "epítipo" se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une específicamente un dominio de unión, tal como un anticuerpo o inmunoglobulina o derivado o fragmento de un anticuerpo o de una inmunoglobulina. Un "epítipo" es antigénico y así el término epítipo también se denomina algunas veces en el presente documento "estructura antigénica" o "determinante antigénico". Así, el dominio de unión es un "sitio de interacción con antígeno". Dicha unión/interacción también se entiende que define un "reconocimiento específico". En un ejemplo, dicho dominio de unión que se une (específicamente) a / interacciona con un epítipo diana dado o un sitio diana dado sobre una molécula de la superficie celular sobre una célula diana y CD3 es un anticuerpo o inmunoglobulina, y dicho dominio de unión es una región VH y/o VL de un anticuerpo o de una inmunoglobulina.

45 Los "epítopes" se pueden formar tanto por aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Un "epítipo lineal" es un epítipo donde una secuencia primaria de aminoácidos comprende el epítipo reconocido. Un epítipo lineal normalmente incluye al menos 3 o al menos 4, y más normalmente, al menos 5 o al menos 6 o al menos 7, por ejemplo, aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos en una secuencia única.

50 Un "epítipo conformacional", a diferencia de un epítipo lineal, es un epítipo en donde la secuencia primaria de los aminoácidos que comprenden el epítipo no es el único componente definitorio del epítipo reconocido (por ejemplo, un epítipo en donde la secuencia primaria de aminoácidos no es necesariamente reconocida por el dominio de unión). Normalmente, un epítipo conformacional comprende un elevado número de aminoácidos con respecto a un epítipo lineal. Con respecto al reconocimiento de epítopes conformacionales, el dominio de unión reconoce una estructura tridimensional del antígeno, preferentemente un péptido o proteína o fragmento de los mismos (en el contexto de la presente invención, el antígeno para uno de los dominios de unión está comprendido dentro de una molécula de la superficie celular sobre una célula diana). Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega para formar una estructura tridimensional, se yuxtaponen ciertos aminoácidos y/o el esqueleto de polipéptido que forma el epítipo conformacional, que permite que el anticuerpo reconozca el epítipo. Los métodos de determinación de la conformación de epítopes incluyen, pero no se limitan a, cristalografía de rayos X, espectroscopía de

resonancia magnética nuclear bidimensional (RMN-2D) y etiquetado de espín dirigido al sitio y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Además, los ejemplos proporcionados describen un método adicional para caracterizar un dominio de unión dado a modo de agrupamiento, que incluye una prueba de si el dominio de unión dado se une a una o más agrupaciones de epítopes de una proteína dada, en particular una molécula de la superficie celular sobre una célula diana.

Como se usa en el presente documento, el término "agrupación de epítopes" indica la totalidad de epítopes que se encuentran en una extensión contigua definida de un antígeno. Una agrupación de epítopes puede comprender uno, dos o más epítopes. El concepto de agrupación de epítopes también se usa en la caracterización de las características de los anticuerpos biespecíficos de la invención.

Los términos "(capaz de) unirse a", "que reconoce específicamente", "dirigido a" y "que reacciona con" significan según la presente invención que un dominio de unión es capaz de interactuar específicamente con uno o más, preferentemente al menos dos, más preferentemente al menos tres y lo más preferentemente al menos cuatro aminoácidos de un epítope.

Como se usa en el presente documento, los términos "que interacciona específicamente", "que se une específicamente" o "se une(n) específicamente" significan que un dominio de unión presenta afinidad apreciable por una proteína o antígeno particular y, en general, no presenta reactividad significativa con proteínas o antígenos distintos de la molécula de la superficie celular sobre una célula diana o CD3. "Afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de aproximadamente 10^{-6} M (KD) o más fuerte. Preferentemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es aproximadamente 10^{-12} a 10^{-8} M, 10^{-12} a 10^{-9} M, 10^{-12} a 10^{-10} M, 10^{-11} a 10^{-8} M, preferentemente de aproximadamente 10^{-11} a 10^{-9} M. Si un dominio de unión reacciona específicamente con o se une a una diana se puede probar fácilmente, entre otros, comparando la reacción de dicho dominio de unión con una proteína diana o antígeno con la reacción de dicho dominio de unión con proteínas o antígenos distintos de la molécula de la superficie celular sobre una célula diana o CD3. Preferentemente, un dominio de unión de la invención no se une esencialmente o no es capaz de unirse a proteínas o antígenos distintos de la molécula de la superficie celular sobre una célula diana o CD3 (es decir, el segundo dominio de unión no es capaz de unirse a proteínas distintas de la molécula de la superficie celular sobre una célula diana y el tercer dominio de unión no es capaz de unirse a proteínas distintas de CD3).

El término "no se une esencialmente", o "no es capaz de unirse" significa que un dominio de unión de la presente invención no se une a otra proteína o antígeno distinto de la molécula de la superficie celular elegida sobre una célula diana o CD3, es decir, no muestra reactividad superior a 30 %, preferentemente no superior a 20 %, más preferentemente no superior a 10 %, particularmente preferentemente no superior a 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % con proteínas o antígenos distintos de la molécula de la superficie celular sobre una célula diana o CD3, por lo que se establece que la unión a la molécula de la superficie celular sobre una célula diana o CD3, respectivamente, se establece que sea 100 %.

Se cree que la unión específica se efectúa por motivos específicos en la secuencia de aminoácidos del dominio de unión y el antígeno. Así, la unión se logra como resultado de su estructura primaria, secundaria y/o terciaria, además de como el resultado de modificaciones secundarias de dichas estructuras. La interacción específica del sitio de interacción del antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado una simple unión de dicho sitio con el antígeno. Además, la interacción específica del sitio de interacción del antígeno con su antígeno específico puede alternativamente o adicionalmente dar como resultado el inicio de una señal, por ejemplo, debido a la inducción de un cambio de la conformación del antígeno, una oligomerización del antígeno, etc.

Las proteínas (incluyendo fragmentos de las mismas, preferentemente fragmentos biológicamente activos, y péptidos, normalmente que tienen menos de 30 aminoácidos) comprenden uno o más aminoácidos acoplados entre sí mediante un enlace peptídico covalente (dando como resultado una cadena de aminoácidos). El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, describe un grupo de moléculas, que consisten en más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos pueden formar además multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula de polipéptido. Las moléculas de polipéptido que forman dichos dímeros, trímeros, etc., pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes de dichos multímeros se denominan, por consiguiente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Un ejemplo de un heteromultímero es una molécula de anticuerpo que, en su forma que existe de forma natural, consiste en dos cadenas ligeras idénticas de polipéptidos y dos cadenas pesadas idénticas de polipéptidos. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a polipéptidos/proteínas naturalmente modificados en donde la modificación se efectúa, por ejemplo, por modificaciones postraduccionales como glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Un "polipéptido", cuando se denomina en el presente documento, también puede estar químicamente modificado, tal como pegilado. Dichas modificaciones se conocen bien en la técnica.

"Aislado", cuando se usa para describir el anticuerpo biespecífico desvelado en el presente documento, significa un anticuerpo biespecífico que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferentemente, el anticuerpo biespecífico aislado está libre de asociación con todos los otros componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales

como los resultantes de células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo biespecífico se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos del extremo N o secuencia interna de aminoácidos por uso de un secuenciador de
 5 taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. En general, sin embargo, un anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede desear mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico de anticuerpos biespecíficos, o por síntesis de
 10 péptidos.

Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos. Se hace cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácido también pueden alterar los procesos postraduccionales de los anticuerpos biespecíficos, tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación. Preferentemente, se pueden sustituir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en una CDR, mientras que se pueden sustituir 1, 2, 3, 4, 5,
 15 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos en las regiones estructurales (FRs). Las sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas como se describen en el presente documento. Adicionalmente o alternativamente, se pueden insertar o deleccionar 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos en cada una de las CDRs (por supuesto, dependiendo de su longitud), mientras que se pueden insertar o deleccionar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,
 20 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos en cada una de las FRs.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones de los anticuerpos biespecíficos que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina", como se describe por Cunningham y Wells en Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifica/n un resto o grupo de restos diana dentro del anticuerpo biespecífico (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el epítope.
 25

Las localizaciones de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se definen entonces introduciendo variantes adicionales u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí misma no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza barrido de ala o mutagénesis al azar en un codón o región diana y se criban las variantes expresadas de anticuerpo biespecífico para la actividad deseada.
 30 35

Preferentemente, las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que varían en longitud desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Una variante de inserción del anticuerpo biespecífico incluye la fusión con el extremo N o C del anticuerpo con una enzima o una fusión con un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.
 40

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen preferentemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácidos en el anticuerpo biespecífico sustituidos por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las CDRs de la cadena pesada y/o ligera, en particular las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR en la cadena pesada y/o ligera.
 45

Por ejemplo, si una secuencia de CDR engloba 6 aminoácidos, se prevé que estén sustituidos uno, dos o tres de estos aminoácidos. Similarmente, si una secuencia de CDR engloba 15 aminoácidos, se prevé que estén sustituidos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de estos aminoácidos.

Generalmente, si los aminoácidos están sustituidos en una o más o todas las CDRs de la cadena pesada y/o ligera, se prefiere que la secuencia "sustituida" entonces obtenida sea al menos 60 %, más preferentemente 65 %, incluso más preferentemente 70 %, particularmente preferentemente 75 %, más particularmente preferentemente 80 % idéntica a la secuencia de CDR "original". Esto significa que es dependiente de la longitud de la CDR a qué grado es idéntico a la secuencia "sustituida". Por ejemplo, una CDR que tiene 5 aminoácidos es preferentemente 80 % idéntica a su secuencia sustituida para tener al menos un aminoácido sustituido. Por consiguiente, las CDRs del anticuerpo biespecífico pueden tener diferentes grados de identidad con sus secuencias sustituidas, por ejemplo, CDRL1 puede tener 80 %, mientras que CDRL3 puede tener 90 %.
 50 55

Las sustituciones preferidas (o reemplazos) son sustituciones conservativas. Sin embargo, se prevé cualquier sustitución (incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las "sustituciones a modo de ejemplo"

enumeradas en la Tabla 1, a continuación), en tanto que el anticuerpo biespecífico retenga su capacidad para unirse a la molécula de la superficie celular sobre una célula diana mediante el segundo dominio de unión y con CD3 épsilon mediante el tercer dominio de unión y/o sus CDRs tienen una identidad con la secuencia entonces sustituida (al menos 60 %, más preferentemente 65 %, incluso más preferentemente 70 %, particularmente preferentemente 75 %, más particularmente preferentemente 80 % idéntica a la secuencia de CDR "original").

Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 con el encabezado de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a clases de aminoácidos, y los productos cribados para una característica deseada.

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	norleucina, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Se llevan a cabo modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo biespecífico de la presente invención seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos que existen de forma natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales: (1) hidrófobas: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrófilas neutras: cys, ser, thr; (3) ácidas: asp, glu; (4) básicas: asn, gin, his, lys, arg; (5) restos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y (6) aromáticas: trp, tyr, phe.

Sustituciones no conservativas conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Se puede sustituir cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo biespecífico, en general, con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la

reticulación aberrante. En cambio, se pueden añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar dichas variantes sustitucionales implica la maduración por afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan en un modo monovalente de partículas de fago filamentoso como fusiones con el producto de gen III de M13 encapsulado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fago se criban entonces para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios candidatos de región hipervariable para modificación, se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el dominio de unión y, por ejemplo, una molécula superficial de célula humana sobre una célula diana. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Se contemplan en el presente documento otras modificaciones del anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico se puede unir a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo biespecífico también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos biespecíficos desvelados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípido de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describen en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); patentes de EE.UU. Nº 4.485.045 y 4.544.545; y el documento de patente WO 97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se desvelan liposomas con tiempo de circulación potenciado en la patente de EE.UU. Nº 5.013.556. Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido dando liposomas con el diámetro deseado. Se pueden conjugar fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo biespecífico se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo biespecífico se produce intracelularmente, como una primera etapa, se retira el residuo de partículas, o células hospedadoras o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento de aislamiento de anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*.

La composición de anticuerpo biespecífico preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida.

El término "ácido nucleico" se conoce bien por el experto y engloba ADN (tal como ADNc) y ARN (tal como ARNm). El ácido nucleico puede ser bicatenario y monocatenario, lineal y circular. Dicha molécula de ácido nucleico está comprendida preferentemente en un vector que está comprendido preferentemente en una célula hospedadora. Dicha célula hospedadora es, por ejemplo después de la transformación o transfección con la secuencia de ácido nucleico de la invención, capaz de expresar el anticuerpo biespecífico. Para ese fin, la molécula de ácido nucleico se une operativamente con secuencias de control.

Un vector es una molécula de ácido nucleico usada como vehículo para transferir material genético (extraño) en una célula. El término "vector" engloba - pero no se limita a - plásmidos, virus, cósmidos y cromosomas artificiales. En general, los vectores manipulados comprenden un origen de replicación, un sitio de multiclonación y un marcador de

- selección. El propio vector, en general, es una secuencia de nucleótidos, comúnmente una secuencia de ADN, que comprende un inserto (transgén) y una secuencia mayor que sirve de "esqueleto" del vector. Los vectores modernos pueden englobar características adicionales, además del inserto de transgén y un esqueleto: promotor, marcador genético, resistencia a antibióticos, indicador de gen, secuencia de direccionamiento, marca de purificación de proteínas. Los vectores denominados vectores de expresión (construcciones de expresión) son específicamente para la expresión del transgén en la célula diana, y, en general, tienen secuencias de control tales como una secuencia promotora que conduce la expresión del transgén. La inserción de un vector en la célula diana se denomina normalmente "transformación" para bacterias, "transfección" para células eucariotas, aunque la inserción de un vector viral también se denomina "transducción".
- Como se usa en el presente documento, el término "célula hospedadora" pretende referirse a una célula en la que un ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico de la invención se introduce a modo de transformación, transfección y similares. Se debe entender que dichos términos se refieren no solo a la célula objeto particular, sino a la progenie o posible progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a o mutación o influencias medioambientales, dicha progenie puede no ser, en realidad, idéntica a la célula parental, pero se incluye todavía dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.
- Como se usa en el presente documento, el término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de un anticuerpo biespecífico de la invención que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.
- El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Las células eucariotas se conocen por utilizar promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.
- Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o conductor de secreción está operativamente unido a ADN para un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está colocado para facilitar la traducción. En general, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un conductor de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, entonces se usan adaptadores o conectores de oligonucleótido sintéticos según la práctica convencional.
- Los términos "célula hospedadora", "célula diana" o "célula receptora" pretenden incluir cualquier célula o cultivo celular individual que pueda ser o haya/n sido receptores para vectores o la incorporación de moléculas exógenas de ácidos nucleicos, polinucleótidos y/o proteínas. También pretende incluir progenie de una única célula, y la progenie puede no necesariamente ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico o total) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental, o deliberada. Las células pueden ser procariontes o eucariotas, e incluyen, pero no se limitan a, bacterias, células de levadura, células de animales y células de mamífero, por ejemplo, murina, rata, macaco o humana.
- Las células hospedadoras adecuadas incluyen células hospedadoras procariontes y eucariotas que incluyen levaduras, hongos, células de insecto y células de mamífero.
- El anticuerpo biespecífico de la invención se puede producir en bacterias. Después de la expresión, el anticuerpo biespecífico de la invención, preferentemente el anticuerpo biespecífico, se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad y/o exclusión de tamaño. Se puede llevar a cabo purificación final similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.
- Además de los procariontes, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para el anticuerpo biespecífico de la invención. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es la más comúnmente usada entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están comúnmente disponible varios otros géneros, especies y cepas y son útiles en el presente documento, tales como hospedadores de *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilorum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento de patente EP 402 226); *Pichia pastoris* (documento de patente EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento de patente EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, hospedadores de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo biespecífico glucosilado de la invención, preferentemente anticuerpos biespecíficos derivados de anticuerpo, derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de planta y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como

5 *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponible una variedad de cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden usar como el virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

10 También se pueden utilizar cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, *Arabidopsis* y tabaco como hospedadores. Se conocen por los expertos en la técnica los vectores de clonación y expresión útiles en la producción de proteínas en cultivos de células vegetales. Véase, por ejemplo, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, y Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

15 Sin embargo, el mayor interés ha sido en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) ha llegado a ser un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36 : 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10);

20 células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, 1413 8065);

25 tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5 1); células TRI (Mather et al., *Annals N. Y Acad. Sci.* 383 : 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo biespecífico de la invención se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo biespecífico se produce intracelularmente, como una primera etapa, se retira el residuo de partículas, o células hospedadoras o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento de aislamiento de anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela la pasta de células en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Se puede retirar residuo celular por centrifugación. Si el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión, en general, se concentran

30 primero usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes accidentales.

El anticuerpo biespecífico de la invención preparado a partir de las células hospedadoras se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida.

La matriz a la que se une el ligando de afinidad es casi siempre agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten

45 caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que se pueden lograr con agarosa. Si el anticuerpo biespecífico de la invención comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo a recuperar.

El término "cultivar" se refiere al mantenimiento, diferenciación, crecimiento, proliferación y/o propagación *in vitro* de células en condiciones adecuadas en un medio.

Como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición para administración a un paciente, preferentemente un paciente humano. La composición farmacéutica particular

55 preferida de la presente invención comprende el anticuerpo biespecífico de la invención. 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, intrarterial, intratecal y/o intranasal o por inyección directa en tejido. Se prevé en particular que dicha composición se administre a un paciente mediante infusión o inyección. La administración de las

60 composiciones adecuadas se puede efectuar por diferentes formas, por ejemplo, por administración intravenosa,

intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. En particular, la presente invención proporciona una administración no interrumpida de la composición adecuada. Como ejemplo no limitante, la administración no interrumpida, es decir, continua, se puede realizar por un pequeño sistema de bombeo llevado por el paciente para dosificar la entrada de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de la invención se puede administrar usando dichos sistemas de bombeo. Dichos sistemas de bombeo se conocen, en general, en la técnica, y comúnmente se basan en el intercambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico a infundir. Cuando se cambia el cartucho en dicho sistema de bombeo, puede ocurrir una interrupción temporal del flujo de otro modo no interrumpido de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. En dicho caso, la fase de administración antes de la sustitución del cartucho y la fase de administración después de la sustitución del cartucho todavía se consideraría dentro del significado de los medios y métodos farmacéuticos de la invención que juntos constituyen una "administración no interrumpida" de dicho agente terapéutico.

La administración continua o no interrumpida de estos anticuerpos biespecíficos de la invención puede ser intravenosa o subcutánea a modo de un dispositivo de administración de fluido o sistema de bombeo pequeño que incluye un mecanismo de conducción de fluido para conducir el fluido fuera de un depósito y un mecanismo de actuación para accionar el mecanismo de conducción. Los sistemas de bombeo para administración subcutánea pueden incluir una aguja o una cánula para penetrar la piel de un paciente y administrar la composición adecuada dentro del cuerpo del paciente. Dichos sistemas de bombeo pueden ser directamente fijados o unidos a la piel del paciente independientemente de una vena, arteria o vaso sanguíneo, permitiendo así un contacto directo entre el sistema de bombeo y la piel del paciente. El sistema de bombeo se puede unir a la piel del paciente durante 24 horas hasta varios días. El sistema de bombeo puede ser de pequeño tamaño con un depósito para pequeños volúmenes. Como ejemplo no limitante, el volumen del depósito para la composición farmacéutica adecuada a administrar puede ser entre 0,1 y 50 mL.

La administración continua puede ser transdérmica a modo de un parche llevado sobre la piel y se sustituye en intervalos. Un experto en la técnica conoce los sistemas de parche para la administración de fármaco adecuada para este fin. Cabe señalar que la administración transdérmica es especialmente susceptible para administración no interrumpida, ya que el intercambio de un primer parche agotado se puede llevar a cabo ventajosamente simultáneamente con la colocación de un nuevo segundo parche, por ejemplo sobre la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche agotado e inmediatamente antes de la retirada del primer parche agotado. No surgen problemas de interrupción de flujo o fallo de celdas de potencia.

Las composiciones inventivas pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen disoluciones, por ejemplo, solución salina tamponada con disoluciones de fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, liposomas, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por métodos convencionales bien conocidos. Las formulaciones pueden comprender hidratos de carbono, disoluciones de tampón, aminoácidos y/o tensioactivos. Los hidratos de carbono pueden ser azúcares no reductores, preferentemente trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol. En general, como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. Se conoce bien en la técnica el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen: agentes de tamponamiento adicionales; conservantes; co-disolventes; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sal, tales como sodio, alcoholes de azúcar polihidroxilados; aminoácidos, tales como alanina, glicina, asparagina, 2-fenilalanina, y treonina; azúcares o alcoholes de azúcar, tales como trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, mioinositosa, galactosa, lactitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina, u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona. Dichas formulaciones se pueden usar para administraciones continuas que pueden ser intravenosas o subcutáneas con y/o sin sistemas de bombeo. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos cargados, preferentemente lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato y/o histidina. Los tensioactivos pueden ser detergentes, preferentemente con un peso molecular de >1,2 KD y/o un poliéter, preferentemente con un peso molecular de >3 KD. Los ejemplos no limitantes de detergentes preferidos son Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 o Tween 85. Los ejemplos no limitantes de poliéteres preferidos son PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 o PEG 5000. Los sistemas de tampón usados en la presente invención pueden tener un pH preferido de 5-9 y pueden comprender citrato, succinato, fosfato, histidina y acetato.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar al sujeto a una dosis adecuada que se puede determinar, por ejemplo, por estudios de aumento escalonado de dosis por administración de dosis crecientes del polipéptido de la invención que presentan especificidad de especies cruzadas descritas en el presente documento por primates distintos de chimpancé, por ejemplo macacos. Como se expone anteriormente, el anticuerpo

biespecífico de la invención que presenta especificidad de especies cruzadas descrito en el presente documento se puede usar ventajosamente en forma idéntica en ensayos preclínicos en primates distintos de chimpancé y como fármaco en seres humanos. Estas composiciones también se pueden administrar en combinación con otros fármacos proteínicos y no proteínicos. Estos fármacos se pueden administrar simultáneamente con la composición que comprende el polipéptido de la invención como se define en el presente documento o por separado antes o después de la administración de dicho polipéptido en intervalos y dosis oportunamente definidos. La pauta posológica será determinada por el médico adjunto y factores clínicos. Como se conoce bien en las artes médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, área superficial del cuerpo, edad, el compuesto particular a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administran simultáneamente.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de 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 proteínicos, como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, preferentemente de origen humano. Se prevé que la composición de la invención pueda comprender, además del polipéptido de la invención definido en el presente documento, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso previsto de la composición. Dichos agentes podrían ser fármacos que actúan sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben inmunorreacciones (por ejemplo, corticosteroides), fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan sobre el aparato circulatorio y/o agentes tales como citocinas conocidas en la técnica. También se prevé que el anticuerpo biespecífico de la presente invención se aplique en una co-terapia, es decir, en combinación con otro medicamento contra el cáncer.

La actividad biológica de la composición farmacéutica definida en el presente documento se puede determinar, por ejemplo, por ensayos de citotoxicidad, como se describen en los siguientes ejemplos, en el documento de patente WO 99/54440 o por Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). "Eficacia" o "eficacia *in vivo*", como se usan en el presente documento, se refieren a la respuesta a terapia por la composición farmacéutica de la invención, usando, por ejemplo, criterios de respuesta normalizados de NCI. El éxito o la eficacia *in vivo* de la terapia usando una composición farmacéutica de la invención se refiere a la eficacia de la composición para su fin previsto, es decir, la capacidad de la composición para provocar su efecto deseado, es decir, agotamiento de células patológicas, por ejemplo células tumorales. La eficacia *in vivo* se puede monitorizar por métodos establecidos convencionales para las entidades respectivas de la enfermedad, que incluyen, pero no se limitan a, número de leucocitos, diferenciales, citometría de flujo activada por fluorescencia, aspiración de médula ósea. Además, se pueden usar diversos parámetros de química clínica específicos de enfermedad y otros métodos convencionales establecidos. Además, se pueden usar tomografía asistida por ordenador, rayos X, tomografía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, para la evaluación de la respuesta basada en los criterios del National Cancer Institute [Cheson BD, Horning 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. 1999 Apr;17(4):1244]), tomografía de emisión de positrones, números de leucocitos, diferenciales, citometría de flujo activada por fluorescencia, aspiración de médula ósea, biopsias/histologías de ganglios linfáticos, y diversos parámetros de química clínica específicos de linfoma (por ejemplo, lactato deshidrogenasa) y otros métodos convencionales establecidos.

Otra reto importante en el desarrollo de fármacos tales como la composición farmacéutica de la invención es la modulación predecible de propiedades farmacocinéticas. Para este fin, se puede establecer un perfil farmacocinético del fármaco candidato, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan 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 cierta entidad de la enfermedad incluyen, pero no se limitan a: semivida, volumen de distribución, metabolismo de primer paso hepático y el grado de unión a suero sanguíneo. La eficacia de un agente de fármaco dado se puede influir por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente.

"Semivida" significa el tiempo donde el 50 % de un fármaco administrado se elimina por procesos biológicos, por ejemplo metabolismo, excreción, etc.

Por "metabolismo de primer paso hepático" se indica la tendencia de un fármaco a metabolizarse tras el primer contacto con el hígado, es decir, durante su primer paso a través del hígado.

"Volumen de distribución" significa el grado de retención de un fármaco a través 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.

5 "Grado de unión a suero sanguíneo" significa la tendencia de un fármaco para interactuar con y unirse a proteínas séricas sanguíneas, tales como albúmina, que conduce a una reducción o pérdida de la actividad biológica del fármaco.

Los parámetros farmacocinéticos también incluyen biodisponibilidad, tiempo de desfase (Tdesfase), T_{máx}, velocidades de absorción, más aparición y/o C_{máx} para una cantidad dada de fármaco administrado.
10 "Biodisponibilidad" significa la cantidad de un fármaco en el compartimento sanguíneo. "Tiempo de desfase" significa el desfase de tiempo entre la administración del fármaco y su detección y cuantificabilidad en sangre o plasma.

"T_{máx}" es el tiempo después del cual se alcanza la máxima concentración en sangre del fármaco, y "C_{máx}" es la máxima concentración en sangre obtenida con un fármaco dado. El tiempo para 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 anticuerpos monocatenarios biespecíficos que presentan especificidad de especies cruzadas, que se pueden determinar en la prueba preclínica de animales en primates distintos de chimpancé como se explica resumidamente anteriormente, también se exponen, por ejemplo, en la publicación por Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).
15

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 se podrían referir a una ausencia de tolerabilidad del fármaco en general y/o una ausencia de tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénicos o carcinogénicos provocados por el fármaco.
20

El término "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad", como se usan 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 período más largo de administración del fármaco. Se pueden evaluar la "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad", por ejemplo, en intervalos regulares durante el periodo de tratamiento y seguimiento. Las mediciones incluyen evaluación clínica, por ejemplo, manifestaciones en órganos, y cribado de anomalías de laboratorio. Se puede llevar a cabo evaluación clínica y registrar/codificar las desviaciones con respecto a los hallazgos normales según las normas de NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones en órganos pueden incluir criterios tales como alergia/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y similares, como se exponen, por ejemplo, en los Common Terminology Criteria for adverse events v3.0 (CTCAE). Los parámetros de laboratorio que se pueden probar incluyen, por ejemplo, hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y examen de otros líquidos corporales tales como suero, plasma, líquido linfóide o cefalorraquídeo, líquido y similares. Así, la seguridad se puede evaluar, por ejemplo, por examen físico, técnicas de obtención de imágenes (es decir, ultrasonidos, rayos X, TAC, imagen por resonancia magnética (IRM), otras medidas con dispositivos técnicos (es decir, electrocardiograma), constantes vitales, midiendo parámetros de laboratorio y registrando acontecimientos adversos. Por ejemplo, los acontecimientos adversos en primates distintos de chimpancé en los usos y métodos según la invención se pueden examinar por métodos histopatológicos y/o histoquímicos.
25
30
35

El término "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y el estado general del sistema inmunitario del propio paciente. El término "paciente" incluye seres humanos y otros sujetos mamíferos que reciben o tratamiento profiláctico o terapéutico.
40
45

El término "dosis eficaz y no tóxica", como se usa en el presente documento, se refiere a una dosis tolerable de un anticuerpo biespecífico inventivo que es suficientemente alta para provocar el agotamiento de células patológicas, eliminación de tumores, encogimiento de tumores o estabilización de la enfermedad sin o esencialmente sin efectos tóxicos importantes. Dichas dosis eficaces y no tóxicas se pueden determinar, por ejemplo, por los estudios de aumento escalonado de dosis descritos en la técnica y deben estar por debajo de la dosis que induce los acontecimientos secundarios adversos graves (toxicidad limitante de la dosis, DLT).
50

También se hace referencia a los términos anteriores, por ejemplo, en la Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; reunión del Comité Directivo de ICH el 16 de julio de 1997.

55 La dosificación apropiada, o cantidad terapéuticamente eficaz, del anticuerpo biespecífico de la invención dependerá de la afección que se va a tratar, la gravedad de la afección, terapia previa, y la historia clínica del paciente y respuesta al agente terapéutico. Se puede ajustar la dosis apropiada según el criterio del médico adjunto de forma que se pueda administrar al paciente una vez o durante una serie de administraciones. La composición farmacéutica

se puede administrar como un único terapéutico o en combinación con terapias adicionales tales como terapias contra el cáncer, según se necesite.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente útiles para administración parenteral, es decir, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa, intrarticular y/o intrasinoval. La administración parenteral puede ser por inyección en bolo o infusión continua.

Si la composición farmacéutica se ha liofilizado, el material liofilizado se reconstituye primero en un líquido apropiado antes de la administración. El material liofilizado se puede reconstituir en, por ejemplo, agua bacteriostática para inyección (BWF), solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o la misma formulación en la que había estado la proteína antes de la liofilización.

Se conoce comúnmente el modo de acción de los anticuerpos biespecíficos que se unen tanto a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana tal como un antígeno de tumor como al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T. El poner un linfocito T en estrecha proximidad de una célula diana, es decir, acoplar dicho linfocito T, da como resultado, en ciertas circunstancias, en la destrucción de la célula diana por el linfocito T. Este proceso puede ser explotado en la lucha contra enfermedad proliferativa, enfermedad inflamatoria, enfermedad infecciosa y enfermedad autoinmunitaria. Así, el fusionar algo, tal como secuencias de aminoácidos adicionales, con el dominio de unión de CD3, es decir, el "dominio efector" de un anticuerpo biespecífico, o con el dominio de unión diana, influye en las propiedades del anticuerpo biespecífico de forma que ya no ejercería su función en acoplar apropiadamente un linfocito T y/o unirse a su diana. De hecho, los linfocitos T están equipados con gránulos que contienen una combinación mortal de proteínas formadoras de poros, las denominadas perforinas, y proteasas inductoras de la muerte celular, denominadas granzimas. Estas proteínas se suministran dentro de las células diana mediante una sinapsis citolítica que solo se puede formar si los linfocitos T están en estrecha proximidad con una célula diana que tiene la finalidad de ser destruida. Normalmente, la estrecha proximidad entre un linfocito T y una célula diana se logra por la unión del linfocito T a un complejo de MHC clase I/péptido usando su receptor de linfocitos T de correspondencia. Además, es la función de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención llevar un linfocito T en dicha estrecha proximidad a una célula diana en ausencia de interacción del receptor de linfocitos T/MHC. Por tanto, se puede imaginar que la fusión de algo, tal como secuencias de aminoácidos adicionales, con o cualquiera o todo del primer, segundo y/o tercer dominio de unión de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención podría influir negativamente en su función, es decir, poner juntos una célula diana y un linfocito T para destruir la célula diana.

Siendo así y sabiendo que es altamente deseable aumentar la semivida en suero de los anticuerpos biespecíficos para estabilizarlos o prevenirlos de la rápida eliminación renal y similares, el experto parece estar en un dilema. De hecho, aunque se podría lograr un aumento de la semivida teniendo un anticuerpo biespecífico que se une a, por ejemplo, albúmina de suero que requiere la equipación de dicho anticuerpo biespecífico con un dominio que es capaz de unirse a albúmina de suero, la adición de dicho dominio podría afectar probablemente adversamente las propiedades de dicho anticuerpo biespecífico, por ejemplo, podría perder su función o llegar a ser al menos menos eficaz.

A pesar de este posible dilema y sabiendo que un anticuerpo biespecífico de la presente invención podría ser al menos debilitado o incluso inactivado mediante la adición de una unión adicional que es capaz de unirse a albúmina de suero, los presentes inventores generaron anticuerpos biespecíficos que tenían, además, un dominio de unión que era capaz de unirse a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana y un dominio de unión que era capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T, un dominio de unión adicional que es capaz de unirse a albúmina de suero.

Los dominios de unión de albúmina se conocen, en general, en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de patente WO 2007/106120 A2)

El documento de patente WO 01/45746 que proporciona dominios de unión de albúmina de suero lo deja completamente en manos del experto en cuanto a qué extremo de una proteína, en particular un anticuerpo, se debe fusionar con un dominio de unión de albúmina de suero - puede ser o el extremo N o C - y puede depender de las circunstancias. Así, el estado de la técnica no proporciona orientación.

Se ha encontrado sorprendentemente que el dominio de unión de albúmina situado en el extremo C del dominio específico de receptor de CD3 se relaciona con un mal rendimiento de moléculas monoméricas aisladas del sobrenadante de células hospedadoras que producen el dominio de unión. A diferencia, cuando el dominio de unión de albúmina se situó en el extremo N de la molécula, se observó un aumento significativo en la productividad de expresión y rendimiento en comparación con los anticuerpos biespecíficos anteriormente mencionados que tienen el dominio de unión de albúmina situado en el extremo C del receptor de CD3.

Este aumento del rendimiento de moléculas monoméricas es de hecho una sorpresa, puesto que se habría esperado más probablemente que la adición del dominio de unión de albúmina corto idéntico a cualquiera del extremo N o extremo C de una molécula de unión dada con dos especificidades diferentes por antígeno de superficies celulares debiera tener efectos similares.

El mayor rendimiento observado de moléculas monoméricas es especialmente relevante en vista de una producción comercial de anticuerpos biespecíficos de la invención. Esta optimización en la calidad de producto permite mayor concentración de compuesto en las disoluciones de trabajo, así como en las formulaciones farmacéuticas finales de los anticuerpos biespecíficos. Permite además volúmenes de fermentador más pequeños, dando como resultado el mismo rendimiento de producción y menor coste para las columnas de purificación y otro equipo para la fabricación del producto y, por consiguiente, cálculo preferido del coste de mercancías. Además, la mayor concentración de producción/concentración de producto en el sobrenadante de células de producción permite procedimientos de purificación/aislamiento más rigurosos con mayor pérdida de producto aceptable durante la producción, que conduce a una clara separación del producto de componentes no deseados y, así, a una mayor pureza de producto preferida.

Más todavía, los anticuerpos biespecíficos del estado de la técnica, tales como diacuerpos con dos dominios de unión, uno para CD3 y un segundo para una molécula diana tal como CEA, y equipados con un dominio de unión de albúmina de suero, se construyen de tal forma que el dominio de unión de albúmina de suero se fusione con el extremo C del dominio que se une a la célula diana; véase Stork et al., Prot Eng Des Sel 20(11), 569-576 (2007) y Mueller et al., J Biol Chem 282(17), 12650-12660 (2007). Así, también a partir de lo anterior se habría llegado a la conclusión que un dominio de unión de albúmina de suero se debe añadir al extremo C del dominio que se une a una molécula de la superficie celular de la célula diana. Se hizo un enfoque similar en la construcción de anticuerpos DART tales como un ABD-DART (véase el documento de patente WO 2010/080538, por ejemplo la Figura 45).

Siendo así, los presentes inventores, a pesar de la enseñanza del estado de la técnica y las expectativas comprendidas de la enseñanza del estado de la técnica, añadieron un dominio de unión de albúmina de suero al extremo N del dominio de unión acoplado a una célula diana mediante la unión a una molécula de la superficie celular con un linfocito T mediante la unión al complejo de receptor de linfocitos T y tuvieron éxito en la generación de un anticuerpo biespecífico que tiene un elevada semivida en suero con un rendimiento deseado, mientras que es todavía capaz de unirse a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana y unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T. Así, es todavía factible acoplar el linfocito T de tal forma que ejerza sus funciones destructoras sobre la célula diana. Así, un anticuerpo biespecífico de la presente invención en el que los dominios de unión están en el orden que se describe en el presente documento (véase, por ejemplo, la reivindicación 1) es capaz de mediar en la citotoxicidad sobre una célula diana que se efectúa por linfocito T acoplado por dicho anticuerpo biespecífico.

Debido al dominio de unión de albúmina del anticuerpo biespecífico de la presente invención, un anticuerpo biespecífico de la presente invención tiene preferentemente un elevada semivida y/o tiempos de persistencia más largos en el cuerpo, proporcionando así también una mayor actividad funcional del anticuerpo biespecífico, mientras que es todavía producible en una cantidad deseable para escala de producción comercial.

Además, los presentes inventores han observado que un anticuerpo biespecífico de la presente invención también es capaz de mediar en la citotoxicidad *in vitro* en presencia de 10 % (v/v) de albúmina de suero, en particular albúmina de suero humano. Esto es una característica importante, puesto que en albúmina de suero sanguíneo humano está presente en aproximadamente 10-20 % (v/v). En realidad, un anticuerpo biespecífico de la presente invención no existe de forma natural en un mamífero, en particular en un ser humano, y, así, podría haber sido entonces que la presencia de albúmina de suero pudiera alterar o interferir de alguna forma con la acción de un anticuerpo biespecífico de la presente invención.

A modo de ejemplo, se puede usar el ensayo de citotoxicidad *in vitro* en presencia de albúmina de suero, en particular albúmina de suero humano, para probar un anticuerpo biespecífico de la presente invención para su capacidad de mediar en la citotoxicidad.

Otra propiedad sorprendente de un anticuerpo biespecífico de la presente invención que tiene el orden (configuración/disposición) de los dominios como se describe en el presente documento, por ejemplo en la reivindicación 1, se puede producir principalmente con altos rendimientos como monómero. En particular, los presentes inventores encontraron que más del 80, 85, 90 o incluso 95 % del anticuerpo biespecífico obtenible de células hospedadoras que expresa dicho anticuerpo biespecífico están en forma de un monómero. Esto es una característica importante, puesto que los dímeros o incluso multímeros no son deseables puesto que se supone que han perdido la mayor parte de sus capacidades de unión a una célula diana (por una molécula de la superficie celular) y/o un linfocito T (por el complejo de receptor de linfocitos T).

En vista de lo anterior, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico monocatenario aislado que comprende al menos tres dominios de unión, en donde

(a) el primer dominio de unión se une a albúmina de suero y está situado en el extremo N del segundo dominio de unión;

(b) dicho segundo dominio de unión se une a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana en donde la molécula superficial es un antígeno de tumor; y

(c) el tercer dominio de unión se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T sobre una célula de primate humano y no humano, en donde los tres dominios están consecutivamente en una cadena de polipéptidos en el orden desde el extremo N hasta el extremo C

- el primer dominio de unión;
- 5 • el segundo dominio de unión; y
- el tercer dominio de unión.

El término "molécula de la superficie celular sobre una célula diana" o "antígeno de superficie celular", como se usa en el presente documento, indica una molécula, que se presenta sobre la superficie de una célula. En la mayoría de los casos, esta molécula se localizará en o sobre la membrana plasmática de la célula tal que al menos parte de esta molécula siga estando accesible desde el exterior de la célula en forma terciaria. Un ejemplo no limitante de una molécula de la superficie celular, que está localizada en la membrana plasmática, es una proteína transmembranaria que comprende, en su conformación terciaria, regiones de hidrofilia e hidrofobia. Aquí, al menos una región hidrófoba permite que se incorpore la molécula de la superficie celular, o se inserte en la membrana plasmática hidrófoba de la célula, mientras que las regiones hidrófilas se extienden en cualquier lado de la membrana plasmática en el citoplasma y espacio extracelular, respectivamente. Los ejemplos no limitantes de moléculas de la superficie celular que se localizan sobre la membrana plasmática son proteínas que se han modificado en un resto de cisteína para llevar un grupo palmitoílo, proteínas modificadas en un resto de cisteína del extremo C para llevar un grupo farnesilo, o proteínas que se han modificado en el extremo C para llevar un anclaje de glicosil fosfatidil inositol ("GPI"). Estos grupos permiten la unión covalente de proteínas a la superficie externa de la membrana plasmática, donde siguen estando accesibles para el reconocimiento por moléculas extracelulares tales como anticuerpos. Como es evidente de los ejemplos adjuntos, los ejemplos no limitantes de moléculas de la superficie celular sobre una célula diana son la molécula CD33 y la molécula CEA. Los dominios de unión para CD33 adecuados para el formato descrito en el presente documento de un anticuerpo biespecífico se describen con detalle, por ejemplo, en el documento de patente WO 2008/119567. Los dominios de unión correspondientes para CEA adecuados para el formato descrito en el presente documento de un anticuerpo biespecífico se describen con detalle, por ejemplo, en el documento de patente WO 2007/071426.

El complejo de receptor de CD3 de linfocitos T es un complejo de proteína y está compuesto por cuatro cadenas distintas. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , y dos cadenas CD3 ϵ (épsilon). Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de linfocitos T (TCR) y la cadena ζ para generar una señal de activación en linfocitos T.

La lisis redirigida de células diana mediante el reclutamiento de linfocitos T por un anticuerpo biespecífico multiespecífico, al menos biespecífico, implica la formación de sinapsis citolíticas y la administración de perforina y granzimas. Los linfocitos T acoplados son capaces de lisis de células diana en serie, y no son afectados por los mecanismos de escape inmunitario que interfieren con el procesamiento y la presentación de antígenos de péptidos, o diferenciación de linfocitos T clonales; véase, por ejemplo, el documento de patente WO 2007/042261.

La afinidad del segundo dominio de unión por una molécula superficial de célula humana sobre una célula diana es preferentemente ≤ 100 nM y más preferentemente ≤ 50 nM. En una realización preferida de la invención, la afinidad es ≤ 15 nM, más preferentemente ≤ 10 nM, incluso más preferentemente ≤ 5 nM, incluso más preferentemente ≤ 1 nM, incluso más preferentemente $\leq 0,5$ nM, incluso más preferentemente $\leq 0,1$ nM, y lo más preferentemente $\leq 0,05$ nM. La afinidad del segundo dominio de unión por una molécula de la superficie celular de macaco sobre una célula diana es preferentemente ≤ 100 nM y más preferentemente ≤ 50 nM. En una realización preferida de la invención, la afinidad es ≤ 15 nM, más preferentemente ≤ 10 nM, incluso más preferentemente ≤ 5 nM, incluso más preferentemente ≤ 1 nM, incluso más preferentemente $\leq 0,5$ nM, incluso más preferentemente $\leq 0,1$ nM, y lo más preferentemente $\leq 0,05$ nM o incluso $\leq 0,01$ nM. La afinidad se puede medir, por ejemplo, en un ensayo Biacore o en un ensayo Scatchard, por ejemplo como se describe en los ejemplos. El hueco de afinidad para la unión a molécula de la superficie celular de macaco sobre una célula diana frente a la molécula superficial de célula humana sobre una célula diana es preferentemente [1:10-1:5] o [5:1-10:1], más preferentemente [1:5-5:1], y lo más preferentemente [1:2-3:1] o incluso [1:1-3:1]. Otros métodos de determinación de la afinidad son bien conocidos por el experto.

Los anticuerpos humanos, respectivamente anticuerpos biespecíficos humanos, evitan algunos de los problemas asociados a los anticuerpos/anticuerpos biespecíficos que poseen regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de dichas proteínas murinas o derivadas de rata puede conducir a la rápida eliminación de los anticuerpos/anticuerpos biespecíficos o puede conducir a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo/anticuerpo biespecífico por un paciente. Para evitar la utilización de anticuerpos/anticuerpos biespecíficos murinos o derivados de rata, se pueden generar anticuerpos humanos o completamente humanos mediante la introducción de la función de anticuerpo humano en un roedor de manera que el roedor produzca anticuerpos completamente humanos.

La capacidad de clonar y reconstruir loci humanos de megabases de tamaño en YACs y de introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un poderoso enfoque para elucidar los componentes funcionales de loci muy grandes

o aproximadamente mapeados, así como de generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de loci de ratón con sus equivalentes humanos podría proporcionar entendimientos únicos en la expresión y regulación de los productos de gen humano durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas, y su participación en la inducción y progresión de enfermedades.

5 Una aplicación práctica importante de dicha estrategia es la "humanización" del sistema inmunitario humoral de ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que se han inactivado los genes Ig endógenos ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subyacen a la expresión programada y el ensamblaje de anticuerpos, así como su función en el desarrollo de linfocitos B. Además, dicha estrategia podría proporcionar una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (mAbs) —
 10 un hito importante hacia el cumplimiento de la promesa de terapia de anticuerpos en la enfermedad humana. Se espera que los anticuerpos completamente humanos/anticuerpos biespecíficos minimicen las respuestas alérgicas inmunogénicas e intrínsecas a mAb de ratón o derivatizados de ratón y así aumente la eficacia y seguridad de los anticuerpos/anticuerpos biespecíficos administrados. Se puede esperar que el uso de anticuerpos completamente humanos/anticuerpos biespecíficos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones repetidas de compuesto. Un enfoque hacia este objetivo era manipular cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos del loci Ig humana en anticipación a que dichos ratones producirían un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humana preservarían la gran diversidad de genes variables, así como la apropiada regulación de la producción de anticuerpos y expresión. Explotando la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la ausencia de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón debería dar anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, que incluyen antígenos humanos. Usando la tecnología de hibridomas, se podrían producir y seleccionar fácilmente mAbs humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada. Esta estrategia general se demostró a propósito de la generación por los presentes inventores de las primeras cepas de ratón Xenomouse, como se publicó en 1994. (véase Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)) Se manipularon las cepas de Xenomouse con cromosomas artificiales de levadura (YACs) que contenían fragmentos de configuración de la línea germinal de 245 kb y 190 kb de tamaño del locus de la cadena pesada humana y locus de la cadena ligera kappa, respectivamente, que contenían secuencias de núcleo de la región variable y constante. Ídem. La Ig humana que contiene YACs demostró ser compatible con el sistema de ratón para tanto la transposición como la expresión de anticuerpos y fueron capaces de sustituirse por los genes de Ig de ratón inactivados. Esto se demostró por su capacidad para inducir el desarrollo de linfocitos B, para producir un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos, y para generar mAbs humanos específicos de antígeno. Estos resultados también sugirieron que la introducción de mayores porciones de los loci de Ig humana que contienen mayores números de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes Ig humanas podrían resumir sustancialmente el repertorio completo que es característico de la respuesta humoral humana para infección e inmunización. El trabajo de Green et al. se extendió recientemente a la introducción de más de aproximadamente del 80 % del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos de YAC de configuración de la línea germinal de megabase de tamaño de los loci de la cadena pesada humana y loci de la cadena ligera kappa, respectivamente. Véase Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996.

La producción de los ratones Xenomouse se trata y describe además en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, N° de serie 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, N° de serie 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, N° de serie 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, presentada N° de serie 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, N° de serie 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, N° de serie 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, N° de serie 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, N° de serie 08/430.938, 27 de abril de 1995, N° de serie 08/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, N° de serie 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, N° de serie 08/463.191, presentada el 5 de junio de 1995, N° de serie 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, N° de serie 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, N° de serie 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, N° de serie 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, N° de serie 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995, N° de serie 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996, y N° de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las patentes de EE.UU. N° 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las patentes japonesas N° 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véase también Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Véase también la patente europea N° EP 0 463151 B1, concesión publicada el 12 de junio de 1996, solicitud de patente internacional N° WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, solicitud de patente internacional N° WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, documento de patente WO 98/24893, publicado el 11 de junio de 1998, documento de patente WO 00/76310, publicado el 21 de diciembre de 2000, documento de patente WO 03/47336. En un enfoque alternativo, otros, que incluyen GenPharm International, Inc., han utilizado un de enfoque "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus de Ig exógena mediante la inclusión de trozos (genes individuales) del locus de Ig. Así, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu, y una segunda región constante (preferentemente una región constante gamma) en una construcción para inserción en un animal. Este enfoque se describe en la patente de EE.UU. N° 5.545.807 a Surani et al. y las patentes de EE.UU. N° 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650,

5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458 cada uno a Lonberg y Kay, las patentes de EE.UU. N° 5.591.669 y 6.023.010 a Krimpenfort y Berns, las patentes de EE.UU. N° 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 a Berns et al., y la patente de EE.UU. N° 5.643.763 a Choi y Dunn, y solicitud de patente de EE.UU. internacional de GenPharm N° de serie 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, N° de serie 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, N° de serie 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, N° de serie 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, N° de serie 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, N° de serie 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, N° de serie 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, N° de serie 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993, N° de serie 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, N° de serie 08/161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993, N° de serie 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, N° de serie 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véanse también la patente europea N° 0 546 073 B1, solicitudes de patente internacional N° WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884, y la patente de EE.UU. N° 5.981.175. Véase además Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994), y Tuailon et al., (1995), Fishwild et al., (1996).

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos de ratones en los que, mediante fusión de microcélulas, se han introducido trozos grandes de cromosomas, o cromosomas enteros. Véanse las solicitudes de patente europea N° 773 288 y 843 961. Xenerex Biosciences está desarrollando una tecnología para la posible generación de anticuerpos humanos. En esta tecnología, se reconstituyen ratones SCID con células linfáticas humanas, por ejemplo, linfocitos B y/o T. Los ratones se inmunizan entonces con un antígeno y pueden generar una respuesta inmunitaria contra el antígeno. Véanse las patentes de EE.UU. N° 5.476.996, 5.698.767 y 5.958.765.

Las respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) han llevado a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de otro modo. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, se espera que se observen ciertas respuestas de anticuerpos humanos anti-quiméricos (HACA), particularmente en utilizaciones crónicas o de múltiples dosis del anticuerpo. Así, sería deseable proporcionar anticuerpos completamente humanos contra EGFRvIII para debilitar cuestiones y/o efectos de respuesta de HAMA o HACA.

Se puede medir de diversas formas la citotoxicidad mediada por anticuerpos biespecíficos anti-molécula de la superficie celular/biespecíficos CD3. Las células efectoras pueden ser, por ejemplo, linfocitos T CD8 positivos enriquecidos (humanos) estimulados o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) no estimuladas (humanas). Si las células diana son de origen de macaco o se expresan o transfectan con molécula de la superficie celular de macaco, las células efectoras también deben ser de origen de macaco, tal como una línea de linfocitos T de macaco, por ejemplo, 4119LnPx. Las células diana deben expresar (al menos el dominio extracelular de) la molécula de la superficie celular, por ejemplo la molécula de la superficie celular humana o de macaco. Las células diana pueden ser una línea celular (tal como CHO) que se transfecta establemente o transitoriamente con la molécula de la superficie celular, por ejemplo la molécula de la superficie celular humana o de macaco. Alternativamente, las células diana pueden ser una línea celular expresora natural positiva de molécula de la superficie celular elegida. Así, si, por ejemplo, la molécula de la superficie celular elegida es CD33, las células diana deben expresar CD33, o como células diana que expresan naturalmente la molécula CD33 o, como se describe, después de la transfección del gen correspondiente en el formato de un vector de expresión. Normalmente, se espera que los valores de CE₅₀ sean más bajo con líneas celulares diana que expresan niveles más altos de la molécula de la superficie celular elegida sobre la superficie celular. La relación entre células efectoras y diana (E:D) es normalmente aproximadamente 10:1, pero también puede variar. La actividad citotóxica de anticuerpos biespecíficos anti-molécula de la superficie celular/biespecíficos CD3 se puede medir en un ensayo de liberación de ⁵¹-cromo (tiempo de incubación de aproximadamente 18 horas) o en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS (tiempo de incubación de aproximadamente 48 horas). También son posibles modificaciones del tiempo de incubación del ensayo (reacción citotóxica). Otros métodos de medición de la citotoxicidad son bien conocidos para el experto y comprenden ensayos MTT o MTS, ensayos basado en ATP que incluyen ensayos bioluminiscentes, el ensayo de sulforrodamina B (SRB), ensayo WST, ensayo clonogénico y la tecnología ECIS.

La actividad citotóxica mediada por anticuerpos biespecíficos anti-molécula de la superficie celular/biespecíficos CD3 de la presente invención se mide preferentemente en un ensayo de citotoxicidad basado en célula. Se representa por el valor CE₅₀, que corresponde a la concentración eficaz al 50 % (concentración del anticuerpo biespecífico que induce una respuesta citotóxica a medio camino entre el nivel inicial y el máximo). Preferentemente, el valor de CE₅₀ de los anticuerpos biespecíficos anti-molécula de la superficie celular/biespecíficos CD3 es ≤20.000 pg/mL, más preferentemente ≤5000 pg/mL, incluso más preferentemente ≤1000 pg/mL, incluso más preferentemente ≤500 pg/mL, incluso más preferentemente ≤350 pg/mL, incluso más preferentemente ≤320 pg/mL, incluso más preferentemente ≤250 pg/mL, incluso más preferentemente ≤100 pg/mL, incluso más preferentemente ≤50 pg/mL, incluso más preferentemente ≤10 pg/mL, y lo más preferentemente ≤5 pg/mL.

Cualquiera de los valores de CE₅₀ dados anteriormente se puede combinar con uno cualquiera de los escenarios indicados de un ensayo de citotoxicidad basado en células. Por ejemplo, cuando se usan linfocitos T CD8 positivos (humanos) o una línea de linfocitos T de macaco como células efectoras, el valor CE₅₀ del anticuerpo biespecífico anti-molécula de la superficie celular/biespecífico CD3 es preferentemente ≤1000 pg/mL, más preferentemente ≤500 pg/mL, incluso más preferentemente ≤250 pg/mL, incluso más preferentemente ≤100 pg/mL, incluso más

preferentemente ≤ 50 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 10 pg/mL, y lo más preferentemente ≤ 5 pg/mL. Si en este ensayo las células diana son células transfectadas con moléculas de la superficie celular elegidas (humana o de macaco) tales como células CHO, el valor CE_{50} del anticuerpo biespecífico anti-molécula de la superficie celular/biespecífico CD3 es preferentemente ≤ 150 pg/mL, más preferentemente ≤ 100 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 50 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 30 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 10 pg/mL, y lo más preferentemente ≤ 5 pg/mL.

Si las células diana son la línea celular expresora natural positiva de moléculas de la superficie celular elegidas, entonces el valor de CE_{50} es preferentemente ≤ 350 pg/mL, más preferentemente ≤ 320 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 250 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 200 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 100 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 150 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 100 pg/mL, y lo más preferentemente ≤ 50 pg/mL, o más baja.

Cuando se usan CMSPs (humanas) como células efectoras, el valor de CE_{50} del anticuerpo biespecífico anti-molécula de la superficie celular/biespecífico CD3 es preferentemente ≤ 1000 pg/mL, más preferentemente ≤ 750 pg/mL, más preferentemente ≤ 500 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 350 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 320 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 250 pg/mL, incluso más preferentemente ≤ 100 pg/mL, y lo más preferentemente ≤ 50 pg/mL, o más baja.

La diferencia en la actividad citotóxica entre la isoforma monomérica y dimérica de anticuerpos biespecíficos anti-molécula de la superficie celular/CD3 individuales se denomina "hueco de potencia". Este hueco de potencia se puede calcular, por ejemplo, como la relación entre los valores de CE_{50} de la forma monomérica y dimérica de la molécula. Los huecos de potencia de los anticuerpos biespecíficos anti-molécula de la superficie celular/CD3 de la presente invención son preferentemente ≤ 5 , más preferentemente ≤ 4 , incluso más preferentemente ≤ 3 , incluso más preferentemente ≤ 2 y lo más preferentemente ≤ 1 .

La molécula de unión de la invención es una proteína de fusión que comprende al menos dos dominios de unión, con o sin conectores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los conectores peptídicos adecuados están los descritos en las patentes de EE.UU. 4.751.180 y 4.935.233 o el documento de patente WO 88/09344. Otro método de preparación de derivados de construcciones de anticuerpos oligoméricos implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremalleras de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), y han estado en una variedad de proteínas diferentes desde que se encontraron. Entre las cremalleras de leucina conocidas están péptidos que existen de forma natural y derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína tensoactiva de pulmón D (SPD) descrita en Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada con ella se describe en Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden fragmento de anticuerpo de molécula de la superficie celular elegido o derivado fusionado con un péptido de cremallera de leucina se expresan en células hospedadoras adecuadas, y los fragmentos de anticuerpos de molécula de la superficie celular elegidos oligoméricos solubles o derivados que forman se recuperan del sobrenadante de cultivo.

Las modificaciones covalentes de proteínas de unión al antígeno están incluidas dentro del alcance de la presente invención, y, en general, se hacen, pero no siempre, postraduccionalmente. Por ejemplo, se introducen en la molécula varios tipos de modificaciones covalentes de la proteína de unión al antígeno haciendo reaccionar restos de aminoácidos específicos de la proteína de unión al antígeno con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos del extremo N o C.

Se hacen reaccionar restos de cisteinilo lo más comúnmente con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, dando derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-piridil disulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Se derivatizan restos de histidilo por reacción con dietilpircarbonato a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También es útil el bromuro de para-bromofenacilo; la reacción se realiza preferentemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Se hacen reaccionar restos de lisinilo y del extremo amino con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para la derivatización de restos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruo; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Se modifican restos de arginilo por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de restos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional de guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como el grupo épsilon-amino de arginina.

5 Se puede hacer la modificación específica de restos de tirosilo, con particular interés en la introducción de marcas espectrales dentro de restos de tirosilo por reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Lo más comúnmente, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetiltirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los restos de tirosilo se yodan usando ¹²⁵I o ¹³¹I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T descrito anteriormente,

10 Se modifican selectivamente grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) por reacción con carbodiimidias (R'-N=C=N-R'), donde R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, se convierten restos aspartilo y glutamilo en restos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

15 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular proteínas de unión al antígeno con una matriz de soporte insoluble en agua o superficie para su uso en una variedad de métodos. Los agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato dan productos intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Alternativamente, se emplean matrices reactivas insolubles en agua tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE.UU. Nº 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

25 Los restos de glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados a los restos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Alternativamente, estos restos son desamidados en condiciones suavemente ácidas. Cualquier forma de estos restos entra dentro del alcance de la presente invención.

30 Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), acetilación de la amina del extremo N y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

35 Otra tipo de modificación covalente de la proteína de unión al antígeno incluida dentro del alcance de la presente invención comprende alterar el patrón de glucosilación de la proteína. Como se conoce en la técnica, los patrones de glucosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de restos de aminoácidos de glucosilación particulares, tratado más adelante), o la célula hospedadora u organismo en el que se produce la proteína. Sistemas de expresión particulares se tratan más adelante. La glucosilación de polipéptidos normalmente está o unida en N o unida en O. Unida en N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. Glucosilación unida en O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa, a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

45 La adición de sitios de glucosilación a la proteína de unión al antígeno se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glucosilación unidos en N). La alteración también se puede hacer mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia de partida (para sitios de glucosilación unidos en O). Para mayor facilidad, la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al antígeno se altera preferentemente mediante cambios al nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de forma que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

55 Otro medio de aumentar el número de restos de hidrato de carbono en la proteína de unión al antígeno es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos con la proteína. Estos procedimientos son ventajosos por que no requieren la producción de la proteína en una célula hospedadora que tiene capacidades de glucosilación para la glucosilación unida en N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el (los) azúcar(es) se puede(n) unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento de patente WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

La eliminación de restos de hidrato de carbono presentes sobre la proteína de unión al antígeno de partida se puede llevar a cabo químicamente o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos de los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja el polipéptido intacto. La desglucosilación química se describe por Hakimuddin et al. 1987, Arch. Biochem. Biophys, 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Puede lograrse la escisión enzimática de restos de hidrato de carbono sobre polipéptidos usando una variedad de endo- y exoglucosidasas, como se describe por Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Se puede prevenir la glucosilación en posibles sitios de glucosilación por el uso del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glucósido.

Otro tipo de modificación covalente de la proteína de unión al antígeno comprende unir la proteína de unión al antígeno a diversos polímeros no proteínicos, que incluyen, pero no se limitan a, diversos polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxilalquilenos, en el modo expuesto en las patentes de EE.UU. Nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Además, como se conoce en la técnica, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro de la proteína de unión al antígeno para facilitar la adición de polímeros tales como PEG.

En algunas realizaciones, la modificación covalente de las proteínas de unión al antígeno de la invención comprende la adición de una o más marcas.

El término "grupo de marca" significa cualquier marca detectable. Los ejemplos de grupos de marca adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), grupos fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotínico, o epítopes de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias del par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcas de epítopes). En algunas realizaciones, el grupo de marca se acopla a la proteína de unión al antígeno mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. Se conocen en la técnica diversos métodos de marcado de proteínas y se pueden usar en la realización de la presente invención.

En general, las marcas se clasifican en una variedad de clases, dependiendo del ensayo en el que se van a detectar: a) marcas isotópicas, que pueden ser radiactivas o isótopos pesados; b) marcas magnéticas (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos para redox; d) colorantes ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítopes de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias del par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcas de epítopes, etc.). En algunas realizaciones, el grupo de marca se acopla a la proteína de unión al antígeno mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. Se conocen en la técnica diversos métodos de marcado de proteínas y se pueden usar en la realización de la presente invención. Las marcas específicas incluyen colorantes ópticos, que incluye, pero no se limitan a, cromóforos, fósforos y fluoróforos, siendo los últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser o flúores de "molécula pequeña", o flúores proteínicos.

Por "marca fluorescente" se indica cualquier molécula que se pueda detectar por sus propiedades fluorescentes inherentes. Las marcas fluorescentes adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde de malaquita, estilbena, Lucifer Yellow, Cascade Blue J, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, verde de Oregón, los colorantes de Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, rodamina y Texas Red (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Se describen colorantes ópticos adecuados, que incluyen fluoróforos, en Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

Las marcas fluorescentes proteínicas adecuadas también incluyen, pero no se limitan a, proteína verde fluorescente, que incluye una especie de Renilla, *Ptilosarcus*, o *Aequorea* de GFP (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Número de acceso de GenBank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β -galactosidasa (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) y Renilla (documentos de patente WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, patentes de EE.UU. Nº 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la invención se caracteriza de tal forma que los tres dominios están consecutivamente en una cadena de polipéptidos en el orden desde el extremo N hasta el extremo C

- el primer dominio de unión;
- el segundo dominio de unión; y
- el tercer dominio de unión.

5 La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico monocatenario que comprende al menos tres dominios de unión comprendidos en una cadena de polipéptidos, en donde

(a) el primer dominio es capaz de unirse a albúmina de suero y está situado en el extremo N del segundo dominio de unión;

(b) dicho segundo dominio es capaz de unirse a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana; y

10 (c) el tercer dominio es capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T,

en donde el rendimiento de anticuerpo biespecífico monomérico expresable en relación con la cantidad total de anticuerpo biespecífico aislada del sobrenadante de cultivo de células hospedadoras que produce el anticuerpo biespecífico depende del orden del primer y segundo dominio de unión en dicho anticuerpo biespecífico.

15 La invención proporciona además un anticuerpo biespecífico monocatenario que comprende al menos tres dominios de unión comprendidos en una cadena de polipéptidos en el orden primer dominio, segundo dominio y tercer dominio, en donde

(a) el primer dominio es capaz de unirse a albúmina de suero y está situado en el extremo N del segundo dominio de unión;

20 (b) dicho segundo dominio es capaz de unirse a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana; y

(c) el tercer dominio es capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T;

25 en donde el rendimiento de anticuerpo biespecífico monomérico aislado del sobrenadante de cultivo de células hospedadoras que produce el anticuerpo biespecífico es al menos 1,5 veces superior al rendimiento de anticuerpo biespecífico monomérico aislado del sobrenadante de cultivo de células hospedadoras que produce un anticuerpo biespecífico que comprende el dominio de unión capaz de unirse a albúmina de suero está en el extremo C de la molécula.

Se prefiere además que este rendimiento de anticuerpos biespecíficos monoméricos sea 2 veces mayor, más preferentemente, 2,5 veces mayor, incluso más preferido 3 veces, 4 veces o 5 veces mayor.

30 En una realización, el anticuerpo biespecífico de la invención se caracteriza de tal forma que al menos uno de los dominios de unión, preferentemente el segundo y/o tercer dominio de unión, sea un scFv o anticuerpo de un solo dominio.

También en una realización del anticuerpo biespecífico de la invención, la molécula comprende uno o más polipéptidos heterólogos adicionales.

35 Un anticuerpo biespecífico de la invención también puede comprender una marca His como polipéptido heterólogo. Se prefiere para el anticuerpo biespecífico de la invención que la marca His esté situada en el extremo C del tercer dominio de unión.

El anticuerpo biespecífico de la invención también puede comprender dominios adicionales, que, por ejemplo, son útiles en el aislamiento de la molécula o se refieren a un perfil farmacocinético adaptado de la molécula.

40 Los dominios útiles para el aislamiento de un anticuerpo biespecífico se pueden elegir de motivos de péptido o restos secundariamente introducidos, que pueden ser capturados en un método de aislamiento, por ejemplo una columna de aislamiento. Realizaciones no limitantes de dichos dominios adicionales comprenden motivos de péptido conocidos como marca Myc, marca HAT, marca HA, marca TAP, marca GST, dominio de unión a quitina (marca CBD), proteína de unión a maltosa (marca MBP), marca Flag, marca Strep y variantes de los mismos (por ejemplo, marca StrepII) y marca His. Se prefiere que todos los anticuerpos biespecíficos desvelados en el presente documento caracterizados por las CDRs identificadas comprendan un dominio de marca His, que, en general, se conoce como una repetición de restos consecutivos de His en la secuencia de aminoácidos de una molécula, preferentemente de seis restos de His.

50 Como es evidente en los ejemplos adjuntos, parece que el rendimiento del anticuerpo biespecífico monomérico de la invención aislado del sobrenadante de células de células hospedadoras que expresa el anticuerpo biespecífico se puede incrementar adicionalmente usando anticuerpos biespecíficos, que no comprenden una marca His. Así, sin

- 5 desear quedar ligado a teoría, la elección de un anticuerpo biespecífico de la invención, que no comprende un dominio de marca His, puede dar como resultado el incremento adicional del rendimiento de anticuerpos biespecíficos monoméricos del sobrenadante de células de células hospedadoras que expresan el anticuerpo biespecífico. Por consiguiente, se prefieren alternativamente anticuerpos biespecíficos que no comprenden una marca His.
- La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico, en donde
- (a) el primer dominio de unión que se une a albúmina de suero de primate humano y no humano comprende SEQ ID Nos. 2, 4 o 6, y está situado en el extremo N del segundo dominio de unión;
- 10 (b) el segundo dominio de unión se une a la molécula de la superficie celular sobre una célula de primate humano y no humano en donde la molécula superficial es un antígeno de tumor, y
- (c) el tercer dominio de unión se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T sobre una célula de primate humano y no humano,
- en donde los tres dominios están consecutivamente en una cadena de polipéptidos en el orden desde el extremo N hasta el extremo C
- 15 • el primer dominio de unión;
- el segundo dominio de unión; y
- el tercer dominio de unión.
- En una realización, el anticuerpo biespecífico según la invención se caracteriza por que el primer dominio de unión capaz de unirse a albúmina de suero deriva de una biblioteca combinatoria o un dominio de unión de anticuerpo.
- 20 En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención, el primer dominio de unión capaz de unirse a albúmina de suero deriva de una CDR de un anticuerpo de un solo dominio.
- En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención
- el segundo dominio de unión se une a la molécula de la superficie celular sobre una célula diana con una afinidad (KD) de ≤ 100 nM; y
- 25 • el tercer dominio de unión se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T con una afinidad (KD) de ≤ 100 nM.
- En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención, el anticuerpo biespecífico muestra actividad citotóxica en un ensayo *in vitro* que mide la lisis de células diana por células efectoras en presencia de 10 % de albúmina de suero humano.
- 30 En una realización preferida del anticuerpo biespecífico de la invención, la molécula consiste en una única cadena de polipéptidos.
- En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención
- (a) el segundo dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpo; y/o
- (b) el tercer dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpo.
- 35 También en una realización del anticuerpo biespecífico de la invención la molécula comprende uno o más polipéptidos heterólogos adicionales.
- En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención, el primer dominio de unión capaz de unirse a una molécula de la superficie celular se une a un antígeno de tumor.
- 40 En una realización preferida del anticuerpo biespecífico de la invención, el tercer dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T es capaz de unirse a un epítipo de cadena CD3 ϵ humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2, 4, 6 u 8 del documento de patente WO 2008/119567 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu.
- 45 En un aspecto de la invención, el tercer dominio de unión es capaz de unirse a CD3 humana y a CD3 de macaco, preferentemente a CD3 épsilon humana y a CD3 épsilon de macaco. Adicionalmente o alternativamente, el tercer dominio de unión es capaz de unirse a CD3 épsilon de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* y/o *Saimiri sciureus*. Según estas realizaciones, uno o ambos dominios de unión del anticuerpo biespecífico de la invención son

preferentemente específicos de especies cruzadas para miembros del orden de mamíferos de los primates. Los dominios de unión de CD3 específicos de especies cruzadas se describen, por ejemplo, en el documento de patente WO 2008/119567.

5 Se prefiere particularmente para el anticuerpo biespecífico de la presente invención que el tercer dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T comprenda una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionadas de:

(a) CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 27 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 28 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 29 del documento de patente WO 2008/119567;

10 (b) CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 117 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 118 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 119 del documento de patente WO 2008/119567; y

15 (c) CDR-L1 como se representa en SEQ ID NO: 153 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en SEQ ID NO: 154 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-L3 como se representa en SEQ ID NO: 155 del documento de patente WO 2008/119567.

En una realización alternativamente preferida del anticuerpo biespecífico de la presente invención, el tercer dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T comprende una región VH que comprende CDR-H 1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionadas de:

20 (a) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 12 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 13 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 14 del documento de patente WO 2008/119567;

(b) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 30 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 31 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 32 del documento de patente WO 2008/119567;

25 (c) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 48 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 49 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 50 del documento de patente WO 2008/119567;

30 (d) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 66 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 67 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 68 del documento de patente WO 2008/119567;

(e) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 84 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 85 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 86 del documento de patente WO 2008/119567;

35 (f) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 102 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 103 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 104 del documento de patente WO 2008/119567;

(g) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 120 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 121 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 122 del documento de patente WO 2008/119567;

40 (h) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 138 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 139 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 140 del documento de patente WO 2008/119567;

45 (i) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 156 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 157 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 158 del documento de patente WO 2008/119567; y

(j) CDR-H1 como se representa en SEQ ID NO: 174 del documento de patente WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en SEQ ID NO: 175 del documento de patente WO 2008/119567 y CDR-H3 como se representa en SEQ ID NO: 176 del documento de patente WO 2008/119567.

50 Se prefiere además para el anticuerpo biespecífico de la presente invención que el tercer dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T comprenda una región VL seleccionada del grupo que consiste en una región VL como se representa en SEQ ID NO: 35, 39, 125, 129, 161 o 165 del documento de patente WO 2008/119567.

Se prefiere además que el tercer dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T comprenda una región VH seleccionada del grupo que consiste en una región VH como se representa en SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 o 181 del documento de patente WO 2008/119567.

5 Más preferentemente, el anticuerpo biespecífico de la presente invención se caracteriza por el tercer dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T que comprende una región VL y una región VH seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 17 o 21 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 15 o 19 del documento de patente WO 2008/119567;

10 (b) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 35 o 39 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 33 o 37 del documento de patente WO 2008/119567;

(c) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 53 o 57 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 51 o 55 del documento de patente WO 2008/119567;

15 (d) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 71 o 75 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 69 o 73 del documento de patente WO 2008/119567;

(e) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 89 o 93 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 87 o 91 del documento de patente WO 2008/119567;

20 (f) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 107 o 111 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 105 o 109 del documento de patente WO 2008/119567;

(g) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 125 o 129 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 123 o 127 del documento de patente WO 2008/119567;

25 (h) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 143 o 147 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 141 o 145 del documento de patente WO 2008/119567;

(i) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 161 o 165 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 159 o 163 del documento de patente WO 2008/119567; y

30 (j) una región VL como se representa en SEQ ID NO: 179 o 183 del documento de patente WO 2008/119567 y una región VH como se representa en SEQ ID NO: 177 o 181 del documento de patente WO 2008/119567.

35 Según una realización preferida del anticuerpo biespecífico de la presente invención, en particular el tercer dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T, los pares de regiones VH y regiones VL están en el formato de un anticuerpo monocatenario (scFv). Las regiones VH y VL están dispuestas en el orden VH-VL o VL-VH. Se prefiere que la región VH esté situada en el extremo N con respecto a una secuencia conectora. La región VL está situada en el extremo C de la secuencia conectora.

40 Una realización preferida del anticuerpo biespecífico anteriormente descrito de la presente invención se caracteriza por el tercer dominio de unión capaz de unirse al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 o 187 del documento de patente WO 2008/119567.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la invención se caracteriza por una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NOs: 8, 12, 16, 20, 24, 26, 30, o 34.

45 Una realización alternativa de la invención proporciona un método para la producción de anticuerpo biespecífico de la invención, comprendiendo el método la etapa de:

- seleccionar anticuerpos biespecíficos que comprenden un dominio de unión, que se une a una molécula de la superficie celular sobre una célula diana, que comprende en el extremo N un dominio de unión que es capaz de unirse a albúmina de suero.

En una realización, el método de la invención comprende además la etapa de:

- 50
- añadir a la molécula un dominio de unión adicional, que se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T.

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica un anticuerpo biespecífico de la invención.

Además, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la invención. Además, la invención proporciona una célula hospedadora transformada o transfectada con la secuencia de ácidos nucleicos de la invención.

5 En una realización, la invención proporciona un proceso para la producción de un anticuerpo biespecífico de la invención o producido por un método de la invención, comprendiendo dicho proceso cultivar una célula hospedadora de la invención en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo biespecífico de la invención o producido por un método de la invención y recuperar el anticuerpo biespecífico producido del cultivo.

10 Además, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de la invención o producido según el proceso de la invención

15 Las formulaciones descritas en el presente documento son útiles como composiciones farmacéuticas en el tratamiento, la mejora y/o la prevención de la afección médica patológica como se describe en el presente documento en un paciente en necesidad del mismo. El término "tratamiento" se refiere a tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. El tratamiento incluye la aplicación o administración de formulación al cuerpo, un tejido aislado, o célula de un paciente que tiene una enfermedad/trastorno, un síntoma de una enfermedad/trastorno, o una predisposición hacia una enfermedad/trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, mejorar, corregir, o afectar la enfermedad, el síntoma de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad.

20 Aquellos "en necesidad de tratamiento" incluyen aquellos ya con el trastorno, así como aquellos en los que el trastorno se va a prevenir. El término "enfermedad" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la formulación de proteína descrita en el presente documento. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero a la enfermedad en cuestión. Los ejemplos no limitantes de enfermedades/trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral, o un trastorno inmunológico.

25 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o una pluralidad del anticuerpo biespecífico de la invención junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente eficaz. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.

30 Preferentemente, los materiales de formulación son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico de la invención.

35 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. En dichas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, prolina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); colorantes, aromatizantes y agentes de dilución; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino, preferentemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18^a Edición, (A. R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

55 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica óptica será determinada por un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración prevista, formato de administración y dosificación deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, arriba. En ciertas realizaciones, dichas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo* de las proteínas de unión al antígeno de la invención. En ciertas realizaciones, el vehículo o

excipiente primario en una composición farmacéutica puede ser cualquiera de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o excipiente adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos adicionales a modo de ejemplo. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, y pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo humano o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención o el anticuerpo biespecífico de las composiciones de la invención se puede preparar para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, arriba) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, en ciertas realizaciones, el anticuerpo humano o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención o el anticuerpo biespecífico de la invención se puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden seleccionar para administración parenteral. Alternativamente, las composiciones se pueden seleccionar para inhalación o para administración a través del tubo digestivo, tal como por vía oral. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia de la técnica. Los componentes de formulación están presentes preferentemente en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En ciertas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición a pH o fisiológico a un pH ligeramente más bajo, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

Cuando se contempla administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en la presente invención se pueden proporcionar en forma de una disolución acuosa sin pirógenos aceptable por vía parenteral que comprende el anticuerpo humano deseado o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención o el anticuerpo biespecífico de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en el que el anticuerpo biespecífico de la invención se formula como una disolución isotónica estéril, apropiadamente conservada. En ciertas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar liberación controlada o sostenida del producto que se puede administrar por inyección de liberación lenta. En ciertas realizaciones, también se puede usar ácido hialurónico, que tiene el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. En ciertas realizaciones, se pueden usar dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la proteína de unión al antígeno deseada.

Serán evidentes para los expertos en la técnica composiciones farmacéuticas adicionales, que incluyen formulaciones que implican el anticuerpo biespecífico de la invención en formulaciones de administración sostenida o controlada. También se conocen por los expertos en la técnica técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como vehículos de liposoma, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación lenta. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional N° PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímero semipermeables en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (como se desvela en la patente de EE.UU. N° 3.773.919 y la publicación de solicitud de patente europea N° EP 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 y Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno-acetato de vinilo (Langer et al., 1981, arriba) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (publicación de solicitud de patente europea N° EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que se pueden preparar por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; publicaciones de solicitud de patente europea N° EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

Las composiciones farmacéuticas usadas para administración *in vivo* normalmente se proporcionan como preparaciones estériles. La esterilización se puede llevar a cabo por filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando se liofiliza la composición, la esterilización usando este método se puede realizar o antes de o tras la liofilización y reconstitución. Las composiciones para administración parenteral se pueden almacenar en forma liofilizada o en una disolución. Las composiciones parentales, en general, se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Los aspectos de la invención incluyen anticuerpo biespecífico auto-tamponante de las formulaciones de la invención, que se puede usar como composiciones farmacéuticas, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599).

Como se trata anteriormente, ciertas realizaciones proporcionan anticuerpo biespecífico de las composiciones de proteína de la invención, particularmente composiciones farmacéuticas de la invención, que comprenden, además

del anticuerpo biespecífico de la invención, uno o más excipientes tales como los ilustrativamente descritos en esta sección y en cualquier parte en el presente documento. Los excipientes se pueden usar en la invención a este respecto para una amplia variedad de fines, tales como ajustar propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, tales como ajuste de viscosidad, y o procesos de la invención para mejorar la eficacia y o para estabilizar dichas formulaciones y procesos contra la degradación y deterioro debido a, por ejemplo, tensiones que ocurren durante la fabricación, transporte, almacenamiento, preparación previa al uso, administración, y a partir de entonces.

Están disponibles una variedad de exposiciones para la estabilización de proteínas y materiales de formulación y métodos útiles a este respecto, tales como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations", Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter y Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), y Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), particularmente en partes referentes a excipientes y procesos de los mismos para formulaciones de proteínas auto-tamponantes según la presente invención, especialmente en cuanto a productos farmacéuticos de proteína y procesos para usos médicos veterinarios y/o humanos.

Las sales se pueden usar según ciertas realizaciones de la invención para, por ejemplo, ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o estabilidad física de una proteína u otro componente de una composición según la invención.

Como se conoce bien, los iones pueden estabilizar el estado nativo de proteínas por unión a restos cargados sobre la superficie de proteínas y por protección de grupos cargados y polares en la proteína y reducción de la intensidad de sus interacciones electrostáticas, interacciones atractivas, y repulsivas. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína por unión a, en particular, los enlaces peptídicos desnaturalizados (--CONH) de la proteína. Además, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, así, prevenir o reducir la agregación e insolubilidad de proteínas.

Las especies iónicas se diferencian significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se han desarrollado varias clasificaciones categóricas de iones y sus efectos sobre las proteínas que se puede usar en la formulación de composiciones farmacéuticas según la invención. Un ejemplo es la serie de Hofmeister, que clasifica solutos iónicos y no iónicos polares por su efecto sobre la estabilidad conformacional de proteínas en disolución. Los solutos estabilizantes se denominan "cosmotrópicos". Los solutos desestabilizantes se denominan "caotrópicos". Los cosmótopos se usan comúnmente a altas concentraciones (por ejemplo, >1 molar de sulfato de amonio) para precipitar proteínas en disolución ("precipitación por salado"). Los caótopos se usan comúnmente para desnaturalizar y/o para solubilizar proteínas ("solubilización por salado"). La eficacia relativa de los iones para "solubilizar por salado" y "precipitar por salado" define su posición en la serie de Hofmeister.

Se pueden usar aminoácidos libres en el anticuerpo biespecífico de las formulaciones de la invención según diversas realizaciones de la invención como agentes de carga, estabilizadores y antioxidantes, así como otros usos estándar. Se pueden usar lisina, prolina, serina y alanina para la estabilización de proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para garantizar la correcta estructura y propiedades de la torta. La arginina puede ser útil para inhibir la agregación de proteínas, en tanto formulaciones líquidas como liofilizadas. La metionina es útil como un antioxidante.

Los polioles incluyen azúcares, por ejemplo, manitol, sacarosa y sorbitol y alcoholes polihidroxilados tales como, por ejemplo, glicerol y propilenglicol, y, para los fines de discusión en el presente documento, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son cosmotrópicos. Son agentes estabilizantes útiles en tanto formulaciones líquidas como liofilizadas para proteger las proteínas de los procesos de degradación física y química. Los polioles también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones. Entre los polioles útiles en las realizaciones seleccionadas de la invención está el manitol, comúnmente usado para garantizar la estabilidad estructural de la torta en formulaciones liofilizadas. Garantiza la estabilidad estructural a la torta. En general, se usa con un lioprotector, por ejemplo, sacarosa. El sorbitol y la sacarosa están entre los agentes preferidos para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para proteger contra las tensiones de liofilización durante el transporte o la preparación de masas durante el proceso de fabricación. Los azúcares reductores (que contienen grupos aldehído o cetona libres), tales como glucosa y lactosa, pueden glicar los restos superficiales de lisina y arginina. Por tanto, en general, no están entre los polioles preferidos para su uso según la invención. Además, los azúcares que forman dichas especies reactivas, tales como sacarosa, que se hidroliza a fructosa y glucosa en condiciones ácidas, y por consiguiente ocasionan la glucación, tampoco están entre los polioles preferidos de la invención a este respecto. El PEG es útil para estabilizar proteínas y como crioprotector y se puede usar en la invención a este respecto.

Las realizaciones del anticuerpo biespecífico de las formulaciones de la invención comprenden además tensioactivos. Las moléculas de proteínas pueden ser susceptibles a la adsorción sobre superficies y a la desnaturalización y consecuente agregación en interfase aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos, en general, aumentan inversamente con la concentración de proteína. Estas interacciones perjudiciales, en general, aumentan inversamente con la concentración de proteína y normalmente se agravan por agitación física, tal como la generada durante el transporte y la manipulación de un producto. Los tensioactivos se usan rutinariamente para

prevenir, minimizar o reducir la adsorción superficial. Los tensioactivos útiles en la invención a este respecto incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitano, y poloxámero 188.

5 Los tensioactivos también se usan comúnmente para controlar la estabilidad conformacional de proteínas. El uso de tensioactivos a este respecto es específico de proteínas puesto que, cualquier tensioactivo dado, normalmente estabilizará algunas proteínas y desestabilizará otras.

10 Los polisorbatos son susceptibles a la degradación oxidativa y frecuentemente, como se suministran, contienen cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de cadenas laterales de restos de proteínas, especialmente metionina. Por consiguiente, los polisorbatos se deben usar cuidadosamente, y cuando se usan, se deben emplear a su concentración eficaz más baja. A este respecto, los polisorbatos ejemplifican la regla general de que los excipientes se deben usar en sus concentraciones eficaces más bajas.

15 Las realizaciones del anticuerpo biespecífico de las formulaciones de la invención comprenden además uno o más antioxidantes. La oxidación de proteínas hasta cierto punto perjudicial se puede prevenir en formulaciones farmacéuticas manteniendo niveles apropiados de oxígeno y temperatura ambiente y evitando la exposición a la luz. Se pueden usar excipientes antioxidantes también para prevenir la degradación oxidativa de proteínas. Entre los antioxidantes útiles a este respecto están los agentes reductores, secuestrantes de oxígeno/radicales libres, y agentes quelantes. Los antioxidantes para su uso en formulaciones terapéuticas de proteínas según la invención son preferentemente solubles en agua y mantienen su actividad durante toda la estabilidad en almacén de un producto. EDTA es un antioxidante preferido según la invención a este respecto.

20 Los antioxidantes pueden dañar las proteínas. Por ejemplo, los agentes reductores, tales como glutatión en particular, pueden alterar los enlaces disulfuro intramoleculares. Así, los antioxidantes para su uso en la invención se seleccionan para, entre otras cosas, eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de que ellos mismos dañen las proteínas en la formulación.

25 Las formulaciones según la invención pueden incluir iones metálicos que son co-factores de proteína y que son necesarios para formar complejos de coordinación de proteínas, tales como cinc necesario para formar ciertas suspensiones de insulina. Los iones metálicos también pueden inhibir algunos procesos que degradan las proteínas. Sin embargo, los iones metálicos también catalizan procesos físicos y químicos que degradan proteínas. Se pueden usar iones magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización de ácido aspártico a ácido isoaspártico. Los iones Ca⁺² (hasta 100 mM) pueden aumentar la estabilidad de desoxirribonucleasa humana. Sin embargo, Mg⁺², Mn⁺² y Zn⁺² pueden desestabilizar la rhdNasa. Similarmente, Ca⁺² y Sr⁺² pueden estabilizar el factor VIII, pueden ser desestabilizados por Mg⁺², Mn⁺² y Zn⁺², Cu⁺² y Fe⁺², y su agregación se puede aumentar por iones Al⁺³.

35 Las realizaciones del anticuerpo biespecífico de las formulaciones de la invención comprenden además uno o más conservantes. Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales de múltiples dosis que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su función primaria es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad de producto durante toda la estabilidad en almacén o término de uso del medicamento. Los conservantes comúnmente usados incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso con moléculas parenterales pequeñas, el desarrollo de formulaciones de proteína que incluyen conservantes puede ser exigente. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto ha llegado a ser un factor importante en la limitación de su uso en formulaciones de proteína de múltiples dosis. Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos de proteína han sido formulados para uso individual solo. Sin embargo, cuando son posibles formulaciones de múltiples dosis, tienen la ventaja añadida de permitir conveniencia del paciente, y elevada capacidad de aceptación. Un buen ejemplo es el de la hormona de crecimiento humana (hGH) donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha conducido a una comercialización de presentaciones en pluma de inyección de múltiples usos más conveniente. Al menos cuatro de dichos dispositivos de pluma que contienen formulaciones conservadas de hGH están actualmente disponibles a la venta. La norditropina (líquida, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquida, Genentech) y Genotropin (liofilizada--cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol mientras que Somatropo (Eli Lilly) se formula con m-cresol. Se necesitan considerar varios aspectos durante la formulación y el desarrollo de formas farmacéuticas preservadas. Se debe optimizar la concentración eficaz de conservante en el medicamento. Esto requiere probar un conservante dado en la forma farmacéutica con intervalos de concentración que confieren eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de proteínas.

45 Como se podría esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más exigente que el de las formulaciones liofilizadas. Los productos liofilizados se pueden liofilizar sin el conservante y se reconstituyen con un conservante que contiene diluyente en el momento de uso. Esto acorta el tiempo durante el que un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados.

55 Con las formulaciones líquidas, se deben mantener la eficacia y estabilidad del conservante durante toda la estabilidad en almacén del producto (aproximadamente 18 a 24 meses). Un punto importante a observar es que la eficacia del conservante se debe demostrar en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes de excipiente.

El anticuerpo biespecífico de la invención se diseñará, en general, para vías y métodos específicos de administración, para dosificaciones de administración específicas y frecuencias de administración, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. Así, las formulaciones se pueden diseñar según la invención para la administración por cualquier vía adecuada, que incluye, pero no se limita a, por vía oral, por vía aural, por vía oftálmica, por vía rectal y por vía vaginal, y por vías parenterales, que incluyen inyección intravenosa e intrarterial, inyección intramuscular, e inyección subcutánea.

Una vez se ha formulado la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones se pueden almacenar o en una forma lista para uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración. La invención también proporciona kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits de la invención pueden cada uno contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína secada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En ciertas realizaciones de la presente invención, se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas individuales y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas líquidas y liojeringas). La cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico de la composición farmacéutica que contiene proteína de la invención a emplear dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiada para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que se usa el anticuerpo biespecífico de la invención, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de órgano) y/o condición (la edad y salud general) del paciente. En ciertas realizaciones, el profesional clínico puede ajustar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar desde aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En realizaciones específicas, la dosificación puede variar desde 1,0 µg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, opcionalmente desde 10 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg o desde 100 µg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg.

Una cantidad eficaz terapéutica de un anticuerpo biespecífico de la invención da preferentemente como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, aumento en la frecuencia o duración de los periodos sin síntomas de enfermedad o una prevención de la alteración o incapacidad debido al sufrimiento de la enfermedad. Para tratar tumores específicos que expresan la molécula de la superficie celular unida por el segundo dominio de unión del anticuerpo biespecífico de la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico de la invención, por ejemplo un anticuerpo biespecífico anti-molécula de la superficie celular/CD3, inhibe preferentemente el crecimiento celular o crecimiento tumoral en al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, o al menos aproximadamente 90 % con respecto a los pacientes no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar usando un dispositivo médico. Los ejemplos de dispositivos médicos para administrar las composiciones farmacéuticas se describen en las patentes de EE.UU. Nº 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447.233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; y 5.399.163.

Según una realización de la invención, el anticuerpo biespecífico de la invención, o el anticuerpo biespecífico producido según un método de la invención, es para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmunitaria.

También en una realización, la invención proporciona un kit que comprende una molécula de unión de la invención o producida según un método de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención, o una célula hospedadora de la invención.

Se debe entender que las invenciones en el presente documento no se limitan a metodología, protocolos o reactivos particulares, ya que tales pueden variar. La discusión y ejemplos proporcionados en el presente documento se presentan con el fin de describir realizaciones particulares solo y no pretenden limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Ejemplos:

Se proporcionan los siguientes ejemplos con el fin de ilustrar realizaciones específicas o características de la presente invención. Estos ejemplos no se deben interpretar para limitar el alcance de la presente invención. Los ejemplos están incluidos para los fines de ilustración, y la presente invención está limitada solo por las reivindicaciones.

Ejemplo 1 -

Producción y purificación de BiTE:

Se purificaron anticuerpos BiTE de sobrenadante de cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO) establemente transfectadas adaptadas a MTX 20 nM. Para generar un litro de sobrenadante para la purificación de construcciones de anticuerpo BiTE, se cultivaron las células en botellas rotatorias a una densidad celular de partida de 5×10^4 células por mL con medio de soja líquido HyQ PF CHO sin nucleósidos (con L-glutamina 4,0 mM y 0,1 % de Pluronic F-68; HyClone). Después del cambio de color del indicador de color añadido rojo de fenol de rojo a naranja, se prolongó el cultivo durante dos días más antes de la recogida. Se retiraron las células por centrifugación y se almacenó el sobrenadante que contenía la proteína expresada a -20 °C hasta la purificación de proteínas.

Se usaron Akta® Explorer Systems (GE Life Sciences) controlado por el software Unicorn® para la cromatografía. Se realizó cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) usando Fractogel EMD chelate® (Merck, Darmstadt) que se cargó con $ZnCl_2$ según el protocolo proporcionado por el fabricante. La columna se equilibró con tampón A (tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, NaCl 0,1 M, imidazol 10 mM) y se aplicó el sobrenadante de cultivo celular (1000 mL) a la columna (10 mL) a un caudal de 4 mL/min. Se lavó la columna con tampón A para retirar la muestra no unida. Se eluyó proteína unida usando un gradiente de dos etapas de tampón B (tampón fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, imidazol 0,5 M, pH 7,2) según el siguiente procedimiento:

Etapa 1: 10 % de tampón B en 5 volúmenes de columna

Etapa 2: 100 % de tampón B en 5 volúmenes de columna

Se muestra a modo de ejemplo un perfil de elución de la purificación de IMAC para un anticuerpo biespecífico SA-21-CEAxCD3 en la Figura 1.

Se reunieron fracciones de proteína eluida de la etapa 2 para purificación adicional y se concentraron hasta 3 mL de volumen final usando unidades de centrifugación Vivaspin (Sartorius-Stedim, Gottingen-Alemania) con membrana PES y un corte de peso molecular de 10 kDa. Todos los productos químicos fueron de calidad para investigación y se compraron de Sigma (Deisenhofen, Alemania) o Merck (Darmstadt, Alemania).

Se realizó cromatografía de exclusión por tamaño SEC en un columna de calidad preparativa HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Lifesciences) equilibrada con tampón de SEC (ácido cítrico 10 mM, lisina-HCl 75 mM, pH 7,2) a un caudal de 1 mL/min. Se reunieron las fracciones de monómero y dímero de anticuerpo BiTE y se añadió una disolución madre al 24 % de trehalosa para alcanzar una concentración de trehalosa final de 4 %. Se sometieron muestras de proteína eluida a SDS-PAGE reductora y transferencia Western anti-marca His para el análisis.

Se midieron los conjuntos de proteína de SEC (Conjunto_1 = fracciones de SEC reunidas que contienen la isoforma de proteína BiTE dimérica, Conjunto_2 = fracciones de SEC reunidas que contienen la proteína BiTE monomérica) para absorción de 280 nm en cubetas de policarbonato con 1 cm de paso de luz (Eppendorf, Hamburgo-Alemania) y se calculó la concentración de proteína en función del factor de análisis de proteínas NTI para cada proteína. Se muestra un perfil de SEC a modo de ejemplo para un anticuerpo biespecífico SA-21-CEAxCD3 en la Figura 2.

Tabla 2: Rendimiento de moléculas de unión monoméricas aisladas del sobrenadante de cultivo de células CHO que expresan establemente los anticuerpos biespecíficos identificados

Anticuerpo biespecífico	Dominio de unión de HSA	Rendimiento [$\mu\text{g/l}$ de sobrenadante de cultivo]
CD33 x CD3	SA21 de extremo N	1277
	SA21 de extremo C	72
CEA x CD3 + marca His	SA21 de extremo N	719
	SA21 de extremo C	255
CEA x CD3 + marca His	SA25 de extremo N	660
	SA25 de extremo C	38
CEA x CD3 sin marca His	SA21 de extremo N	761
	SA21 de extremo C	490

CEA x CD3 sin marca His	SA08de extremo N	1028
	SA08 de extremo C	216
CEA x CD3 sin marca His	SA25 de extremo N	981
	SA25 de extremo C	450

Ejemplo 2 -

Actividad citotóxica: Ensayo de liberación de cromo con linfocitos T humanos estimulados

Se obtuvieron linfocitos T estimulados enriquecidos para linfocitos T CD8⁺ como se describe a continuación:

5 Se recubrió una placa de Petri (145 mm de diámetro, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster) con un anticuerpo específico anti-CD3 comercialmente disponible (OKT3, Orthoclone) en una concentración final de 1 µg/mL durante 1 hora a 37 °C. Se retiró la proteína no unida por una etapa de lavado con PBS. Se añadieron 3-5 x 10⁷ CMSP humanas a la placa de Petri previamente recubierta en 120 mL de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / 10 % de FCS / IL-2 20 U/mL (Proleukin®, Chiron) y se estimuló durante 2 días. En el tercer día, se recogieron las células y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se añadió IL-2 a una concentración final de 20 U/mL y se cultivaron las células otra vez durante un día en el mismo medio de cultivo celular que antes.

Se enriquecieron linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) por agotamiento de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos NK CD56⁺ usando Dynal-Beads según el protocolo del fabricante.

15 Se lavaron las células diana CHO transfectadas con CD33 humana dos veces con PBS y se marcaron con 11,1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µL de RPMI con 50 % de FCS durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, se lavaron 3 veces con 5 mL de RPMI las células diana marcadas y luego se usaron en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 200 µL de RPMI complementado con una relación E:D de 10:1 en presencia de 10 % de HSA (albúmina humana, 20 %, CSL Behring GmbH: PZN-1468366). Se usó una concentración de partida de 0,01 - 1 µg/mL de anticuerpo biespecífico purificado y se usaron diluciones triples del mismo. El tiempo de incubación para el ensayo fue 18 horas. Se determinó la citotoxicidad como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante con respecto a la diferencia de lisis máximo (adición de Triton-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se llevaron a cabo por cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realizó en un contador gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Colonia, Alemania). El análisis de los resultados se llevó a cabo con Prism 5 para Windows (versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EE.UU.). Se usaron los valores de CE50 calculados por el programa de análisis de las curvas sigmoides de respuesta a dosis para la comparación de actividad citotóxica (véase la Figura 3).

Tabla de secuencias

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
1	SA08	artificial	nt	CAGGGCCTGATCGGGCAGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGG GGCGACTCCGTGAAA
2	SA08	artificial	aa	QGLIGDICLPRWGCLWGDSVK
3	SA21	artificial	nt	CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAG GACGAC
4	SA21	artificial	aa	RLIEDICLPRWGCLWEDD
5	SA25	artificial	nt	GAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTG GGAGGAC
6	SA25	artificial	aa	EDICLPRWGCLWED

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
7	SA21 x CD33 x I2C	artificial	nt	<p>CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAG GACGACCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGAGAGTCAGTCAAGGTCTCTGCAAGGCTAGCGGGTATACCTTCACA AACTATGGAATGAAC TGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTTAGAG TGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACCTATGCTGAT AAGTTCCAGGGACGCGTTACCATGACTACGGATACCTCTACCAGCACT GCCTATATGGAATCCGCAACCTCGGAGGTGATGACACGGCTGTATAT TACTGTGCGCCTGGAGTTGGAGT GATGGTTACTACGTTACTTTGAC TACTGGGGCCAAGGCACTTCGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGT TCTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTGACATCGT GATGACA CAGTCTCCAGACTCCCTGACTGTGTCTCTGGGCGAGAGGACCACCATC AACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGCTCCACGAATAAGA TCCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAATTACTC CTTTCTGGGCATCTACGCGGGAA TCCGGGATCCCTGACCGATTGAGT GGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATTGACAGCCCGCAG CCTGAAGATTCTGCAACTTACTATTTGTCAACAGTCTGCCCACTTCCCG ATCACCTTTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAATCCGGAGGTGGT GGATCCGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGCCT GGAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAAT AAGTACGCCATGAAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAA TGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATAT GCCGATTGAGTAAAGACAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTCAAAA AACACTGCCTATCTACAAATGAACAACTTGAAGACTGAGGACACTGCC GTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACTTCGGTAATAGCTACATATCC TACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAACGCTCTCCTCAGG GGTGGTGGTCTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTCAGACT GTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGGAAACAGTC ACACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTACATCTGGCAACTAC CCAAACTGGGTCCAACAAAACCAAGTCAAGCACCCCGTGGTCTAATA GGTGGGACTAAGTTCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTCTCAGGC TCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCA GAGGATGAGGCAGAAATATTACTGTCTTATGGTACAGCAACCGCTGG GTGTTCCGGTGGAGGAACCAACTGACTGTCTTACATCATCACCATCAT CAT</p>
8	SA21 x CD33 x I2C	artificial	aa	<p>RLIEDICLPRWGCLWEDDQVQLVQSGAEVVKPGE SVKVSCKRASGYFTT NYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADKPFQGRVTMTTDTSTST AYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWS DGYYVYFDYWQGT SVTVSSGGGG SGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQVLDSTNKN SLAWYQKPGQFPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSDTDFTLTIDSPQ PEDSATYYCQSAHFPITFGQGTREIKSGGGGSEVQLVDSGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYIS YWAYWGQGLLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGT VVTQEP SLTVSPGGTV TLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHH H</p>

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
9	CD33 x I2C x SA21	artificial	nt	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGAGAG</p> <p>TCAGTCAAGGTCTCCTGCAAGGCTAGCGGGTATACCTTCACAACTAT</p> <p>GGAATGAAGTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTAGAGTGGATG</p> <p>GGCTGGATAAACACCTTACACTGGAGAGCCAACTATGCTGATAAGTTC</p> <p>CAGGGACGGCTTACCATGACTACGGATACCTTACCAGCACTGCCTAT</p> <p>ATGGAAATCCGCAACCTCGGAGGTGATGACACGGCTGTATATTACTGT</p> <p>GCGCGCTGGAGTTGGAGTGTGGTTACTACGTTTACTTTGACTACTGG</p> <p>GGCCAAGGCACTTCGGTCAACGCTCCTCAGGTGGTGGTGGTTCTGGC</p> <p>GGCGGGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGACATCGTGATGACACAGTCT</p> <p>CCAGACTCCCTGACTGTGTCTCTGGGCGAGAGGACCACCATCAACTGC</p> <p>AAGTCCAGCCAGAGTGTTTAGACAGCTCCACGAATAAGAACTCCTTA</p> <p>GCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAATTACTCCTTTTC</p> <p>TGGGCATCTACGCGGGAATCCGGGATCCCTGACCGATTGAGTGGAGAG</p> <p>GGGCTCGGACAGATTTACTCTCCTACTATTGACAGCCCGCAGCCTGAA</p> <p>GATTCGCAACTTACTATTGTCAACAGCTGCCCCACTTCCCGATCACC</p> <p>TTTGGCCAAGGACACGACTGGAGATTAATCCGAGGTGGTGGATCC</p> <p>GAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGCCTGGAGGG</p> <p>TCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAATAAGTAC</p> <p>GCCATGAAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTT</p> <p>GCTCGCATAAGAAGTAAATAAATAATTATGCAACATATTATGCGGAT</p> <p>TCAGTGAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAAACACT</p> <p>GCCTATCTACAAATGAACAACTGAAGACTGAGGACACTGCCGTGTAC</p> <p>TACTGTGTGAGACATGGGAACTTCGGTAATAGCTACATATCCTACTGG</p> <p>GCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAACGCTCTCCTCAGGTGGTGGT</p> <p>GGTTCGGGGCGGGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTCAGACTGTGTGTG</p> <p>ACTCAGGAACCTTCACTCACCCTATCACCTGGTGGAAACAGTCACTC</p> <p>ACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTACATCTGGCAACTACCCAAAC</p> <p>TGGGTCCAACAAAAACCAGTTCAGGCACCCCGTGGTCTAATAGGTGGG</p> <p>ACTAAGTTCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTG</p> <p>CTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCAGAGGAT</p> <p>GAGGCAGAATATTACTGTGTCTATGGTACAGCAACCGCTGGGTGTTC</p> <p>GGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCTACGGCTGATCGAGGACATCTGC</p> <p>CTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGACGACCATCATCACCATCAT</p> <p>CAT</p>
10	CD33 x I2C x SA21	artificial	aa	<p>QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFITNYGMNWVKQAPGQGLEWM</p> <p>GWINTYTPGPTYADKFKQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYC</p> <p>ARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIVMTQS</p> <p>PDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLS</p> <p>WASTRESGI PDRFSGSGSGTDFLTITLDSPPQEDSATYYCQSAHPFIT</p> <p>FGQGTRELIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSLCAASGFTFNKY</p> <p>AMNWVRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT</p> <p>AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNGSYISYWAYWGQGLVTVVSSGGG</p> <p>GSGGGSGGGGQTVVTVQEP SLTVSPGGTVTLTSGSSTGAVTSGNYPN</p> <p>WVQQKPGQAPRGLIGGTFKLPAGTTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPED</p> <p>EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLRLLIEDICLPRWGCLWEDDHHHHH</p> <p>H</p>

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
11	SA21 x EpCAM x CD3	artificial	nt	<p>CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAG GACGACGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCTGACTGTGACA GCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTA AACAGTGGAAATCAAAGAAGTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCA GGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCT GGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGT CAGAA'TGATTATAGTTATCCGCTCACGTTTCGGTGCCTGGACCAAGCTT GAGATCAAAGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGCTCCGGTGGTGGT GGTTC'TGAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGG CCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCCTC ACTAACTACTGGCTAGGTTGGGTAAGCAGAGGCCCTGGACATGGACTT GAGTGGATTGGAGATATTTCCCTGGAAGTGGTAATATCCACTACAAT GAGAAGTTC'AAGGGCAAAGCCACACTGACTGCAGACAAAATCTTCGAGC ACAGCCTATATGCAGCTCAGTAGCCTGACATTTGAGGACTCTGCTGTC TATTTCTGTGCAAGACTGAGGAACGGGACGAGCCTATGGACTACTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCCGGAGGTGGTGGCTCCGAC GTCCAAGTGGTGCAGTCAGGGGCTGAAGTGAAAAAACCTGGGGCTCA GTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACG</p> <p>ATGCACCTGGGTAAGGCAGGCACCTGGACAGGCTCTGGAATGGATTGGA TACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATACGCAGACAGCGTCAAG GGCCGCTTCACAATCACTACAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATG GAACTGAGCAGCCTGCGTTCTGAGGACACTGCAACCTATTACTGTGCA AGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACC ACGGTCAACCGTCTCCTCAGGCGAAGGTACTAGTACTGGTCTGTTGGA AGTGGAGGTTTCAAGTGGAGCAGACGACATTTGACTGACCCAGTCTCCA GCAACTCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGCGTGCCACCCTGAGCTGCAGA GCCAGTCAAAGTGTAAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCGGGC AAGGCACCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAGTGGCTTCTGGA GTCCCTGTCTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCGACTACTCTC ACAATCAACAGCTTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAA CAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGTGGCGGGACCAAGGTGGAG ATCAAACATCATCACCATCATCAT</p>
12	SA21 x EpCAM x CD3	artificial	aa	<p>RLIEDICLPRWGCLWEDDELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFT LTISGVQAEEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGSGGG GSEVQLLEQSGAELVIRPQTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKRQRPQHGL EWIGDIFPGSGNIHYNEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSTLFEDSAV YFCARLRNWDEPMDYWCQCTTVTVSSCGGSDVQLVQSGAEVKKPKCAS VKVSCASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYSVSK GRFTIITDKSTSTAYMELSLRSEDTATYCYARYDDHYCLDYWGQGT TVTIVSSGEGTSTGSGGSGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQSVSYMNWYQQKPKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSL TINSLEAEDAATYYCQQWSNPLTGGGTVEIKHHHHHH</p>

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
13	EpCAM x CD3 x SA21	artificial	nt	GAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA TCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGA GAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGT GGAAATCAAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAG CCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTC CCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGAAT GATTATAGTTATCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTTGAGATC AAAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGGCGCGCTCCGGTGGTGGTGGTCT GAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGG ACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCCTTCACTAAC TACTGGCTAGGTTGGGTAAGCAGAGGCCCTGGACATGGACTTGAGTGG ATTGGAGATATTTCCCTGGAAGTGGTAATATCCACTACAATGAGAAG TTCAAGGGCAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCTTCGAGCACAGCC TATATGCAGCTCAGTAGCCTGACATTTGAGGACTCTGCTGTCTATTTTC TGTGCAAGACTGAGGAACTGGGACGAGCCTATGGACTACTGGGGCCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCCGGAGTGGTGGCTCCGACGTCCAA CTGGTGCAGTCAGGGCTGAAGTGA AAAAACCTGGGGCTCAGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACTAGGTACACGATGCAC TGGGTAAAGCAGGCCACTGGACAGGCTCTGGAATGGATTGGATACATT AATCCTAGCCGTGGTTATACTAATACGCAGACAGCGTCAAGGGCCCG TTCACAATCACTACAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACG AGCAGCTGCGTTCTGAGGACACTGCAACCTATTACTGTGCAAGATAT TATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCCACAGGTC ACCGTCTCCTCAGGGCAAGGTAAGTACTAGTACTGGTCTGGTGAAGTGG GGTTCAGGTGGAGCAGACGACATTTGACTGACCCAGTCTCCAGCAACT CTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGCGTGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGT CAAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCGGGCAAGGCA CCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCACTGGCAGTGGTCTGGGACCGACTACTCTCTCACAATC AACAGCTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACAGTGG AGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGTGGCGGGACCAAGGTGGAGATCAA CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGGAG GACGACCATCATCACCATCATCAT
14	EpCAM x CD3 x SA21	artificial	aa	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQ PEKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVVQAE DLAVYYCQN DYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSEVQLLEQSGAELVRPG TSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPFGHLEWIGDIFPGSGNIHYNEK FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT FEDSAVYFCARLRNWDPEMDYWGQ GTTVTVSSGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRITM WVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTHYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMEL SSLRSEDATATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTITVTVSSGEGTSTGSGGSG GGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSYMHWYQQRPGKA PKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSDYSLTINSLEAEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIKRLIEDICLPRWGCLWEDDHHHHHH

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
15	SA21 x CEA x I2C	artificial	nt	<p>CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAG GACGACCAGGCGGTGCTGACTCAGCGGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCT GGAGCATCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTGGCGAGGGGCATCAATGTT GGTGCCTACAGTATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCTCCC CAGTATCTCCTGAGGTACAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCT GGAGTCTCCAGCCGCTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCA GGGATTTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTAT TACTGTATGATTTGGCACAGCGCCGCTTCTGCGGTGTTTCGGCGGAGGG ACCAAGTTGACCGTCTAGGTGGTGGTGGTCTGGCGCGCGGGCTCC GGTGGTGGTGGTCTGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT ACCGTCAGTAGCTACTGGATGCACCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAATGGGTAGGTTTCATTAGAAACAAGCTAATGGTGGGACA ACAGAATACGCCGCTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGAT GATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCCGTGTATTAAGTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTCTAC TTGACTACTGGGGCCAAGGACACGGTACCGTCTCCTCATCCGGA GGTGGTGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTG CAGCCTGGAGGGTCATTGAAACTTCATGTGCAGCCTCTGGATTACC TTCAATAAGTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGT TTGGAATGGTGGTTCGCTCGCATAGAAGTAAATATAATAAATATGCAACA TATTATGCCGATTCAAGTGAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGAT TCAAAAACACTGCCTATCTACAAATGAACAACCTGAAGACTGAGGAC ACTGCCGTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACCTCGGTAATAGCTAC ATATCCTACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTACCCGCTCC TCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGCGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTCT CAGACTGTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGG ACAGTCACACTCACTTGTGGCTCCCGACTGGGGCTGTTACATCTGG AACTACCCAAACTGGGTCCAACAAAACCAGGTCAGGCACCCCGTGGT CTAATAGGTGGGACTAAGTTCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTC TCAGGCTCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCCCTCAGGGGTA CAGCCAGAGGATGAGGCAGAAATTAAGTGTGTTCTATGGTACAGCAAC CGCTGGGTGTTGGTGGAGGAACCAACTGACTGTCTCATCATCATCAC CATCATCAT</p>
16	SA21 x CEA x I2C	artificial	aa	<p>RLIEDICLPRWGLWEDDQAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINV GAYSIYVYQKPGSPPOYLLRYKSDSDKQQSGVSSRFSASKDASANA GILLISGLQSEDEADYCMWHSGASAVFGGGTKLTVLGGGGGGGGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTVSSYMMHWVRQAPGK GLEWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLRAE DTAVVYCARDRLRPFYFDYWGQTTVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGSLLKLSCAASGFTFNKYAMNWRVQAPGKLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVVYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQTLVTVSSGGGGGGGGGGGGQTVVVTQEPVSLTVSPGG TVTLTCSSTGAVTSGNYPHWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARF SGSLLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYCVLWYVNRWVFGGGTKLTVLHHH HHH</p>

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
17	CEA x I2C x SA21	artificial	nt	<p>CAGGCCGTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCA TCAGCCAGTCTCACCCTGCACCTTGGCGAGGGGCATCAATGTTGGTGCC TACAGTATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCCTCCCAGTAT CTCCTGAGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCTGGAGTC TCCAGCCGCTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCAGGGATT TTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGT ATGATTPGGCACAGCGGCGCTTCTGCGGTGTTCCGCGGAGGGACCAAG TTGACCGTCCTAGGTGGTGGTGGTCTGGCGCGCGCGCTCCGGTGGT GGTGGTTCAGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCGTC AGTAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAATGGGTAGGTTTCATTAGAAACAAGCTAATGGTGGGACAACAGAA TACGCCGCTCTGTGAAAGGCAGATTACCCATCTCAAGAGATGATTCC</p> <p>AAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTGATTA TACTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTTC TACTTTGAC TACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCATCCGGAGGTGGT GGCTCCGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGCCT GGAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAAT AAGTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAA TGGTTGGCTCGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTAT GCCGATTCAGTGAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAA AACACTGCCTATCTACAAATGAACAACTGAAGACTGAGGACACTGCC GTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACTTCGGTAATAGCTACATATCC TACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT GGTGGTGGTCTGGCGGGCGCGCTCCGGTGGTGGTGGTCTCAGACT GTTGTGACTCAGGAACTTCACTCACCGTATCACCTGGTGGAAACAGTC ACACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTACATCTGGCAACTAC CCAAACTGGGTCCAACAAAACAGGTCAAGGCACCCCGTGGTCTAATA GGTGGGACTAAGTTCCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTCTCAGGC TCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCA GAGGATGAGGCAGAATATTACTGTGTCTATGGTACAGCAACCGCTGG GTGTTCCGGTGGAGGAACCAACTGACTGTCTACGGCTGATCGAGGAC ATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGACGACCATCATCAC CATCATCAT</p>
18	CEA x I2C x SA21	artificial	aa	<p>QAVLTQFASLSASPGASASLTCTLLRRGINVGAISYIYWYQKPGSPPOY LLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC MIWHS GASAVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGRSLRLS CAASGFTVSSYWMHWVRQAPKRGLEWVGFIRNKANGGTE YAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARDRLRFYFD YWGQGTIVTVSSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWRQAPKRGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLTVTVSSG GGSGGGSGGGGSGTQVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGTRFLAPGTPARFSGSLGKKAALTLGSGVQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLRLIEDICLPRWGCLWEDD HHHHH</p>

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
19	SA25 x CEA x I2C	artificial	nt	<p>GAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGACCAGGCC GTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCATCAGCC AGTCTCACCTGCACCTTGGCAGGGGCATCAATGTTGGTGCCTACAGT ATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCCTCCCAGTATCTCTTG AGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCTGGAGTCTCCAGC CGTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCAGGGATTTTACTC ATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTATGATT TGGCACAGCGCGCTTCTGCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACC GTCCTAGGTGGTGGTGGTTCGGCGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGT TCTGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTCTGGATTACCGTCACTAGC TACTGGATGCACTGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAGGGGCTGGATGG GTAGGTTTCATTAGAAAACAAGCTAATGGTGGGACAACAGAATACGCC GCGTCTGTGAAAGGCAGATTCAACATCTCAAGAGATGATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTTCCTACTTTGACTACTGG GGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCATCCGAGGTGGTGGCTCC GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGCCTGGAGGG TCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATAAGTAC GCCATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTT GCTCGATAAGAAGTAAATAATAAATTAATGCAACATATATGCGGAT TCAGTGAAGACAGGTTCAACATCTCCAGAGATGATTCAAAAAACACT GCCTATCTACAAATGAACAACTTGAAGACTGAGGACACTGCCGTGTAC TACTGTGTGACACATGGGAACCTTCGGTAATAGCTACATATCCTACTGG GCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTACCGTCTCCTCAGGTGGTGGT GGTTCGGCGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCAGACTGTGTGTG ACTCAGGAACCTTCACTACCGTATCACCTGGTGGAACAGTCACTC ACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTTTACATCTGGCAACTACCCAAAC TGGGTCCAACAAAACCAGGTCAGGCACCCCGTGGTCTAATAGTGGG ACTAAGTTCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATCTCAGGCTCCCTG CTTGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCAGAGGAT</p> <p>GAGGCAGAATATTACTGTGTCTATGGTACAGCAACCGCTGGGTGTTT GGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCTA CATCATCACCATCATCAT</p>
20	SA25 x CEA x I2C	artificial	aa	<p>EDICLPRWGLWEDQAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVAYS IYWYQKPGSPPYLLRYKSDSDKQGGVSSRFSASKDASANAGILL ISGLQSEDEADYYCMIWHSASAVFGGKLTVLGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGRGLEW VGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLRAEDTAV YYCARDRLRFYFDYWCQCTTVTVSSSCGGGSEVQLVESGCCLVQPCG SLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNPMSYISY AYWQGGLVTVVSSGGGSGGGSGGGGQTVVVTQEPVSLVSPGGVTVL TCGSSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSL LGGKAAALTLQVQPEDEAEYCVLWYSNRVWVFGGKLTVLHHHHHH</p>

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
21	CEA x I2C x SA25	artificial	nt	CAGGCCGTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCA TCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTGGCGAGGGGCATCAATGTGGTGCC TACAGTATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCCTCCCAGTAT CTCCTGAGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCTGGAGTC TCCAGCCGCTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCAGGGATT TTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGT ATGATTTGGCACAGCGGGCTTCTGCGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAG TTGACCGTCCTAGGTGGTGGTGGTCTGCGCGCGCGGCTCCGGTGGT GGTGGTTCTGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCCTGC AGTAGCTACTGGATGCACTGGGTCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAATGGTAGGTTTCATTAGAAACAAGCTAATGGTGGGACAACAGAA TACGCCGCTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCC AAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAG GCCGTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTCTACTTTGAC TACTGGGGCCAAGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCATCCGGAGGTGGT GGCTCCGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGCCT GGAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAAT AAGTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTGGAA TGGGTGTCTCCGATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTAT GCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCACCATCTCCAGAGATGATTCAAAA AACACTGCCTATCTACAAATGAACAACCTGAAGACTGAGGACACTGCC GTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACTTCGGTAATAGCTACATATCC TACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTACCCTCTCCTCAGGT GGTGGTGGTTCTGGCGCGCGCGCTCCGGTGGTGGTGGTCTCAGACT GTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGGAACAGTC ACACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTTACATCTGGCAACTAC CCAAACTGGGTCCAACAAAACCAGGTCAGGCACCCCGTGGTCTAATA GGTGGGACTAAGTTCCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTCTCAGGC TCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCA GAGGATGAGGCAGAATATTACTGTGTTCTATGGTACAGCAACCCTGG GTGTTCCGGTGGAGGAACCAACTGACTGTCTTAGAGGACATCTGCCTG CCCAGATGGGCTGCCTGTGGGAGGAC CATCATCACCATCATCAT
22	CEA x I2C x SA25	artificial	aa	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGYYSIYWYQKPGSPPQY LLRYKSDSDKQGGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC MIWHS GASAVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKLEWVGFIRNKANGGTE YAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRLRFYFD YWGQGTITVTVSSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNMLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSG GGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPAREFSGSLGGKAALTLGSGVQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGTKLTVLEDICLPRWGCLWEDHHHHHH

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
23	SA08 x CEA x I2C	artificial	nt	<p>CAGGGCTGATCGGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGTGCCTGTGG GGCGACTCCGTGAAACAGGCCGTGCTGACTCAGCCGGCTFCCCTCTCT GCATCTCCTGGAGCATCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTGGCGAGGGG ATCAATGTTGGTGCCTACAGTATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGG AGTCCCTCCCCAGTATCTCCTGAGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAG CAGGGCTCTGGAGTCTCCAGCCGCTTCTCTGCATCCAAGATGCTTCG GCCAATGCAGGGATTTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAG</p> <p>GCTGACTATTACTGTATGATTTGGCACAGCGCGCTTCTGCGGTGTTT GGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCTAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGC GGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGG GGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCGTCACTAGCTACTGGATGCAGTGGGTCCGCCAAGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTAGGTTTCATTAGAAACAAAGCTAAT GGTGGGACAACAGAAATACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATC TCAAGAGATGATTCGAAGAACAGCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGCCGCTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGGGGCTA CGGTTCTACTTTGACTACTGGGGCAAGGGACCACGGTCCCGTCTCC TCATCCGGAGGTGGTGGTCCGAGGTGCAGCTGGTCCAGTCTGAGGGA GGATTGGTGCAGCCTGGAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCT GGATTCACCTTCAATAAGTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGAAAGGGTTTGGAAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAATATAATAAT TATGCAACATATTATGCCGATTCACTGAAAGACAGGTTCCACCATCTCC AGAGATGATTCAAAAAACACTGCCTATCTACAAATGAACAACCTTGAAG ACTGAGGACACTGCCGTGTAATACTGTGTGAGACATGGGAACCTTCGGT AATAGTACATATCCTACTGGGCTTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGCGCGGGTCCCGTGGT GGTGGTTCTCAGACTGTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCA CCTGGTGGAAACAGTCACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTT ACATCTGGCAACTACCCAACTGGGTCCAACAAAACCAGGTACAGGCA CCCCGTGGTCTAATAGGTGGGACTAAGTTCTCGCCCCGGTACTCCT GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTC TCAGGGGTACAGCCAGAGGATGAGGCAGAAATATTACTGTGTTCTATGG TACAGCAACCGCTGGGTGTTCCGGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCTCA CATCATCACCATCATCAT</p>
24	SA08 x CEA x I2C	artificial	aa	<p>QGLIGDICLPRWGCLWGDVSKQAVLTQPAKLSASPGASASLTCTLRRG INVGAYSIIYWYQKPGSPQYLLRYKSDSDKQSGVSSRFSASKDAS ANAGILLISGLQSEDEADYICMIWHSASAVFGGKTCLTVLGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQFGRSLRLSCLASGFTVSSYWMHWVRQA PGKLEWVGFIRNKANGGTEYAAAVKGRFTISRDDSKNTLYLQMSL RAEDTAVYYCARDRLRFYFDYWGQGTITVTVSSSGGGSEVQLVESGG GLVQPGSLKLSCLASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSTVTVTQEPSTVVS PGGTVTLTCSSTGAVTSNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTP ARFSGLLGKKAALTLVSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVL HHHHH</p>

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
25	SA21 x CEA x I2C H0	artificial	nt	<p>CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAG GACGACCAGGCGGTGCTGACTCAGCGGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCT GGAGCATCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTGGCGCAGGGGCATCAATGTT GGTGCCTACAGTATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCCTCC CAGTATCTCCTGAGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCT GGAGTCTCCAGCCGCTTCTCTGCA TCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCA GGGATTTTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTAT TACTGTATGATTTGGCACAGCGCCGCTTCTGCGGTGTTCCGGCGAGGG ACCAAGTTGACCGTCTTAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGGCGGGCTCC GGTGGTGGTGGTCTGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT ACCGTCAGTAGCTACTGGATGCAC TGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAATGGGTAGGTTTCATTAGAAACAAAGCTAATGGTGGGACA ACAGAATACGCCGCTCTGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAAGAT GATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCCGTGTATTA CTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTTCTAC TTTGACTACTGGGGCCAAGGACCACGGTCACCGTCTCCTCATCCGGA GGTGGTGGTCCGAGGTGCAGCTGGTCCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTG CAGCCTGGAGGGTCATTGAAACTTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCC TTCAA TAAGTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGT TTGGAATGGGTGCTCGCATAAGAAGTAAATATAATAATATGCAACA TATTATGCCGATTTCAGTGAAGACAGGTTTACCATCTCCAGAGATGAT TCAAAAACACTGCCTATCTACAAATGAACA ACTTGAAGACTGAGGAC ACTGCCGTGTACTACTGTGTGAGACATGGGA ACTTCGGTAATAGCTAC ATATCCTACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTACCCTCTCC</p> <p>TCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTCT CAGACTGTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGGA ACAGTCACACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTTACATCTGGC AACTACCCAAACTGGGTCCAACAAAACCAGGTCAGGCACCCCGTGGT CTAATAGGTGGGACTAAGTTCCCTCGCCCCCGGTA CTCTGCCAGATT TCAGGCTCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGA CAGCCAGAGGATGAGGCAGAAATTA CTGTGTTCTATGGTACAGCAAC CGCTGGTGTTCGGTGGAGGAACCAACTGACTGTCCCTA</p>
26	SA21 x CEA x I2C H0	artificial	aa	<p>RLIEDICLPRWGCLWEDDQAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRGINV GAYSIYWYQQKPGSPPPQYLLRYKSDSKQQGSGVSSRFSASKDASANA GILLISGLQSEDEADYICMIWHSASAVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS GGGGSSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLS CAASGFTVSSYMMHWVRQAPGK GLEWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDRLRFYFDYWGQCTTVTVSSCGCCSEVQLVESGCLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFNGSY ISYWAYWQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVVTQEP SLTVSPGG TVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARF SGSLLGKKAALTL SGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGKTLTVL</p>

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
27	CEA x I2C x SA21 H0	artificial	nt	CAGGCCGTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCA TCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTGCGCAGGGGCATCAATGTTGGTGCC TACAGTATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCTCCCCAGTAT CTCCTGAGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCTGGAGTC TCCAGCCGCTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCAGGGATT TTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGT ATGATTTGGCACAGCGGGCTTCTGCGGTGTTGGCGGAGGGACCAAG TTGACCGTCCTAGGTGGTGGTGGTCTGCGCGCGCGGCTCCGGTGGT GGTGGTTCTGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCCGTC AGTAGTACTGGATGCACTGGGTCGCGCAAGCTCCAGGGGAGGGGCTG GAATGGGTAGGTTTCATTAGAAACAAGCTAATGGTGGGACAACAGAA TACGCCGCTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCC AAGAACACCGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAG GCCGTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTCTACTTTGAC TACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACGCTCCTCATCCGGAGGTGGT GGCTCCGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGCCT GGAGGGTCAATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAAT AAGTAGCCCATGAACCTGGGTCGCGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTGGAA TGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTAT GCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCCACCATCTCCAGAGATGATTCAAAA AACACTGCCTATCTACAAATGAACAACCTGAAGACTGAGGACACTGCC GTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACTTCGGTAATAGCTACATATCC TACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAACGCTCCTCAGGT GGTGGTGGTTCTGGCGCGCGCGCTCCGGTGGTGGTGGTCTCAGACT GTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGAACAGTC ACACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTTACATCTGGCAACTAC CCAAACTGGGTCCAACAAAACCAGGTCAGGCACCCCGTGGTCTAATA GGTGGGACTAAGTTCCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTCTCAGGC TCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCA GAGGATGAGGCAGAATATTACTGTGTTCTATGGTACAGCAACCCTGG GTGTTCCGGTGGAGGACCAACTGACTGTCTACGGCTGATCGAGGAC ATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGACGAC
28	CEA x I2C x SA21 H0	artificial	aa	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGYYSIYWYQKPGSPPQY LLRYKSDSDKQGGSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC MIWHSASAVFPGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKLEWVGFIRNKANGGTE YAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRLRFYFD YWGQGTITVTVSSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSG GGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPAREFSGSLLGGKAALTLGSGVQ EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGTKLTVLRLIEDICLPRWGLWEDD

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
29	SA25 x CEA x I2C H0	artificial	nt	GAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGACCAGGCC GTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCATCAGCC ACTCTCACCTGCACCTTGGCGAGGGGCATCAATGTTGGTGCCTACAGT ATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCCTCCCCAGTATCTCCTG AGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCTGGAGTCTCCAGC CGCTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCAGGGATTTTACTC ATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTATGATT TGGCACAGCCGGCTTCTGCGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACC GTCCTAGGTGGTGGTGGTCTGGCGCGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGT TCTGAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCGTCAGTAGC TACTGGATGCAGTGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGG GTAGGTTTCATTAGAAACAAGCTAATGGTGGGACAACAGAATACGCC CGCTCTGTGAAAGGCAGATTCAACATCTCAAGAGATGATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTTCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTCTACTTTGACTACTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCATCCGGAGGTGGTGGTCC GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGAGGATGGTGCAGCCTGGAGGG TCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAATAAGTAC GCCATGAACGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTT GCTCGCATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTATGCCGAT TCAGTGAAGACAGGTTCAACATCTCCAGAGATGATTCAAAAAACACT GCCTATCTACAAATGAACAACTTGAAGACTGAGGACACTGCCGTGTAC TACTGTGTGAGACATGGGAACCTCGGTAATAGCTACATATCCTACTGG GCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGTGGT GGTTCGGCGCGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTCAGACTGTGTGTG ACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGGAAACAGTCACTC ACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTACATCTGGCAACTACCCAAAC TGGGTCCAACAAAAACCAGGTCAGGCACCCCGTGGTCTAATAGGTGGG ACTAAGTTCTCGCCCCCGTACTCCTGCCAGATCTCAGGCTCCCTG CTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCAGAGGAT GAGGCAGAATATTACTGTGTCTATGGTACAGCAACCCGCTGGGTGTTC GGTGGAGGAACCAACTGACTGTCCTA
30	SA25 x CEA x I2C H0	artificial	aa	EDICLPRWGLWEDQAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVAYS IYWYQQKPGSPPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGILL ISGLQSEDEADYICMIWHSASAVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWRQAPGKGLEW VGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAV YYCARDRLRFYFDYWGQGTTVTVSSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGFNGNSYISYW AYWQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTIVL TCGSSITGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSL LGGKAALTLQVPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
31	CEA x I2C x SA25 H0	artificial	nt	<p>CAGGCCGTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCA TCAGCCAGTCTCACCCTGCACCTTGGCAGGGGCATCAATGTTGGTGCC TACAGTATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCCTCCCAGTAT CTCCTGAGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCTGGAGTC TCCAGCCGCTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCAGGGATT TTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGT ATGATTTGGCACAGCGGGCTTCTGCGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAG TTGACCGTCCTAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGT GGTGGTTCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCAACGTC AGTAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAATGGGTAGGTTTCATTAGAAACAAGCTAATGGTGGGACAACAGAA TACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCC AAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGCACCG GCCGTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTTC TACTTTGAC TACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCATCCGGAGGTGGT GGCTCCGAGGTGCAGCTGGTCCAGTCTGGAGGAGGATTTGGTGCAGCCT GGAGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAAT AAGTACGCCATGAAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAA TGGGTTGCTCGCATAAGAAATAATAATAATAATTATGCAACATATTAT GCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAA AACACTGCCTATCTACAAATGAACAACCTGAAGACTGAGGACACTGCC</p> <p>GTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACCTTCGGTAATAGTACATATCC TACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGT GGTGGTGGTCTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTCAGACT GTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGGAAACAGTC ACACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTTACATCTGGCAACTAC CCAACTGGGTCCAACAAAACAGGTCAGGCACCCCGTGGTCTAATA GGTGGGACTAAGTTCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTCTCAGGC TCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCA GAGGATGAGGCAGAAATATTACTGTGTCTATGGTACAGCAACCCGCTGG GTGTTCCGGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCTAGAGGACATCTGCCTG CCCAGATGGGCTGCCTGTGGGAGGAC</p>
32	CEA x I2C x SA25 H0	artificial	aa	<p>QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIIYWYQKPGSPPPQY LLRYKSDSDKQGGSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC MIWHSASAVFEGGKLTVLGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKLEWVGFIRNKANGGTE YAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRLRFYFD YWGQGTITVTVSSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNHWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNILKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWGGTLVTVSSG GGSGGGSGGGGQTVVTVQEPSTVSPGGTVTLTGGSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGTFELAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSSGVQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKLTVLEDICLPRWGLWED</p>

ES 2 753 950 T3

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
33	SA08 x CEA x I2C H0	artificial	nt	<p>CAGGGCCTGATCGGGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGG GGCGACTCCGTGAAACAGGCCGTGTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCT GCATCTCCTGGAGCATCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTGCGCAGGGG ATCAATGTTGGTGGCTACAGTATACTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGG AGTCCCTCCCCAGTATCTCCTGAGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAG CAGGGCTCTGGAGTCTCCAGCCGCTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCG GCCAATGCAGGGATTTTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAG GCTGACTATTACTGTATGATTTGGCACAGCGGGCTTCTGCGGTGTTT GGCGGAGGGACCAAGTTGACCGCTCCTAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGC GGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGG GGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTACCCGTGAGTACTGACTGGATGCAGTGGGTCCGCCAGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTAGGTTTATTAGAAACAAAGCTAAT GGTGGGACAACAGAAATACGCCGCTTCTGTGAAAGGCAGATTCACATC TCAAGAGATGATTCCAAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTAAGTGTGCAAGAGATAGGGGGCTA CGGTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCCCGTCTCC TCATCCGAGGTTGGTGGTCCGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGA GGATTGGTGCAGCCTGGAGGTCATGAAACTCTCATGTGCAGCCTCT GGATTACCTTCAATAAGTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGGTCTGCATGAAGTAAATATAATAAT TATGCAACATATTATGCCGATTGAGTGAAGACAGGTTCCACATCTCC AGAGATGATTCAAAAAACTGCTTATCTACAAATGAACAACCTGAAAG ACTGAGGACTGCGGTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACTTCGGT AATAGCTACATATCCTACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGT GGTGGTCTCAGACTGTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCCTATCA CCTGGTGGAAACAGTCACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTT ACATCTGGCAACTACCCAACTGGGTCCAAACAAAACCAGGTCCAGGCA CCCCGTGGTCTAATAGGTGGGACTAAGTTCCTCGCCCCGGTACTCCT GCCAGATTCTCAGGCTCCCTGCTTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCCCTC TCAGGGGTACAGCCAGAGGATGAGGCAGAAATTAAGTGTGTCTATGG TACAGCAACCCTGGGTGGTGGTGGAGGAAACAACTGACTGTCTCTA</p>
34	SA08 x CEA x I2C H0	artificial	aa	<p>QGLIGDICLPRWGLWGDVSKQAVLTQPAASLSASPGASASLTCTLRRG INVGAYSIIYWYQKPGSPPYLLRYKSDSDKQQSGSVSSRFSASKDAS ANAGILLISGLQSEDEADYCMIIWHSASAVFGGGKLTVLGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQA PGKLEWVGFIRNKANGGTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSL RAEDTAVYYCARDRLRFYFDYWGQGTTVTVSSSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVTVQEPSLTVS</p> <p>PGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKLTVL</p>

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
35	CEA x I2C x SA08 H0	artificial	nt	CAGGCCGTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCA TCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTGCGCAGGGGCATCAATGTGGTGCC TACAGTATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCCTCCCAGTAT CTCCTGAGGTACAAATCAGACTCAGATAAGCAGCAGGGCTCTGGAGTC TCCAGCCGCTTCTCTGCATCCAAAGATGCTTCGGCCAATGCAGGGATT TTACTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGT ATGATTTGGCACAGCGGGCTTCTGCGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAG TTGACCGTCCTAGGTGGTGGTGGTTCTGCGCGCGCGGCTCCGGTGGT GGTGGTTCTGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAG CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCAACGTC AGTAGCTACTGGATGCACTGGGTCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAATGGGTAGGTTTCATTAGAAACAAGCTAATGGTGGGACAACAGAA TACGCCGCTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCC AAGAACAACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGGGGCTACGGTTCCTACTTTGAC TACTGGGGCCAAGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCATCCGGAGGTGGT GGTCCGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGCCT GGAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAAT AAGTACGCCATGAACCTGGGTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTGGAA TGGGTGTGCTCCGATAAGAAGTAAATATAATAATTATGCAACATATTAT GCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCCACCATCTCCAGAGATGATTCAAAA AACACTGCCTATCTACAAATGAACAACCTGAAGACTGAGGACACTGCC GTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACCTTCGGTAATAGCTACATATCC TACTGGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGT GGTGGTGGTTCTGGCGCGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTCAGACT GTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGGAACAGTC ACACTCACTTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTTACATCTGGCAACTAC CCAAACTGGGTCCAACAAAACAGGTCAGGCACCCCGTGGTCTAATA GGTGGGACTAAGTTCCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTCTCAGGC TCCCTGCTTGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCA GAGGATGAGGCAGAATATTACTGTGTTCTATGGTACAGCAACCGCTGG GTGTTCCGGTGGAGGAACCAACTGACTGTCTACAGGGCTGATCGGC GACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGGCGACTCCGTGAAA
36	CEA x I2C x SA08 H0	artificial	aa	QGLIGDICLPRWGCLWGDVSKQAVLTQPAASLSASPGASASLTCTLRRG INVGAYSIIYWYQKPGSPQYLLRYKSDSKQQSGVSSRFSASKDAS ANAGILLISGLQSEDEADYCMIIWHSASAVFVGGTCLTVLGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQA PGKGLEWVGFIRNKANGGTTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLS RAEDTAVYYCARDRLRFYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNHWVRQAPGKLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTIVTQEPSLTVS PGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPHWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTP ARFSGSLLGKAAALTLGVPQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTCLTVL QGLIGDICLPRWGCLWGDVSK
37	Extremo N de CD3ε	humana	aa	QDQNE

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amgen Research (Munich) GmbH

5 <120> Moléculas de unión monocatenarias que comprenden ABP del extremo N

<130> MIM14740PCT

<150>US 61/792.073

10 <151> 15-03-2013

<160> 37

ES 2 753 950 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 63

5

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> SA08

10

<400> 1

```
cagggcctga tgggcgacat ctgcctgcc agatggggct gcctgtgggg cgactccgtg 60
aaa 63
```

15

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> SA08

<400> 2

```
Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15
```

25

```
Gly Asp Ser Val Lys
20
```

<210> 3

<211> 54

<212> ADN

30

<213> artificial

<220>

<223> SA21

ES 2 753 950 T3

<400> 3

cggtgatcg aggacatctg cctgcccaga tggggctgcc tgtgggagga cgac 54

<210> 4

5 <211> 18

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> SA21

<400> 4

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15

Asp Asp

15

<210> 5

<211> 42

<212> ADN

<213> artificial

20

<220>

<223> SA25

<400> 5

25 gaggacatct gcctgccag atggggctgc ctgtgggagg ac 42

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> SA25

ES 2 753 950 T3

<400> 6

Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
 1 5 10

5 <210> 7

<211> 1587

<212> ADN

<213> artificial

10 <220>

<223> SA21 x CD33 x I2C

<400> 7

15	cggctgatcg aggacatctg cctgcccaga tggggctgcc tgtgggagga cgaccaggtg cagctggtgc agtctggagc tgaggtgaag aagcctggag agtcagtcaa ggtctcctgc aaggctagcg ggtatacctt cacaaactat ggaatgaact gggatgaagca ggctccagga cagggttttag agtggatggg ctggataaac acctacactg gagagccaac ctatgctgat aagtccagg gacgcgttac catgactacg gatacctta ccagcactgc ctatatggaa atccgcaacc tcggaggtga tgacacggct gtatattact gtgcgcgctg gaggttggagt gatggttact acgtttactt tgactactgg ggccaaggca cttcggtcac cgtctcctca	60 120 180 240 300 360 420
----	--	--

ES 2 753 950 T3

```

ggtaggtggtg gttctggcgg cggcggctcc ggtggtggtg gttctgacat cgtgatgaca      480
cagtctccag actccctgac tgtgtctctg ggcgagagga ccaccatcaa ctgcaagtcc      540
agccagagtg ttttagacag ctccacgaat aagaactcct tagcttggtgta ccagcagaaa      600
ccaggacagc ctccctaaatt actcctttcc tgggcatcta cgcgggaatc cgggatccct      660
gaccgattca gtggcagcgg gtctgggaca gatttcactc tcaactattga cagcccgcag      720
cctgaagatt ctgcaactta ctattgtcaa cagtctgccc acttcccgat cacctttggc      780
caagggacac gactggagat taaatccgga ggtggtggat ccgaggtgca gctggtcgag      840
tctggaggag gattggtgca gcctggaggg tcattgaaac tctcatgtgc agcctctgga      900
ttcaccttca ataagtacgc catgaactgg gtccgccagg ctccaggaaa gggtttgaa      960
tgggttgctc gcataagaag taaatataat aattatgcaa catattatgc cgattcagtg     1020
aaagacaggt tcaccatctc cagagatgat tcaaaaaaca ctgcctatct acaaatgaac     1080
aacttgaaga ctgaggacac tgccgtgtac tactgtgtga gacatggga cttcggtaat     1140
agctacatat cctactgggc ttactggggc caagggactc tggtcaccgt ctctcaggt     1200
ggtggtggtt ctggcggcgg cggctccggt ggtggtggtt ctcagactgt tgtgactcag     1260
gaaccttcac tcaccgtatc acctggtgga acagtcacac tcaactgtgg ctctcogact     1320
gggctgtta catctggcaa ctaccctaac tgggtccaac aaaaaccagg tcaggcaccc     1380
cgtggtctaa taggtgggac taagttcctc gccccggta ctctgccag attctcaggc     1440
tcctcgcttg gaggcaaggc tgccctcacc ctctcagggg tacagccaga ggatgaggca     1500
gaatattact gtgttctatg gtacagcaac cgtcgggtgt tcgggtggagg aaccaactg     1560
actgtcctac atcatcacca tcatcat                                     1587

```

<210> 8

<211> 529

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> SA21 x CD33 x I2C

10

<400> 8

```

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1           5           10           15

Asp Asp Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
                20           25           30

Gly Glu Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
          35           40           45

```

ES 2 753 950 T3

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

Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr
 85 90 95

Ala Tyr Met Glu Ile Arg Asn Leu Gly Gly Asp Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Ser Trp Ser Asp Gly Tyr Tyr Val Tyr Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr
 145 150 155 160

Gln Ser Pro Asp Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly Glu Arg Thr Thr Ile
 165 170 175

Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asp Ser Ser Thr Asn Lys Asn
 180 185 190

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 195 200 205

Leu Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Pro Gln
 225 230 235 240

Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ala His Phe Pro
 245 250 255

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 275 280 285

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn
 290 295 300

ES 2 753 950 T3

Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
305 310 315 320

Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
325 330 335

Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
340 345 350

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
355 360 365

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser
370 375 380

Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr
405 410 415

Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val
420 425 430

Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr
435 440 445

Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile
450 455 460

Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly
465 470 475 480

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

Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp
500 505 510

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His His His His His
515 520 525

His

<210> 9

<211> 1587

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

ES 2 753 950 T3

<223> CD33 x I2C x SA21

<400> 9

caggtgcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggagagtc	agtcaaggtc	60
tcctgcaagg	ctagcgggta	taccttcaca	aactatggaa	tgaactgggt	gaagcaggct	120
ccaggacagg	gttttagagt	gatgggctgg	ataaacacct	acactggaga	gccaacctat	180
gctgataagt	tccagggacg	cgttaccatg	actacggata	cctctaccag	cactgcctat	240
atggaaatcc	gcaacctcgg	aggtgatgac	acggctgtat	attactgtgc	gcgctggagt	300
tggagtgatg	gttactacgt	ttactttgac	tactggggcc	aaggcacttc	ggtcaccgtc	360
tcctcagggtg	gtggtgggtc	tggcggcgcc	ggtccgggtg	gtggtgggtc	tgacatcggtg	420
atgacacagt	ctocagactc	cctgactgtg	tctctgggcg	agaggaccac	catcaactgc	480
aagtccagcc	agagtgtttt	agacagctcc	acgaataaga	actccttagc	ttggtaccag	540
cagaaaccag	gacagcctcc	taaattactc	ctttcctggg	catctacgcg	ggaatccggg	600
atccctgacc	gattcagtg	cagcgggtct	gggacagatt	tcactctcac	tattgacagc	660
ccgcagcctg	aagattctgc	aacttactat	tgtcaacagt	ctgcccactt	cccgatcacc	720
tttgccaag	ggacacgact	ggagattaaa	tccggagggtg	gtggatccga	ggtgcagctg	780
gtcagagtctg	gaggaggatt	ggtgcagcct	ggagggtcat	tgaaactctc	atgtgcagcc	840
tctggattca	ccttcaataa	gtacgccatg	aactgggtcc	gccaggctcc	aggaaagggt	900
ttggaatggg	ttgctcgcat	aagaagtaaa	tataataatt	atgcaacata	ttatgccgat	960
tcagtgaaag	acaggttcac	catctccaga	gatgattcaa	aaaacactgc	ctatctacaa	1020
atgaacaact	tgaagactga	ggacactgcc	gtgtactact	gtgtgagaca	tgggaacttc	1080
ggtaatagct	acatatccta	ctgggcttac	tggggccaag	ggactctggt	caccgtctcc	1140
tcaggtgggtg	gtggttctgg	cggcggcgcc	tccggtgggtg	gtggttctca	gactgttgtg	1200
actcaggaac	cttactcac	cgtatcacct	ggtggaacag	tcacactcac	ttgtggctcc	1260
tcgactgggg	ctgttacatc	tggcaactac	ccaaactggg	tccaacaaaa	accaggtcag	1320
gcaccccgtg	gtctaataag	tgggactaag	ttcctcgccc	ccggtactcc	tgccagattc	1380
tcaggctccc	tgcttggagg	caaggctgcc	ctcaccctct	caggggtaca	gccagaggat	1440
gaggcagaat	attactgtgt	tctatggtac	agcaaccgct	gggtgttcgg	tggaggaacc	1500
aaactgactg	tcctacggct	gatcgaggac	atctgcctgc	ccagatgggg	ctgcctgtgg	1560
5	gaggacgacc	atcatcacca	tcatcat			1587

<210> 10

<211> 529

<212> PRT

<213> artificial

10

ES 2 753 950 T3

<220>

<223> CD33 x I2C x SA21

<400> 10

5

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Ile Arg Asn Leu Gly Gly Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
 130 135 140

Pro Asp Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly Glu Arg Thr Thr Ile Asn Cys
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asp Ser Ser Thr Asn Lys Asn Ser Leu
 165 170 175

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Leu Ser
 180 185 190

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 195 200 205

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Pro Gln Pro Glu
 210 215 220

ES 2 753 950 T3

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

ES 2 753 950 T3

cggtgatcg aggacatctg cctgcccaga tggggctgcc tgtgggagga cgacgagctc 60
 gtgatgacac agtctccatc ctccctgact gtgacagcag gagagaaggt cactatgagc 120
 tgcaagtcca gtcagagtct gttaaacagt gaaatcaaa agaactactt gacctggtac 180
 cagcagaaac cagggcagcc tcctaaactg ttgatctact gggcatccac tagggaatct 240
 ggggtccctg atcgcttcac aggcagtgga tctggaacag atttactct caccatcagc 300
 agtgtgcagg ctgaagacct ggcagtttat tactgtcaga atgattatag ttatccgctc 360
 acgttcggtg ctgggaccaa gcttgagatc aaagtggtg gtggttctgg cggcggcggc 420
 tccggtggtg gtggttctga ggtgcagctg ctgagcagct ctggagctga gctggttaagg 480
 cctgggactt cagtgaagat atcctgcaag gcttctggat acgccttcac taactactgg 540
 ctaggttggg taaagcagag gcctggacat ggacttgagt ggattggaga tattttccct 600
 ggaagtggta atatccacta caatgagaag ttcaagggca aagccacact gactgcagac 660
 aaatcttcga gcacagccta tatgcagctc agtagcctga catttgagga ctctgctgtc 720
 tattttctgtg caagactgag gaactgggac gagcctatgg actactgggg ccaagggacc 780
 acggtcaccg tctcctccgg aggtggtggc tccgacgtcc aactggtgca gtcaggggct 840
 gaagtgaaaa aacctggggc ctcagtgaag gtgtcctgca aggcttctgg ctacaccttt 900
 actaggtaca cgatgcactg ggtaaggcag gcacctggac agggctctgga atggattgga 960
 tacattaatc ctagccgtgg ttataactaat tacgcagaca gcgtcaaggg ccgcttcaca 1020
 atcactacag acaaatccac cagcacagcc tacatggaac tgagcagcct gcgttctgag 1080
 gacactgcaa cctattactg tgcaagatat tatgatgatc attactgcct tgactactgg 1140
 ggccaaggca ccacggtcac cgtctcctca ggcgaaggta ctagtactgg ttctggtgga 1200
 agtggagggt caggtggagc agacgacatt gtactgacct agtctccagc aactctgtct 1260
 ctgtctccag gggagcgtgc caccctgagc tgcaagacca gtcaaagtgt aagttacatg 1320
 aactggtacc agcagaagcc gggcaaggca cccaaaagat ggatttatga cacatccaaa 1380
 gtggcttctg gagtccctgc tcgcttcagt ggcagtgggt ctgggaccga ctactctctc 1440
 acaatcaaca gcttggaggc tgaagatgct gccacttatt actgccaaaca gtggagtagt 1500
 aaccgctca cgttcgggtg cgggaccaag gtggagatca aacatcatca ccatcatcat 1560

<210> 12

5 <211> 520

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> SA21 x EpCAM x CD3

<400> 12

ES 2 753 950 T3

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr
 20 25 30

Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 35 40 45

Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

ES 2 753 950 T3

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
145 150 155 160

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
165 170 175

Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn
195 200 205

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val
225 230 235 240

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr Trp
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
260 265 270

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
275 280 285

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr
290 295 300

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
305 310 315 320

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
325 330 335

Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
340 345 350

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
355 360 365

Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
370 375 380

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly
385 390 395 400

ES 2 753 950 T3

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 405 410 415

Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 420 425 430

Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 435 440 445

Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly
 450 455 460

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu
 465 470 475 480

Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 485 490 495

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
 500 505 510

Ile Lys His His His His His His
 515 520

<210> 13

<211> 1560

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> EpCAM x CD3 x SA21

10

<400> 13

gagctogtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300

ccgctcacgt tgggtgctgg gaccaagctt gagatcaaag gtgggtgtgg ttctggcggc 360

ggcggtccg gtgggtgtgg ttctgaggtg cagctgctcg agcagtctgg agctgagctg 420

gtaaggcctg ggacttcagt gaagatatcc tgcaaggctt ctggatacgc cttcactaac 480

tactggctag gttgggtaaa gcagaggcct ggacatggac ttgagtggat tggagatatt 540

ttccctggaa gtggtaatat ccactacaat gagaagttca agggcaaagc cacactgact 600

ES 2 753 950 T3

gcagacaaat cttcgagcac agcctatatg cagctcagta gcctgacatt tgaggactct 660
gctgtctatt tctgtgcaag actgaggaac tgggacgagc ctatggacta ctggggccaa 720
gggaccacgg tcaccgtctc ctccggagggt ggtggctccg acgtccaact ggtgcagtca 780
ggggctgaag tgaaaaaacc tggggcctca gtgaagggtgt cctgcaaggc ttctggctac 840
acctttacta ggtacacgat gcactgggta aggcaggcac ctggacaggg tctggaatgg 900
attggataca ttaatcctag ccgtggttat actaattacg cagacagcgt caagggccgc 960
ttcacaatca ctacagacaa atccaccagc acagcctaca tggaactgag cagcctgcgt 1020
tctgaggaca ctgcaacctt ttactgtgca agatattatg atgatcatta ctgccttgac 1080
tactggggcc aaggcaccac ggtcaccgtc tcctcaggcg aaggtactag tactggttct 1140
ggtggaagtg gaggttcagc tggagcagac gacattgtac tgaccagtc tccagcaact 1200
ctgtctctgt ctccagggga gcgtgccacc ctgagctgca gagccagtca aagtgtaagt 1260
tacetgaact ggtaccagca gaagccgggc aaggcaccca aaagatggat ttatgacaca 1320
tccaaagtgg cttctggagt ccctgctcgc ttcagtggca gtgggtctgg gaccgactac 1380
tctctcacia tcaacagctt ggaggtgaa gatgctgcca cttattactg ccaacagtgg 1440
agtagtaacc cgctcacgtt cgggtggcggg accaagggtg agatcaaacg gctgatcgag 1500
gacatctgcc tgcccagatg gggctgcctg tgggaggagc accatcatca ccatcatcat 1560

<210> 14

<211> 520

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> EpCAM x CD3 x SA21

10

<400> 14

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

ES 2 753 950 T3

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

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

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

Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn
145 150 155 160

Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys
180 185 190

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
195 200 205

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

Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 950 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 500 505 510

Asp Asp His His His His His His
 515 520

<210> 15

<211> 1593

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> SA21 x CEA x I2C

10

<400> 15

ES 2 753 950 T3

cggetgatcg aggacatctg cctgcccaga tggggctgcc tgtgggagga cgaccaggcc 60
 gtgctgactc agccggcttc cctctctgca tctcctggag catcagccag tctcacctgc 120
 accttgcgca ggggcatcaa tgttgggtgcc tacagtatat actggtacca gcagaagcca 180
 gggagtcttc cccagtatct cctgaggtag aatcagact cagataagca gcagggtctc 240
 ggagtctcca gccgcttctc tgcattccaaa gatgcttcgg ccaatgcagg gattttactc 300
 atctctgggc tccagtctga ggatgaggct gactattact gtatgatttg gcacagcggc 360
 gcttctgcgg tgttcggcgg agggaccaag ttgaccgtcc taggtggtgg tggttctggc 420
 ggcggcggct ccggtggtgg tggttctgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcttg 480
 gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cgtcagtagc 540
 tactggatgc actgggtccg ccaagctcca ggaaggggc tggaatgggt aggtttcatt 600
 agaaacaaag ctaatggtgg gacaacagaa tacgccgct ctgtgaaagg cagattcacc 660
 atctcaagag atgattccaa gaacacgctg tatcttcaaa tgaacagcct gagagccgag 720
 gacacggccg tgtattactg tgcaagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 780
 ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca tccggagggt gtggctccga ggtgcagctg 840
 gtcgagtctg gaggaggatt ggtgcagcct ggagggtcat tgaaactctc atgtgcagcc 900
 tctggattca ccttcaataa gtacgccatg aactgggtcc gccaggctcc aggaagggt 960
 ttggaatggg ttgctcgcac aagaagtaa tataataatt atgcaacata ttatgccgat 1020
 tcagtgaaag acaggttcac catctccaga gatgattcaa aaaacactgc ctatctacaa 1080
 atgaacaact tgaagactga ggacactgcc gtgtactact gtgtgagaca tgggaacttc 1140
 ggtaatagct acatattccta ctgggcttac tggggccaag ggactctggt caccgtctcc 1200
 tcagggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggtggtg gtggttctca gactgttgtg 1260
 actcaggaac cttcactcac cgtatcacct ggtggaacag tcacactcac ttgtggctcc 1320
 tcgactgggg ctgttacatc tggcaactac ccaaaactgg tccaacaaaa accagggtcag 1380
 gcaccccggtg gtctaatag tgggactaag ttctctgccc ccggtactcc tgccagattc 1440
 tcaggctccc tgcttgagg caaggctgcc ctaccctct caggggtaca gccagaggat 1500
 gaggcagaat attactgtgt tctatggtac agcaaccgct ggggttctcg tggaggaacc 1560
 aaactgactg tctacatca tcaccatcat cat 1593

<210> 16

5 <211> 531

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> SA21 x CEA x I2C

ES 2 753 950 T3

<400> 16

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

ES 2 753 950 T3

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 275 280 285

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 290 295 300

Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 305 310 315 320

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 325 330 335

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 340 345 350

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp
 355 360 365

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
 370 375 380

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 405 410 415

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 420 425 430

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
 435 440 445

Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 450 455 460

Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 465 470 475 480

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
 485 490 495

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
 500 505 510

Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His His His
 515 520 525

His His His
 530

<210> 17

5

<211> 1593

ES 2 753 950 T3

<212> ADN

<213> artificial

<220>

5

<223> CEA x I2C x SA21

<400> 17

caggccgtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgcatctc ctggagcacc agccagtctc 60
acctgcacct tggcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120
aagccagggg gtccctccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180
ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240
ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300
agcggcgctt ctgcggtgtt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtgt 360
tctggcggcg gcggtctccg tgggtggtgt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420
ggcttgggtc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccgtc 480
agtagctact ggatgcactg ggtccgcca gctccagga aggggctgga atgggtaggt 540
ttcattagaa acaaagctaa tgggtgggaca acagaatacg ccgctctgt gaaaggcaga 600
ttcaccatct caagagatga ttccaagaac acgctgtatc ttcaaatgaa cagcctgaga 660
gccgaggaca cggcctgtg ttactgtgca agagataggg ggctacggtt ctactttgac 720
tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctcatccg gaggtggtgg ctccgaggtg 780
cagctgggtc agtctggagg aggattggtg cagcctggag ggtcattgaa actctcatgt 840
gcagcctctg gattcacctt caataagtac gccatgaact gggctcccca ggctccagga 900
aagggtttgg aatgggttgc tcgcataaga agtaaataa ataattatgc aacatattat 960
gccgattcag tgaaagacag gttcaccatc tccagagatg attcaaaaa cactgcctat 1020
ctacaaatga acaacttgaa gactgaggac actgccgtgt actactgtgt gagacatggg 1080
aacttoggta atagctacat atcctactgg gcttactggg gccagggac tctggtcacc 1140
gtctcctcag gtggtggtgg ttctggcggc ggcggctccg gtggtggtgg ttctcagact 1200
gttgtgactc aggaacctc actcaccgta tcacctggtg gaacagtcac actcacttgt 1260
ggctcctcga ctggggctgt tacatctggc aactaccca actgggtcca acaaaaacca 1320
ggtcaggcac cccgtggtct aataggtggg actaagttcc tcgcccccg tactcctgcc 1380
agattctcag gctcctgct tggaggcaag gctgccctca cctctcagg ggtacagcca 1440
gaggatgagg cagaatatta ctgtgttota tggtagagca accgctgggt gttcgggtgga 1500
ggaaccaaac tgactgtcct acggtgatc gagacatct gcctgccag atggggctgc 1560
ctgtgggagg acgaccatca tcaccatcat cat 1593

10

ES 2 753 950 T3

<210> 18

<211> 531

<212> PRT

<213> artificial

5

<220>

<223> CEA x I2C x SA21

<400> 18

10

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

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

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

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu

ES 2 753 950 T3

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

ES 2 753 950 T3

Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile
435 440 445

Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly
450 455 460

Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro
465 470 475 480

Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp
485 490 495

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Leu Ile Glu Asp
500 505 510

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp His His His
515 520 525

His His His
530

<210> 19

<211> 1581

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> SA25 x CEA x I2C

10

<400> 19

ES 2 753 950 T3

gaggacatct gcctgccag atggggctgc ctgtgggagg accaggccgt gctgactcag 60
 ccggcttccc tctctgcac tcctggagca tcagccagtc tcacctgcac cttgcgcagg 120
 ggcataaatg ttggtgccta cagtataatac tggtagcagc agaagccagg gactcctccc 180
 cagtatctcc tgaggtacaa atcagactca gataagcagc agggctctgg agtctccagc 240
 cgcttctctg catccaaaga tgcttcggcc aatgcaggga ttttactcat ctctgggctc 300
 cagtctgagg atgaggctga ctattactgt atgatttggc acagcggcgc ttctgagggtg 360
 ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta ggtggtggtg gttctggcgg cggcggctcc 420
 ggtggtggtg gttctgaggt gcagctggtc gactctgggg gaggcttggg ccagcctggg 480
 aggtccctga gactctcctg tgcagcgtct ggattcaccg tcagtagcta ctggatgcac 540
 tgggtccgcc aagctccagg gaaggggctg gaatgggtag gtttcattag aaacaaagct 600
 aatggtggga caacagaata cgccgcgtct gtgaaaggca gattcaccat ctcaagagat 660
 gattccaaga acacgctgta tcttcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggccgtg 720
 tattactgtg caagagatag ggggctacgg ttctactttg actactgggg ccaagggacc 780
 acggtcaccg tctcctcatc cggaggtggt ggctccgagg tgcagctggt cgagtctgga 840
 ggaggattgg tgcagcctgg aggtcattg aaactctcat gtgcagcctc tggattcacc 900
 ttcaataagt acgccatgaa ctgggtccgc caggctccag gaaagggttt ggaatggggt 960
 gctcgcataa gaagtaaata taataattat gcaacatatt atgccgattc agtgaagac 1020
 aggttcacca tctccagaga tgattcaaaa aacctgcct atctacaaat gaacaacttg 1080
 aagactgagg aactgccgt gtactactgt gtgagacatg ggaacttcgg taatagctac 1140
 atatcctact gggcttactg gggccaaggg actctggtca ccgtctcctc aggtggtggt 1200
 ggtctctggcg gggcgggctc cgggtggtggt ggttctcaga ctggttgtag tcaaggaacct 1260
 tcaactcaccg taccactgg tggaacagtc aactcactt gtggctcctc gactggggct 1320
 gttacatctg gcaactacc aaactgggtc caacaaaaac caggctcaggc acccctgggt 1380
 ctaatagggtg ggactaagtt cctcgcccc ggtactcctg ccagattctc aggtccctg 1440
 cttggaggca aggtgcctc caccctctca ggggtacagc cagaggatga ggcagaatat 1500
 tactgtgttc tatggtacag caaccgctgg gtgttcgggt gaggaaccaa actgactgtc 1560
 ctacatcatc accatcatca t 1581

<210> 20

5 <211> 527

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> SA25 x CEA x I2C

ES 2 753 950 T3

<400> 20

Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Gln Ala
1 5 10 15

Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala
20 25 30

Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser
35 40 45

Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu
50 55 60

Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu
85 90 95

ES 2 753 950 T3

Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile
100 105 110

Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
115 120 125

Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser
165 170 175

Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
180 185 190

Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala
195 200 205

Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn
210 215 220

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
260 265 270

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
275 280 285

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
290 295 300

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
305 310 315 320

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
325 330 335

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
340 345 350

ES 2 753 950 T3

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
355 360 365

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
370 375 380

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val
405 410 415

Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu
420 425 430

Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn
435 440 445

Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly
450 455 460

Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu
465 470 475 480

Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp
485 490 495

Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe
500 505 510

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His His His His His His
515 520 525

<210> 21

<211> 1581

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> CEA x I2C x SA25

10

<400> 21

ES 2 753 950 T3

caggcogtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc 60
 acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120
 aagccagggg gtcctcccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180
 ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240
 ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300
 agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagttga ccgctcctagg tgggtggtggt 360
 tctggcggcg gcggctcccg tgggtggtggt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420
 ggcttgggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccgtc 480
 agtagctact ggatgcactg ggtccgcca gctccagggg aggggctgga atgggtaggt 540
 ttattagaa acaaagctaa tgggtgggaca acagaatacg cgcgctctgt gaaaggcaga 600
 ttcaccatct caagagatga ttccaagaac acgctgtatc ttcaaatgaa cagcctgaga 660
 gccgaggaca cggccgtgta ttactgtgca agagataggg ggctacggtt ctactttgac 720
 tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc tcctcatccg gaggtggtgg ctccgagggt 780
 cagctggtcg agtctggagg aggattggtg cagcctggag ggtcattgaa actctcatgt 840
 gcagcctctg gattcacctt caataagtac gccatgaact gggctccgca ggctccagga 900
 aagggtttgg aatgggttgc tgcataaga agtaaataa ataattatgc aacatattat 960
 gccgattcag tgaaagacag gttcaccatc tccagagatg attcaaaaaa cactgcctat 1020
 ctacaaatga acaactttaa gactgaggac actgccgtgt actactgtgt gagacatggg 1080
 aacttcggta atagctacat atcctactgg gcttactggg gccaaaggac tctggtcacc 1140
 gtctcctcag gtggtggtgg ttctggcggc ggcggctccg gtggtggtgg ttctcagact 1200
 gttgtgactc aggaacctc actcacctga tcacctgggt gaacagtcac actcacttgt 1260
 ggctcctcga ctggggctgt tacatctggc aactacccaa actgggtcca acaaaaacca 1320
 ggtcaggcac cccgtggtct aataggtggg actaagttcc tcgccccggg tactcctgcc 1380
 agattctcag gctccctgct tggaggcaag gctgccctca ccctctcagg ggtacagcca 1440
 gaggatgagg cagaatatta ctgtgttcta tggtagagca accgctgggt gttcgggtgga 1500
 ggaaccaaac tgactgtcct agaggacatc tgcctgcca gatggggctg cctgtgggag 1560
 gaccatcatc accatcatca t 1581

<210> 22

5 <211> 527

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> CEA x I2C x SA25

ES 2 753 950 T3

<400> 22

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

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

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

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn
275 280 285

ES 2 753 950 T3

Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 290 295 300

Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
 305 310 315 320

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

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 340 345 350

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser
 355 360 365

Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 370 375 380

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr
 385 390 395 400

Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val
 405 410 415

Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr
 420 425 430

Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile
 435 440 445

Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 450 455 460

Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro
 465 470 475 480

Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp
 485 490 495

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Asp Ile Cys Leu
 500 505 510

Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp His His His His His His
 515 520 525

<210> 23

<211> 1602

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

ES 2 753 950 T3

<223> SA08 x CEA x I2C

<400> 23

cagggcctga	tggcgacat	ctgcctgcc	agatggggct	gcctgtgggg	cgactccgtg	60
aaacaggccg	tgctgactca	gccggcttcc	ctctctgcat	ctcctggagc	atcagccagt	120
ctcacctgca	ccttgccgag	gggcatcaat	gttggtgcct	acagtatata	ctggtaccag	180
cagaagccag	ggagtccctc	ccagtatctc	ctgaggtaca	aatcagactc	agataagcag	240
cagggctctg	gagtctccag	ccgcttctct	gcatccaaag	atgcttcggc	caatgcaggg	300
atcttactca	tctctgggct	ccagtctgag	gatgaggctg	actattactg	tatgatttgg	360
cacagcggcg	cttctgcggt	gttcggcgga	gggaccaagt	tgaccgtcct	aggtggtggt	420
ggttctggcg	gcggcggctc	cggtggtggt	ggttctgagg	tgcagctggt	cgagtctggg	480
ggagccttgg	tccagcctgg	gaggtccctg	agactctcct	gtgcagcgtc	tggattcacc	540
gtcagtagct	actggatgca	ctgggtccgc	caagctccag	ggaaggggct	ggaatgggta	600
ggtttcatta	gaaacaaagc	taatggtggg	acaacagaat	acgcccgctc	tgtgaaaggc	660
agattcacca	tctcaagaga	tgattccaag	aacacgctgt	atcttcaaat	gaacagcctg	720
agagccgagg	acacggccgt	gtattactgt	gcaagagata	gggggctacg	gttctacttt	780
gactactggg	gccaagggac	cacggtcacc	gtctcctcat	ccggaggtgg	tggctccgag	840
gtgcagctgg	tcgagtctgg	aggaggattg	gtgcagcctg	gagggtcatt	gaaactctca	900
tgtgcagcct	ctggattcac	cttcaataag	tacgccatga	actgggtccg	ccaggtcca	960
ggaaaggggt	tggaatgggt	tgctcgcata	agaagtaaat	ataataatta	tgcaacatat	1020
tatgccgatt	cagtgaaaga	caggttcacc	atctccagag	atgattcaaa	aaacactgcc	1080
tatctacaaa	tgaacaactt	gaagactgag	gacactgccg	tgtactactg	tgtgagacat	1140
gggaacttcg	gtaatagcta	catatcctac	tgggcttact	ggggccaagg	gactctggtc	1200
accgtctcct	caggtggtgg	tggttctggc	ggcggcggtc	ccgggtggtg	tggttctcag	1260
actgttgtga	ctcaggaacc	ttcactcacc	gtatcacctg	gtggaacagt	cacactcact	1320
tgtggctcct	cgactggggc	tgttacatct	ggcaactacc	caaactgggt	ccaacaaaaa	1380
ccaggtcagg	caccccgtgg	tctaataagg	gggactaagt	tcctcgcccc	cggtactcct	1440
gccagattct	caggctccct	gcttgagggc	aagctgccc	tcaccctctc	aggggtacag	1500
ccagaggatg	aggcagaata	ttactgtggt	ctatggtaca	gcaaccgctg	ggtgttcggg	1560
5	ggaggaacca	aactgactgt	cctacatcat	caccatcatc	at	1602

<210> 24

<211> 534

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 753 950 T3

<220>

<223> SA08 x CEA x I2C

<400> 24

5

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Val Lys Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly
 35 40 45

Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln
 65 70 75 80

Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser
 85 90 95

Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu
 100 105 110

Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe
 115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175

Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala
 180 185 190

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn
 195 200 205

Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile

ES 2 753 950 T3

210	215	220													
Ser 225	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys 230	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu 235	Gln	Met	Asn	Ser	Leu 240
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr 245	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys 250	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly 255	Leu
Arg	Phe	Tyr	Phe 260	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln 265	Gly	Thr	Thr	Val	Thr 270	Val	Ser
Ser	Ser	Gly 275	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu 280	Val	Gln	Leu	Val	Glu 285	Ser	Gly	Gly
Gly 290	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly 295	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
Gly 305	Phe	Thr	Phe	Asn	Lys 310	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp 315	Val	Arg	Gln	Ala	Pro 320
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu 325	Trp	Val	Ala	Arg	Ile 330	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn 335	Asn
Tyr	Ala	Thr	Tyr 340	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val 345	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr 350	Ile	Ser
Arg	Asp	Asp 355	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala 360	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn 365	Asn	Leu	Lys
Thr 370	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr 375	Tyr	Cys	Val	Arg	His 380	Gly	Asn	Phe	Gly
Asn 385	Ser	Tyr	Ile	Ser	Tyr 390	Trp	Ala	Tyr	Trp	Gly 395	Gln	Gly	Thr	Leu	Val 400
Thr	Val	Ser	Ser	Gly 405	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 410	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 415	Gly
Gly	Gly	Ser	Gln 420	Thr	Val	Val	Thr	Gln 425	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr 430	Val	Ser
Pro	Gly	Gly 435	Thr	Val	Thr	Leu	Thr 440	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr 445	Gly	Ala	Val
Thr 450	Ser	Gly	Asn	Tyr	Pro	Asn 455	Trp	Val	Gln	Gln	Lys 460	Pro	Gly	Gln	Ala

ES 2 753 950 T3

Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro
465 470 475 480

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu
485 490 495

Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp
500 505 510

Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
515 520 525

His His His His His His
530

<210> 25

<211> 1575

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> SA21 x CEA x I2C H0

10

<400> 25

ES 2 753 950 T3

cggtgatcg aggacatctg cctgcccaga tggggctgcc tgtgggagga cgaccaggcc 60
 gtgctgactc agccggcttc cctctctgca tctcctggag catcagccag tctcacctgc 120
 accttgcgca ggggcatcaa tgttggtgcc tacagtatat actggtacca gcagaagcca 180
 gggagtcttc cccagtatct cctgaggtac aaatcagact cagataagca gcagggtctt 240
 ggagtctcca gccgcttctc tgcattccaaa gatgcttcgg ccaatgcagg gattttactc 300
 atctctgggc tccagtctga ggatgaggct gactattact gtatgatttg gcacagcggc 360
 gcttctgcgg tgttcggcgg agggaccaag ttgaccgtcc taggtggtgg tggttctggc 420
 ggcggcggct ccggtggtgg tggttctgag gtgcagctgg tcgagtctgg gggaggcttg 480
 gtccagcctg ggaggctcct gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cgtcagtagc 540
 tactggatgc actgggtccg ccaagctcca ggaaggggc tggaatgggt aggtttcatt 600
 agaaacaaag ctaatggtgg gacaacagaa tacgccgct ctgtgaaagg cagattcacc 660
 atctcaagag atgattccaa gaacacgctg tatcttcaaa tgaacagcct gagagccgag 720
 gacacggccg tgtattactg tgcaagagat agggggctac ggttctactt tgactactgg 780
 ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca tccggagggt gtggctccga ggtgcagctg 840
 gtcgagtctg gaggaggatt ggtgcagcct ggagggtcat tgaaactctc atgtgcagcc 900
 tctggattca ccttcaataa gtacgccatg aactgggtcc gccaggctcc aggaaagggt 960
 ttggaatggg ttgctcgcat aagaagtaa tataataatt atgcaacata ttatgccgat 1020
 tcagtgaaag acaggttcac catctccaga gatgattcaa aaaacactgc ctatctacaa 1080
 atgaacaact tgaagactga ggacactgcc gtgtactact gtgtgagaca tgggaacttc 1140
 ggtaatagct acatatccta ctgggcttac tggggccaag ggactctggt caccgtctcc 1200
 tcagggtggt gtggttctgg cggcggcggc tccgggtggt gtggttctca gactgttgtg 1260
 actcaggaac cttactcac cgtatcacct ggtggaacag tcacactcac ttgtggctcc 1320
 tcgactgggg ctgttacatc tggcaactac ccaaactggg tccaacaaaa accaggtcag 1380
 gcaccccggt gtctaatag tgggactaag ttctctgccc ccggtactcc tgccagattc 1440
 tcaggctccc tgcttgagg caaggctgcc ctaccctct caggggtaca gccagaggat 1500
 gaggcagaat attactgtgt tctatggtac agcaaccgct ggggttctcg tggaggaacc 1560
 aaactgactg tcta 1575

<210> 26

5 <211> 525

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> SA21 x CEA x I2C H0

ES 2 753 950 T3

<400> 26

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1 5 10 15

Asp Asp Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro
 20 25 30

Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro
 50 55 60

Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser
 65 70 75 80

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala
 85 90 95

Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly
 115 120 125

ES 2 753 950 T3

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

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 145 150 155 160

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 165 170 175

Thr Val Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 180 185 190

Gly Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr
 195 200 205

Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr
 245 250 255

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly
 260 265 270

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 275 280 285

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 290 295 300

Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 305 310 315 320

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 325 330 335

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 340 345 350

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp
 355 360 365

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
 370 375 380

ES 2 753 950 T3

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
405 410 415

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
420 425 430

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
435 440 445

Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
450 455 460

Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
465 470 475 480

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
485 490 495

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
500 505 510

Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
515 520 525

<210> 27

<211> 1575

5

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> CEA x I2C x SA21 HO

10

<400> 27

ES 2 753 950 T3

caggcogtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc 60
 acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120
 aagccagggg gtctctccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180
 ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240
 ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300
 agcggcgctt ctgcggtggt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtggt 360
 tctggcggcg gcggctcccg tgggtggtggt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420
 ggcttggtec agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccgtc 480
 agtagctact ggatgactg ggtccgcca gctccaggga aggggctgga atgggtaggt 540
 ttattagaa acaaagctaa tgggtgggaca acagaatacg ccgctctgt gaaaggcaga 600
 ttcaccatct caagagatga ttccaagaac acgctgtatc ttcaaatgaa cagcctgaga 660
 gccgaggaca cggccgtgta ttactgtgca agagataggg ggctacggtt ctactttgac 720
 tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc tcctcatccg gaggtggtgg ctccgagggtg 780
 cagctggtcg agtctggagg aggattggtg cagcctggag ggtcattgaa actctcatgt 840
 gcagcctctg gattcacctt caataagtac gccatgaact gggctccgca ggctccagga 900
 aagggtttg aatgggttgc tgcataaga agtaaataa ataattatgc aacatattat 960
 gccgattcag tgaaagacag gttcaccatc tccagagatg attcaaaaa cactgcctat 1020
 ctacaaatga acaacttgaa gactgaggac actgccgtgt actactgtgt gagacatggg 1080
 aacttcggta atagctacat atcctactgg gcttactggg gccaaaggac tctggtcacc 1140
 gtctcctcag gtggtggtgg ttctggcggc ggcggctccg gtggtggtgg ttctcagact 1200
 gttgtgactc aggaacctc actcacctga tcacctggtg gaacagtcac actcacttgt 1260
 ggctcctcga ctggggctgt tacatctggc aactacccaa actgggtcca acaaaaacca 1320
 ggtcaggcac cccgtggtct aataggtggg actaagttcc tcgccccgg tactcctgcc 1380
 agattctcag gctccctgct tggaggcaag gctgccctca ccctctcagg ggtacagcca 1440
 gaggatgagg cagaatatta ctgtgttcta tggtagagca accgctgggt gttcgggtgga 1500
 ggaaccaaac tgactgtcct acggctgatc gaggacatct gcctgccag atggggctgc 1560
 ctgtgggagg acgac 1575

<210> 28

5 <211> 525

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> CEA x I2C x SA21 H0

ES 2 753 950 T3

<400> 28

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

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

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

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

ES 2 753 950 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn
275 280 285

Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
290 295 300

Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
305 310 315 320

ES 2 753 950 T3

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

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 340 345 350

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser
 355 360 365

Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 370 375 380

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr
 385 390 395 400

Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val
 405 410 415

Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr
 420 425 430

Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile
 435 440 445

Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 450 455 460

Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro
 465 470 475 480

Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp
 485 490 495

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Leu Ile Glu Asp
 500 505 510

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp
 515 520 525

<210> 29

<211> 1563

5

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> SA25 x CEA x I2C HO

10

<400> 29

ES 2 753 950 T3

gaggacatct gcctgccag atggggctgc ctgtgggagg accaggccgt gctgactcag 60
 ccggcttccc tctctgcata tcctggagca tcagccagtc tcacctgcac cttgcgcagg 120
 ggcatcaatg ttggtgccta cagtataatac tggtagcagc agaagccagg gagtccctcc 180
 cagtatctcc tgaggtacaa atcagactca gataagcagc agggctctgg agtctccagc 240
 cgcttctctg catccaaaga tgcttcggcc aatgcaggga ttttactcat ctctgggctc 300
 cagtctgagg atgaggctga ctattactgt atgatttggc acagcggcgc ttctgcggtg 360
 ttcgccggag ggaccaagtt gaccgtccta ggtggtggtg gttctggcgg cggcggctcc 420
 ggtggtggtg gttctgaggt gcagctggtc gagtctgggg gaggcttggg ccagcctggg 480
 aggtccctga gactctcctg tgcagcgtct ggattcaccg tcagtagcta ctggatgcac 540
 tgggtccgcc aagctccagg gaaggggctg gaatgggtag gtttcattag aaacaaagct 600
 aatggtggga caacagaata cgccgcgtct gtgaaaggca gattcaccat ctcaagagat 660
 gattccaaga acacgctgta tcttcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggccgtg 720
 tattactgtg caagagatag ggggctacgg ttctactttg actactgggg ccaagggacc 780
 acggtcaccg tctcctcctc cggaggtggt ggctccgagg tgcagctggt cgagtctgga 840
 ggaggattgg tgcagcctgg agggctcattg aaactctcat gtgcagcctc tggattcacc 900
 ttcaataagt acgccatgaa ctgggtccgc caggctccag gaaagggttt ggaatggggt 960
 gctcgcataa gaagtaaata taataattat gcaacatatt atgccgattc agtgaagac 1020
 aggttcacca tctccagaga tgattcaaaa aacactgcct atctacaaat gaacaacttg 1080
 aagactgagg aactgccgt gtactactgt gtgagacatg ggaacttcgg taatagctac 1140
 atactctact gggcttactg gggccaaggg actctggtca ccgtctcctc aggtggtggt 1200
 ggttctggcg gcgccggctc cgggtggtgt ggttctcaga ctggttgac tcaggaacct 1260
 tcaactcaccg taccactgg tggaacagtc aactcactt gtggctcctc gactggggct 1320
 gttacatctg gcaactacc aaactgggtc caacaaaaac caggctcaggc acccctgggt 1380
 ctaataggtg ggactaagtt cctcgcctcc ggtactcctg ccagattctc aggtccctg 1440
 ctggaggca aggtgcctc caccctctca ggggtacagc cagaggatga ggcagaatat 1500
 tactgtgttc tatggtacag caaccgctgg gtgttcgggt gaggaaccaa actgactgtc 1560
 cta 1563

<210> 30

<211> 521

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> SA25 x CEA x I2C HO

ES 2 753 950 T3

<400> 30

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

ES 2 753 950 T3

<211> 1563
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> CEA x I2C x SA25 HO

<400> 31

caggcogtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc 60
 acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120
 aagccagggg gtcctcccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180
 ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240
 ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300
 agcggcgctt ctgcggtgtt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tgggtggtgt 360
 tctggcggcg gcggctccgg tgggtggtgt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420
 ggcttgggtcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccgtc 480
 agtagctact ggatgcactg ggtccgcca gctccaggga aggggctgga atgggtaggt 540
 ttcattagaa acaaagctaa tgggtgggaca acagaatacg ccgctctgtg gaaaggcaga 600
 ttcaccatct caagagatga ttccaagaac acgctgtatc ttcaaatgaa cagcctgaga 660
 gccgaggaca cggccgtgta ttactgtgca agagataggg ggctacggtt ctactttgac 720
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctcatccg gaggtggtgg ctccgaggtg 780
 cagctggctg agtctggagg aggattggtg cagcctggag ggtcattgaa actctcatgt 840
 gcagcctctg gattcacctt caataagtac gccatgaact gggcccgcca ggctccagga 900
 aagggtttgg aatgggttgc tcgcataaga agtaaataata ataattatgc aacatattat 960
 gccgattcag tgaaagacag gttcaccatc tccagagatg attcaaaaa cactgcctat 1020
 ctacaaatga acaacttgaa gactgaggac actgccgtgt actactgtgt gagacatggg 1080
 aacttcggta atagctacat atcctactgg gcttactggg gccaaaggac tctggtcacc 1140
 gtctcctcag gtgggtggtg ttctggcggc ggcggctccg gtgggtggtg ttctcagact 1200
 gttgtgactc aggaaccttc actcaccgta tcacctggtg gaacagtcac actcacttgt 1260
 ggctcctcga ctggggctgt tacatctggc aactaccca actgggtcca acaaaaacca 1320
 ggtcaggcac cccgtggtct aataggtggg actaagttcc tcgcccccg tactcctgcc 1380
 agattctcag gctccctgct tggaggcaag gctgccctca ccctctcagg ggtacagcca 1440
 gaggatgagg cagaatatta ctgtgttcta tggtagagca accgctgggt gttcgggtgga 1500
 ggaaccaaac tgactgtcct agaggacatc tgcttccca gatggggctg cctgtgggag 1560
 gac 1563

10

ES 2 753 950 T3

<210> 32

<211> 521

<212> PRT

<213> artificial

5

<220>

<223> CEA x I2C x SA25 HO

<400> 32

10

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

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

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

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 950 T3

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

ES 2 753 950 T3

Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile
435 440 445

Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly
450 455 460

Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro
465 470 475 480

Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp
485 490 495

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Asp Ile Cys Leu
500 505 510

Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
515 520

<210> 33

<211> 1584

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> SA08 x CEA x I2C H0

10

<400> 33

ES 2 753 950 T3

cagggcctga tggcgacat ctgcctgcc agatggggct gcctgtggg cgactccgtg 60
 aaacaggccg tgctgactca gccggcttcc ctctctgcat ctcctggagc atcagccagt 120
 ctcacctgca ccttgcgcag gggcatcaat gttggtgcct acagtatata ctggtaccag 180
 cagaagccag ggagtcctcc ccagtatctc ctgaggtaca aatcagactc agataagcag 240
 cagggctctg gagtctccag ccgcttctct gcacocaaag atgcttcggc caatgcaggg 300
 attttactca tctctgggct ccagtctgag gatgaggctg actattactg tatgatttgg 360
 cacagcggcg cttctgcggt gttcggcgga gggaccaagt tgaccgtcct aggtggtggt 420
 ggttctggcg gcggcggctc cgggtggtgt ggttctgagg tgcagctggt cgagtctggg 480
 ggagccttgg tccagcctgg gaggtccctg agactctcct gtgcagcgtc tggattcacc 540
 gtcagtagct actggatgca ctgggtccgc caagctccag ggaaggggct ggaatgggta 600
 ggtttcatta gaaacaaagc taatggtggg acaacagaat acgccgcgtc tgtgaaaggc 660
 agattcacca tctcaagaga tgattccaag aacacgctgt atcttcaaat gaacagcctg 720
 agagccgagg acacggccgt gtattactgt gcaagagata gggggctacg gttctacttt 780
 gactactggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctcat ccggaggtgg tggctccgag 840
 gtgcagctgg tcgagtctgg aggaggattg gtgcagcctg gagggtcatt gaaactctca 900
 tgtgcagcct ctggattcac cttcaataag tacgccatga actgggtccg ccaggtcca 960
 ggaaaggggt tggaatgggt tgctcgcata agaagtaaat ataataatta tgcaacatat 1020
 tatgccgatt cagtgaaaga caggttcacc atctccagag atgattcaaa aaactctgcc 1080
 tatctacaaa tgaacaactt gaagactgag gacactgccg tgtactactg tgtgagacat 1140
 gggaaacttcg gtaatagcta catatcctac tgggcttact ggggccaagg gactctggtc 1200
 accgtctcct caggtggtgg tggttctggc ggcggcggct ccgggtggtg tggttctcag 1260
 actgttgtga ctcaggaacc ttcactcacc gtatcacctg gtggaacagt cacactcact 1320
 tgtggctcct cgactggggc tgttacatct ggcaactacc caaactgggt ccaacaaaaa 1380
 ccaggtcagg caccctgtgg tctaataagg gggactaagt tccctcggccc cggactcct 1440
 gccagattct caggctccct gcttggaggc aaggtgcccc tcacctctc aggggtacag 1500
 ccagaggatg aggcagaata ttactgtgtt ctatggtaca gcaaccgctg ggtgttcggt 1560
 ggaggaacca aactgactgt ccta 1584

<210> 34

5 <211> 528

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> SA08 x CEA x I2C H0

ES 2 753 950 T3

<400> 34

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Val Lys Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly
 35 40 45

Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln
 65 70 75 80

Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser
 85 90 95

Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu
 100 105 110

ES 2 753 950 T3

Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe
 115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175

Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala
 180 185 190

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn
 195 200 205

Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 210 215 220

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 225 230 235 240

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu
 245 250 255

Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 260 265 270

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 275 280 285

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 290 295 300

Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 305 310 315 320

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
 325 330 335

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser
 340 345 350

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys
 355 360 365

ES 2 753 950 T3

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
 370 375 380

Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 385 390 395 400

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 405 410 415

Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser
 420 425 430

Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val
 435 440 445

Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 450 455 460

Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro
 465 470 475 480

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu
 485 490 495

Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp
 500 505 510

Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 515 520 525

<210> 35

<211> 1584

5

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> CEA x I2C x SA08 HO

10

<400> 35

caggcogtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgcatctc ctggagcadc agccagtctc 60

acctgcacct tgcgcagggg catcaatggt ggtgcctaca gtatatactg gtaccagcag 120

aagccagggg gtctctccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180

ggctctggag tctccagccg cttctctgca tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240

ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggtgact attactgtat gatttggcac 300

agcggcgctt ctgcgggtgt cggcggaggg accaagttga ccgtcctagg tggtggtggt 360

ES 2 753 950 T3

tctggcggcg gcggtccgg tgggtgggt tctgaggtgc agctggtcga gtctggggga 420
 ggcttgggcc agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccgtc 480
 agtagctact ggatgcaact ggtccgcca gctccagga aggggctgga atgggtaggt 540
 ttcattagaa acaaagctaa tgggtgggaca acagaatacg ccgctctgtg gaaaggcaga 600
 ttcaccatct caagagatga ttccaagaac acgctgtatc ttcaaatgaa cagcctgaga 660
 gccgaggaca cggccgtgta ttactgtgca agagataggg ggctacggtt ctactttgac 720
 tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctcatccg gaggtggtgg ctccgaggtg 780
 cagctggctg agtctggagg aggattggtg cagcctggag ggtcattgaa actctcatgt 840
 gcagcctctg gattcacctt caataagtac gccatgaact gggcccgcca ggctccagga 900
 aagggtttgg aatgggttgc tcgcataaga agtaaataata ataattatgc aacatattat 960
 gccgattcag tgaaagacag gttcaccatc tccagagatg attcaaaaa cactgcctat 1020
 ctacaaatga acaacttgaa gactgaggac actgccgtgt actactgtgt gagacatggg 1080
 aacttcggta atagctacat atcctactgg gcttactggg gcccaaggac tctggtcacc 1140
 gtctcctcag gtgggtggtg ttctggcggc ggcggctccg gtgggtggtg ttctcagact 1200
 gttgtgactc aggaaccttc actcaccgta tcacctgggtg gaacagtcac actcacttgt 1260
 ggctcctcga ctggggctgt tacatctggc aactacccaa actgggtcca acaaaaacca 1320
 ggtcaggcac ccogtggctt aataggtggg actaagttcc togcccccg tactcctgcc 1380
 agattctcag gctccctgct tggaggcaag gctgccctca ccctctcagg ggtacagcca 1440
 gaggatgagg cagaatatta ctgtgttcta tggtagagca accgctgggt gttcggtgga 1500
 ggaaccaaac tgactgtcct acagggcctg atcggcgaca tctgcctgcc cagatggggc 1560
 tgctgtggg gcgactccgt gaaa 1584

<210> 36

<211> 549

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CEA x I2C x SA08 HO

10

<400> 36

ES 2 753 950 T3

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Val Lys Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Pro Gly Ala Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly
 35 40 45

Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln
 65 70 75 80

Gln Gly Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser
 85 90 95

Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu
 100 105 110

Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe
 115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175

Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala
 180 185 190

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn
 195 200 205

Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 210 215 220

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 225 230 235 240

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu
 245 250 255

Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 260 265 270

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 275 280 285

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

ES 2 753 950 T3

290 295 300

Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 305 310 315 320

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
 325 330 335

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser
 340 345 350

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys
 355 360 365

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
 370 375 380

Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 385 390 395 400

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 405 410 415

Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser
 420 425 430

Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val
 435 440 445

Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 450 455 460

Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro
 465 470 475 480

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu
 485 490 495

Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp
 500 505 510

Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 515 520 525

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 530 535 540

Gly Asp Ser Val Lys
 545

<210> 37

5

<211> 5

<212> PRT

ES 2 753 950 T3

<213> artificial

<220>

<223> extremo N de CD3humana

5

<400> 37

Gln	Asp	Gly	Asn	Glu
1				5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico monocatenario que comprende al menos tres dominios de unión, en donde
- (a) el primer dominio de unión se une a albúmina de suero de primate humano y no humano, comprende SEQ ID Nos. 2, 4 o 6, y está situado en el extremo N del segundo dominio de unión;
- 5 (b) el segundo dominio de unión se une a una molécula de la superficie celular sobre una célula de primate humano y no humano, en donde la molécula superficial es un antígeno de tumor; y
- (c) el tercer dominio de unión se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T sobre una célula de primate humano y no humano,
- 10 en donde los tres dominios están consecutivamente en una cadena de polipéptidos en el orden desde el extremo N hasta el extremo C
- el primer dominio de unión;
 - el segundo dominio de unión; y
 - el tercer dominio de unión.
2. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, en donde al menos uno de los dominios de unión es un scFv o anticuerpo de un solo dominio.
- 15 3. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo biespecífico comprende uno o más polipéptidos heterólogos adicionales.
4. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde
- (a) el segundo dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpo; y/o
- 20 (b) el tercer dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpo.
5. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tercer dominio de unión que se une al complejo de receptor de CD3 de linfocitos T se une a un epítipo de cadena CD3 ϵ humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, en donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo que consiste en Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Met-Gly-Gly-Ile-Thr-Gln-Thr-Pro-Tyr-Lys-Val-Ser-Ile-Ser-Gly-Thr-Thr-Val-Ile-Leu-Thr, Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Met-Gly-Asp-Thr-Thr-Gln-Asn-Pro-Tyr-Lys-Val-Ser-Ile-Ser-Gly-Thr-Thr-Val-Thr-Leu-Thr, Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Met-Gly-Asp-Thr-Thr-Gln-Asn-Pro-Tyr-Lys-Val-Ser-Ile-Ser-Gly-Thr-Thr-Val-Thr-Leu-Thr, y Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Ile-Gly-Asp-Thr-Thr-Gln-Asn-Pro-Tyr-Lys-Val-Ser-Ile-Ser-Gly-Thr-Thr-Val-Thr-Leu-Thr, y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID NO: 37).
- 25 6. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NOS: 8, 12, 16, 20, 24, 26, 30 o 34.
7. Una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica un anticuerpo biespecífico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos como se define en la reivindicación 7.
- 35 9. Una célula hospedadora transformada o transfectada con la secuencia de ácidos nucleicos como se define en la reivindicación 7 o con el vector como se define en la reivindicación 8.
10. Un proceso para la producción de un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho proceso cultivar una célula hospedadora como se define en la reivindicación 9 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo biespecífico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y recuperar el anticuerpo biespecífico producido del cultivo.
- 40 11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o producido según el proceso de la reivindicación 6.
12. El anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o producido según un método de la reivindicación 10 para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmunitaria.
- 45 13. Un kit que comprende un anticuerpo biespecífico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o producido según un método de la reivindicación 10, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 7, un vector como se define en la reivindicación 8, o una célula hospedadora como se define en la reivindicación 9.
- 50

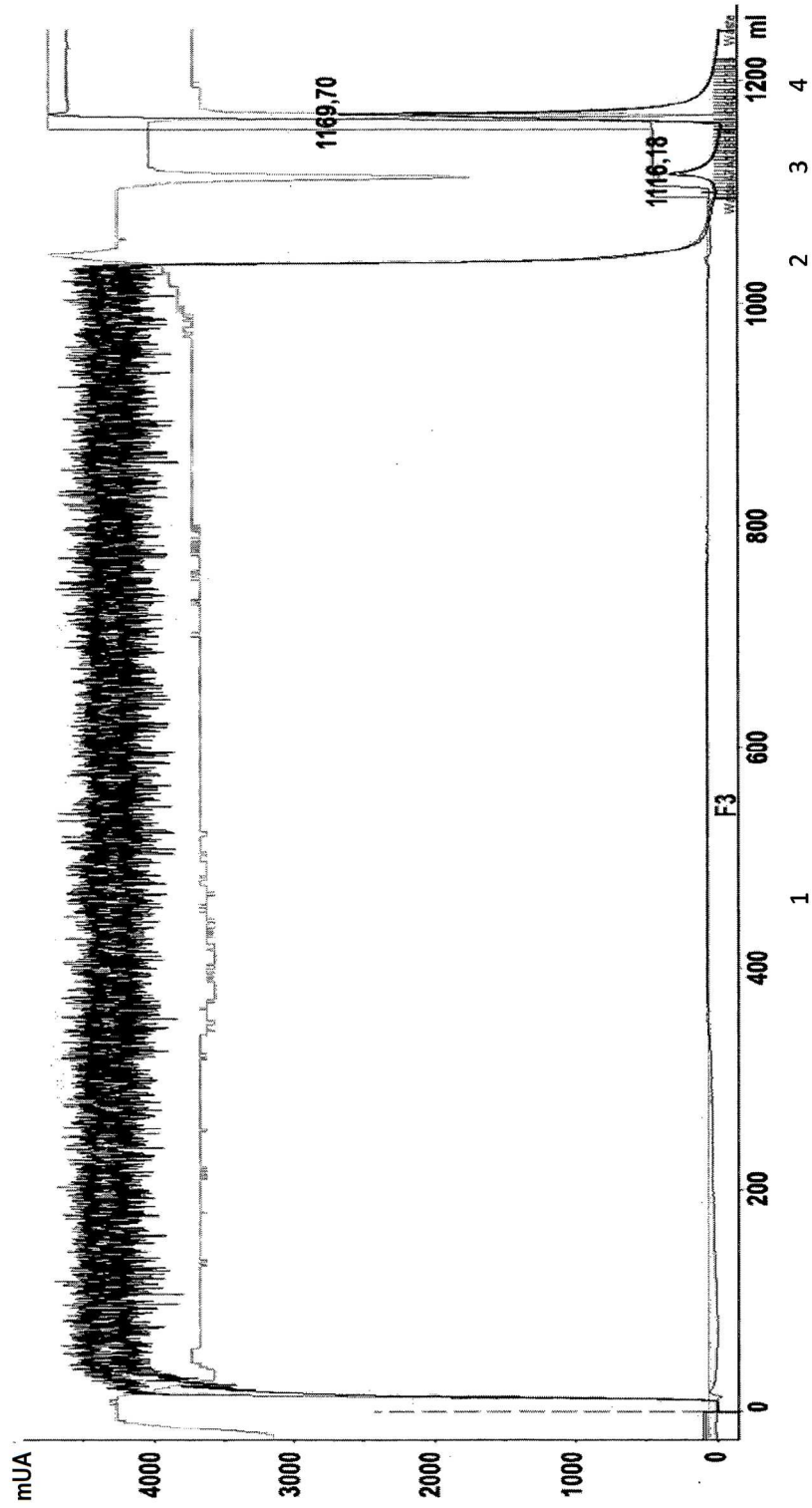


Figura 1

Figura 1 (continuación)

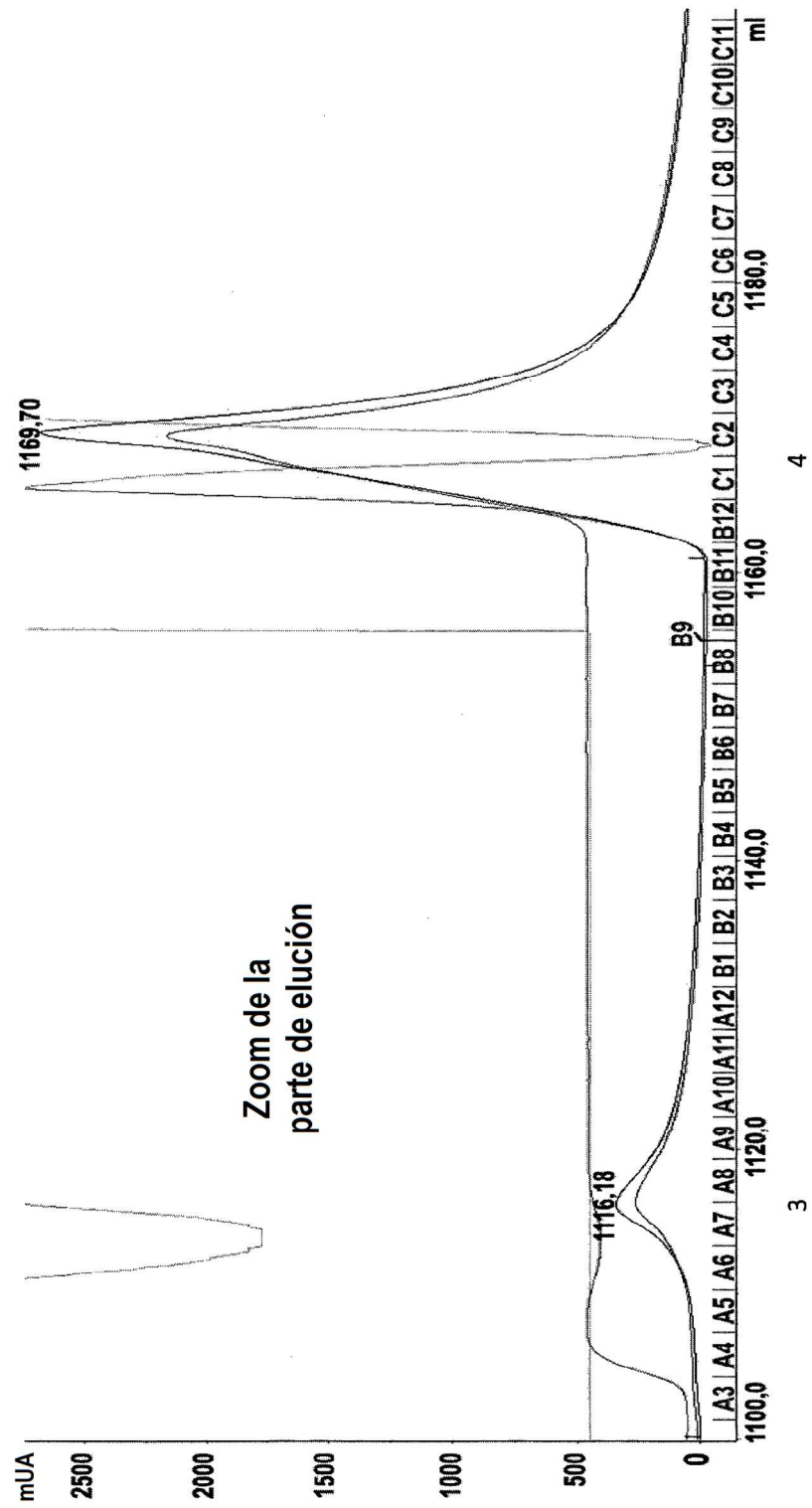


Figura 2

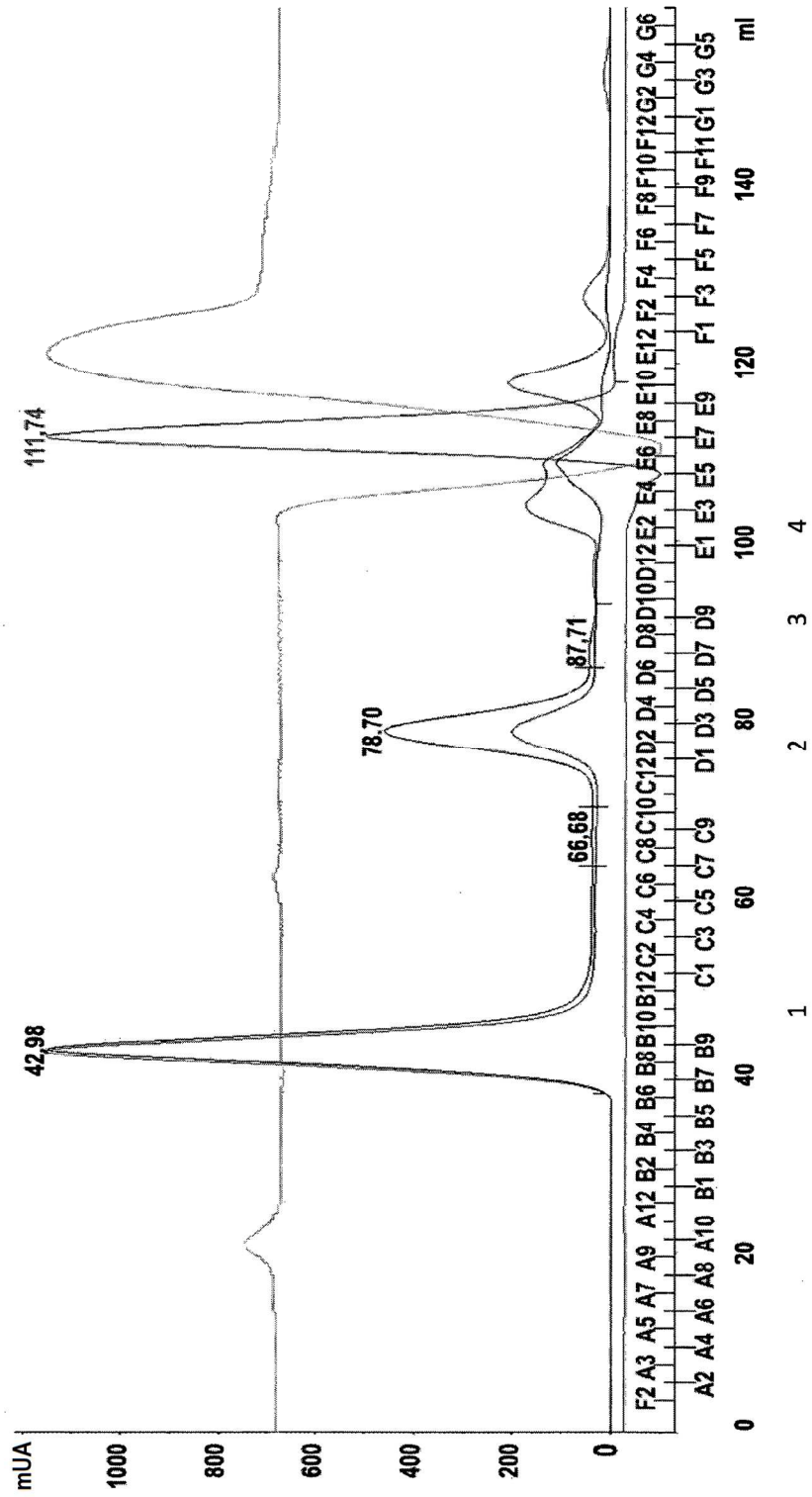


Figura 3

