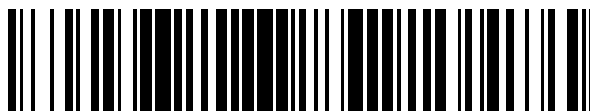


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 098**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06784990 .1**
96 Fecha de presentación: **19.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1912674**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **MOLÉCULAS DE ANTICUERPO FV DE CADENA SENCILLA BIESPECÍFICAS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
15.06.2005 US 154103

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607-5200, US y
FOX CHASE CANCER CENTER**

72 Inventor/es:
**ADAMS, Gregory, P.;
HORAK, Eva, M.;
WEINER, Louis, M. y
MARKS, James, D.**

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

ES 2 377 098 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 anticuerpo Fv de cadena sencilla biespecíficas y métodos de uso de las mismas

5 [0001]

CAMPO DE LA INVENCION

10 [0002] La presente invención se refiere a los campos de la inmunología y de la oncología y, más específicamente, a moléculas de anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, bs scFv) que pueden usarse para aprovecharse en la detección y/o tratamiento de diversos cánceres que sobreexpresan la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Ciertas moléculas de anticuerpos scFv biespecíficos ilustrativas de la invención tienen especificidades de unión por dos epítomos distintos de un solo miembro de la familia de EGFR o, como alternativa, especificidad por dos miembros distintos de la familia de EGFR.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 [0003] La ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) desempeña un papel importante en el desarrollo y la propagación del cáncer por todo el cuerpo. El EGFR, también conocido como erb-b1, es un miembro de una familia de cuatro genes que también incluye a HER2/neu (erb-b2), HER3 (erb-b3) y HER4 (erb-b4). El EGFR se expresa en una amplia variedad de tumores sólidos, incluyendo cánceres de colon, cánceres de cabeza y cuello, cánceres pancreáticos, cánceres de ovario y cánceres de mama.

25 [0004] El HGER2/neu es una proteína receptora de superficie celular con actividad tirosina quinasa. La proteína completa consiste en tres partes: un dominio citoplasmático intracelular, un segmento transmembrana hidrófobo corto y un dominio extracelular (ECD) que es responsable de la unión a ligando. Esta proteína receptora se expresa en la membrana celular de una diversidad de tipos de células epiteliales y, a través de la unión de factores de crecimiento específicos, regula diversos aspectos de la división del crecimiento celular.

30 [0005] Her2/neu, el gen que codifica la proteína HER2/neu, es un miembro de un grupo de genes conocidos como protooncogenes. Los protooncogenes codifican proteínas importantes, tales como factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y proteínas apoptóticas, que están implicadas en el crecimiento y la diferenciación celular normales. Cuando los protooncogenes se alteran por mutación puntual, translocación o amplificación génica, producen señales de crecimiento que pueden conducir a una transformación celular aberrante y al desarrollo de cáncer.

35

40 [0006] Aunque Her2/neu puede expresarse a bajos niveles en muchas células normales, típicamente está sobreexpresado en una diversidad de cánceres. La sobreexpresión de Her2/neu está causada en la mayoría de los casos por un aumento en el número de copias del gen (amplificación génica) y/o por un aumento en el nivel de expresión de los genes Her2/neu en la célula. La sobreexpresión de este receptor de factor de crecimiento desempeña un papel clave en la progresión tumoral, causando un mayor índice de crecimiento celular y transformación oncogénica. La amplificación génica del gen Her2/neu se ha observado en una diversidad de tipos de cáncer, incluyendo de mama, ovárico, endometrial, gástrico, pancreático, de próstata y glándula salival (Hynes y Stem (1994) Biochim Biophys Acta, 1198: 165-184). En pacientes de cáncer de mama, HER2/neu también ha demostrado ser de importancia clínica ya que está asociado con un mal pronóstico, con el recidivado del tumor y con una supervivencia acortada en pacientes con cáncer de mama (Seshadri et al (1993) J Clin. Oncol., 11: 1936-1942; Berger et al (1988) Cancer Res., 48: 1238 1243; O'Reilly et al (1991) Br. J. Cancer, 63: 444-446).

45

50 [0007] Actualmente, una gran cantidad de atención se ha centrado en el desarrollo de nuevas estrategias de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer. Una estrategia de este tipo es la terapia del cáncer basada en anticuerpos. Un objetivo principal de la terapia del cáncer basada en anticuerpos es administrar específicamente cargas útiles tóxicas tales como radioisótopos, toxinas o fármacos a tumores. El intervalo de tamaño de las moléculas basadas en sitios de unión de anticuerpos incluye: IgM (1000 kDa), IgG (150 kDa), F(ab=)2 (100 kDa), Fab (50 kDa), (scFv=)2 (55 kDa) y scFv (25 kDa). En ratones inmunodeficientes, moléculas de mayor tamaño tales como IgG y fragmentos F(ab=)2 se retienen a altos niveles en xenoinjertos de tumores humanos con un bajo grado de especificidad (Adams et al (1992), Antibody, Immimoconj. Radiopharm., 5: 81-95; Milenic et al (1991) J. Cancer Res. 51: 6363-6371), mientras que moléculas de menor tamaño tales como scFv, (scFv=)2 y Fab se retienen en tumores a niveles comparativamente inferiores con una especificidad enormemente mejorada (Milenic et al (1991) J. Cancer Res. 51: 6363-6371; Adams et al (1993) Cancer Res. 53: 4026-4034; Beaumier et al (1985) J Nuc/.Med. 26: 1172-1179; Colcher et al (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82: 1191-1197).

55

60

[0008] El determinante más destacado de las propiedades de direccionamiento anteriores es el tamaño de la molécula basada en anticuerpo respecto al umbral renal para el aclaramiento de primer paso. Otra característica importante de las moléculas basadas en anticuerpos es la valencia, ya que una retención tumoral significativamente mayor se ha asociado con una unión multivalente a antígeno a diana (Milenic et al (1991) J. Cancer Res. 51: 6363-

65

6371; Adams et al (1993) Cancer Res. 53: 4026-4034; Adams et al (1996) Proc. Amer. Assoc. Cancer Res 37: 472; Wolf et al (1993) Cancer Res. 53: 2560-2565).

5 **[0009]** La herceptina⁷, una nueva forma de inmunoterapia que se dirige al cáncer de mama, se ha desarrollado recientemente para dirigirse a células cancerosas que sobreexpresen Her2/neu. Se ha demostrado en ensayos clínicos que este tratamiento proporciona un tratamiento eficaz para pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para HER2/neu. Sin embargo, este tratamiento farmacológico es costoso y está asociado con una morbilidad y mortalidad significativas.

10 **[0010]** Varios otros tipos de terapia han demostrado ser más o menos eficaces en pacientes con cáncer de mama cuyos tumores se expresan niveles elevados de Her2/neu. Estos incluyen terapia con antraciclinas, que se cree que es más eficaz en pacientes con una expresión de Her2/neu amplificada, y terapia hormonal, que es menos eficaz en pacientes cuyo nivel de expresión de Her2/neu es elevado.

15 **[0011]** La atención también se ha centrado en la generación de moléculas de anticuerpos basados en Fv de cadena sencilla bivalentes con pesos moleculares en el intervalo del umbral renal para el aclaramiento de primer paso. Éstas incluyen diacuerpos de 50 kDa (Holliger et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448), (scFv)₂ de 55 kDa (Adams et al (1993) Cancer Res. 53: 4026-4034), dímeros de scFv basados en hélices anfipáticas de 60-65 kDa (Pack et al (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277; Pack (1992) Biochemistry 31: 1579-1584) y minicuerpos (scFv-C_{H3})₂ LD de 80 kDa y minicuerpos Flex (Hu et al (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061). Aunque cada una de estas proteínas es capaz de unirse a dos moléculas de antígeno, difieren en la orientación, la flexibilidad y la extensión de sus sitios de unión. Se cree que estas nuevas e innovadoras inmunoterapias contribuirán a mejorar los resultados en el cáncer de mama y otros cánceres que, demasiado frecuentemente, recidivan o progresan a pesar de una terapia multimodalidad agresiva.

25 **DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN**

30 **[0012]** Esta invención se refiere a la identificación de moléculas de anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, bs scFv) que pueden usarse para aprovecharse en la detección y/o tratamiento de diversos cánceres que sobreexpresan la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por lo tanto, esta invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo unidos entre sí, en el que dicho primer anticuerpo tiene especificidad de unión por al menos un epítipo en HER2/neu y el segundo anticuerpo tiene especificidad de unión por un segundo epítipo en HER3, y en el que dicho primer anticuerpo comprende:

35 un dominio VH que comprende la secuencia de CDR1 de VH de C6B1D2 SYWIA, la secuencia de CDR2 de VH de C6B1D2 LIYPGDSDTKYSPSFQG, la secuencia de CDR3 de VH de C6B1D2 HDVGYCTDRTC AKWPEWLG V, la región flanqueante 1 de C6B1D2, que comprende la secuencia QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT o QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT, la región flanqueante 2 de C6B1D2, que comprende la secuencia WVRQMPGKGL EYMG, la región flanqueante 3 de C6B1D2, que comprende la secuencia QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR, y la región flanqueante 4 de C6B1D2, que comprende la secuencia WGQGLTVTVSS; y

40 un dominio VL que comprende la secuencia de CDR1 de VL de C6B1D2 SGSSSNIGNNYVS, la secuencia de CDR2 de VL de C6B1D2 DHTNRPA, la secuencia de CDR3 de VL de C6B1D2 ASWDYTL SGWV, la región flanqueante 1 de C6B1D2, que comprende la secuencia QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC o ESVLTQPPSVSAAPGQKVTISC, la región flanqueante 2 de C6B1D2, que comprende la secuencia WYQQLPGTAPKLLIY, la región flanqueante 3 de C6B1D2, que comprende la secuencia GVPDRFSGSKSGTSASLAISGRSEDEADYYC; y la región flanqueante 4 de C6B1D2, que comprende la secuencia FGGGTKVTVLG o FGGGTKLTVLG; y en el que además dicho segundo anticuerpo comprende las CDR del anticuerpo HER3.H3 (SEC ID N°: 4). En ciertas realizaciones, los anticuerpos se unen por un enlazador, más preferentemente por un enlazador peptídico, y más preferentemente por un enlazador peptídico que carece de un sitio de escisión proteolítica (por ejemplo, un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 37). En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico está codificado por un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica SEC ID N°: 4.

55 **[0013]** En ciertas realizaciones, el primer y/o segundo anticuerpos son anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, anticuerpos scFv). Cuando tanto el primer como el segundo anticuerpos son ambos anticuerpos de cadena sencilla, los anticuerpos están preferentemente unidos directamente (para formar un solo polipéptido) o unidos a través de un enlazador, más preferentemente a través de un enlazador peptídico (por ejemplo, un enlazador peptídico que carece de un sitio de escisión proteolítica) para formar un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla (por ejemplo, bs-scFv). En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de cadena sencilla, y dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla, y dicho primer anticuerpo se acopla a dicho segundo anticuerpo mediante un enlazador peptídico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico está codificado por un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica SEC ID N°: 4. En ciertos casos, el vector comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de

la SEC ID N°: 37. El vector puede seleccionarse del grupo que consiste en un plásmido, cósmido, fago y virus.

[0014] También se proporciona una composición que comprende un anticuerpo biespecífico como se describe y/o reivindica en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0015] También se proporciona un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente memoria, para su uso en un método para tratar el cáncer (por ejemplo, mitigar uno o más síntomas de cáncer). El método implica típicamente administrar a un paciente (humano o animal no humano) que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico como se describe y/o reivindica en la presente memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El cáncer puede incluir, pero sin limitación, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata y glándula salival. La administración puede ser por cualquiera de una diversidad de métodos convenientes incluyendo la administración sistémica inyectable, la inyección en un tumor o tejido canceroso, la administración oral y similares.

[0016] También se proporciona un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente memoria, para su uso en un método para tratar el cáncer (por ejemplo, mitigar uno o más síntomas de cáncer). El método implica típicamente administrar a un paciente (humano o animal no humano) que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico como se describe y/o reivindica en la presente memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en combinación con otro agente citotóxico seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterápico, radiación de haz externo, un radioisótopo dirigido y un inhibidor de la transducción de señales. El cáncer puede incluir, pero sin limitación, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata y glándula salival. La administración puede ser por cualquiera de una diversidad de métodos convenientes, incluyendo la administración sistémica inyectable, la inyección en un tumor o tejido canceroso, la administración oral y similares.

[0017] También se proporciona un resto quimérico que comprende un anticuerpo biespecífico como se describe y/o reivindica en la presente memoria, acoplado a un efector. Los efectores preferidos incluyen, pero sin limitación, una citotoxina, un marcador, un radionúclido, un fármaco, un liposoma, un ligando y un anticuerpo. En ciertos casos, cuando el efector es un polipéptido, el resto quimérico es una proteína de fusión, preferentemente una proteína de fusión expresada de forma recombinante.

[0018] También se proporciona un método de administración o dirección específicamente de una molécula efectora a una célula que lleve un receptor de la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico. El método implica proporcionar un resto quimérico como se describe y/o reivindica en la presente memoria, y poner en contacto la célula con el resto quimérico, por lo que el resto quimérico se une específicamente a la célula. Los efectores preferidos incluyen, pero sin limitación, una citotoxina, un marcador, un radionúclido, un fármaco, un liposoma, un ligando, un anticuerpo, etc. El resto quimérico puede ser una proteína de fusión. La célula puede ser una célula cancerosa, preferentemente una célula cancerosa que sobreexpone uno o más miembros de la familia de proteínas de EGFR. Las células de cáncer particularmente preferidas incluyen, pero sin limitación, células de cáncer de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata y glándula salival.

[0019] También se proporciona un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente memoria, para su uso en un método de destrucción y/o inhibición específicamente del crecimiento o proliferación de una célula que lleve un receptor de la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, EGFR, HER2/*neu*, HER3, HER4). El método implica típicamente proporcionar un resto quimérico como se describe y/o reivindica en la presente memoria, unido a un efector citotóxico o citostático (por ejemplo, una citotoxina, un resto radiactivo y un liposoma que comprende un agente citotóxico o citostático, y similares); y poner en contacto dicha célula con el resto quimérico, por lo que el resto quimérico se une específicamente a la célula, dando como resultado la muerte y/o inhibición del crecimiento y/o proliferación de la célula. El resto quimérico puede ser una proteína de fusión. La célula puede ser una célula cancerosa, preferentemente una célula cancerosa que sobreexpone uno o más miembros de la familia de proteínas de EGFR. Las células cancerosas particularmente preferidas incluyen, pero sin limitación, células de cáncer de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata y glándula salival.

[0020] También se proporciona un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente memoria, para su uso en métodos de detección y/o visualización y/o diagnóstico de la presencia de una célula o tejido canceroso. El método implica típicamente poner en contacto una célula o tejido con un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente memoria, unido a un marcador detectable; y detectar el marcador, donde la detección del marcador en asociación con la célula o tejido indica la presencia de una célula o tejido que expresa (o sobreexpone) uno o más miembros de la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Los marcadores detectables preferidos incluyen, pero sin limitación, un emisor de gamma, un emisor de positrones, un marcador de MRI y un marcador fluorescente o colorimétrico. En ciertos casos, el marcador detectable es un emisor de gamma y la detección comprende la formación de imágenes con una cámara de gamma. En ciertos casos, el marcador detectable es un emisor de positrones y la detección comprende la formación de imágenes con tomografía por emisión de positrones (PET). En ciertos casos, el marcador detectable es un marcador de MRI y la detección

comprende la detección con formación de imágenes de resonancia magnética. La célula o tejido que expresa uno o más miembros de la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico puede ser una célula o tejido que sobreexpresa una proteína seleccionada del grupo que consiste en EGFR, HER2/*neu*, HER3 y HER4. La célula o tejido que expresa uno o más miembros de la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico es una que puede ser una célula o tejido canceroso (por ejemplo, cáncer de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata o glándula salival). Se señala que el ensayo de diagnóstico puede ser un componente de un diagnóstico diferencial de un cáncer y/o puede usarse para clasificar un cáncer como uno que sobreexpresa uno o miembros de la familia de proteínas de EGFR, y/o el ensayo puede usarse para visualizar un cáncer conocido. En este (y otros) casos, el ensayo no tiene que ser determinante de la presencia de una célula cancerosa, sino simplemente indicativo de la probable presencia de dicha célula o tejido. La detección puede comprender una técnica de formación de imágenes no invasiva. La detección puede comprender inmunohistoquímica. La detección puede comprender la detección en una muestra de tejido o biopsia. La detección puede comprender la detección en una sección tisular. La detección puede ser una detección *in vivo*.

[0021] De acuerdo con la presente invención, se proporcionan nuevas moléculas de anticuerpos Fv de cadena sencilla biespecíficos (bs-scFv) que tienen afinidad de unión por miembros de la familia de proteínas de EGFR.

[0022] En ciertas realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos bs-scFv tienen un primer y un segundo brazos que tienen afinidad de unión por dos epítopos distintos en miembros diferentes de la familia de proteínas de EGFR y que están unidos operativamente mediante una nueva molécula enlazadora que carece de sitios de escisión proteolítica. Los brazos que se emparejan entre sí para formar los anticuerpos bs-scFv son C6-B1D2 y HER3.H3. En una realización particularmente preferida, los brazos se unen entre sí con una molécula enlazadora que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 37. También se proporcionan vectores y transformantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico que codifican los brazos de scFv y la molécula enlazadora.

[0023] Los anticuerpos bs-scFv tienen afinidad de unión por miembros de la familia de proteínas de EGFR que se sobreexpresan por células tumorales.

[0024] Se proporcionan composiciones y métodos para tratar el cáncer en los que a un paciente se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de anticuerpo bs-scFv de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en solitario o en combinación con otros agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterápicos, radiación de haz externo, radioisótopos dirigidos e inhibidores de la transducción de señales.

DEFINICIONES

[0025] Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de restos aminoacídicos. Los términos son aplicables a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoacídicos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos de origen natural. El término también incluye variantes en el enlace peptídico tradicional que une los aminoácidos que componen el polipéptido. Los “péptidos”, “polipéptidos” y “proteínas” preferidos son cadenas de aminoácidos cuyos carbonos α están unidos a través de enlaces peptídicos. El aminoácido terminal en un extremo de la cadena (amino terminal) tiene por lo tanto un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. Como se usa en la presente memoria, la expresión “extremo amino terminal” (abreviada extremo N-terminal) se refiere al grupo α -amino libre en un aminoácido en el amino terminal de un péptido o al grupo α -amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra localización dentro del péptido. De forma similar, la expresión “extremo carboxi terminal” se refiere al grupo carboxilo libre en el extremo carboxi terminal de un péptido o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra localización dentro del péptido. Los péptidos también incluyen esencialmente cualquier poliaminoácido incluyendo, pero sin limitación, peptidomiméticos tales como aminoácidos unidos por un éter al contrario que por un enlace amida.

[0026] Como se usa en la presente memoria, un “anticuerpo” se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una mirada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

[0027] Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

- [0028]** Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que de por sí es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 mediante un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos Fab' pueden sintetizarse *de novo* químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en la presente memoria, también incluye anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos de cadena sencilla (anticuerpos que existen como una sola cadena polipeptídica), más preferentemente anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen entre sí (directamente o a través de un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de cadena sencilla es un heterodímero V_H-V_L unido covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias codificantes de V_H y V_L unidas directamente o unidas mediante un enlazador que codifique un péptido. Huston, et al. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 85: 5879-5883. Aunque V_H y V_L estén conectadas entre sí como una sola cadena polipeptídica, los dominios V_H y V_L se asocian no covalentemente. Las primeras moléculas de anticuerpos funcionales que se expresaron en la superficie de fagos filamentosos fueron Fv de cadena sencilla (scFv), sin embargo, también han tenido éxito estrategias de expresión alternativas. Por ejemplo, las moléculas Fab pueden presentarse en fagos si una de las cadenas (pesada o ligera) se fusiona a la proteína de la cápside g3 y la cadena complementaria se exporta al periplasma como una molécula soluble. Las dos cadenas pueden estar codificadas en el mismo replicón o en replicones diferentes; el punto importante es que las dos cadenas de anticuerpo en cada molécula Fab se ensamblan post-traduccionalmente y el dímero se incorpora en la partícula de fago mediante enlace de una de las cadenas con, por ejemplo, g3p (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.733.743). Los expertos en la materia conocen anticuerpos scFv y varias otras estructuras que convierten las cadenas polipeptídicas ligera y pesada naturalmente agregadas pero químicamente separadas de una región V de anticuerpo en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778). Los anticuerpos particularmente preferidos deberían incluir todos los que se han presentado en fagos (por ejemplo, scFv, Fv, Fab y Fv unidos por disulfuro (Reiter et al. (1995) *Protein Eng.* 8: 1323-1331), y también incluir anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, bs scFv).
- [0029]** Con respecto a anticuerpos de la invención, la expresión "inmunológicamente específico", "se une específicamente" se refieren a anticuerpos que se unen a uno o más epítopos de una proteína de interés (por ejemplo, HER2/*neu*), pero que no reconocen sustancialmente ni se unen a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas biológicas antigénicas.
- [0030]** La expresión "anticuerpo biespecífico", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno, un primer sitio de unión que tiene afinidad por un primer antígeno o epítipo, y un segundo sitio de unión que tiene afinidad de unión por un segundo antígeno o epítipo distinto del primero.
- [0031]** Las expresiones "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se refieren a al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario y, generalmente, contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se resume a continuación, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, enlaces fosforamida (Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49(10): 1925) y referencias en el mismo; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35: 3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; y Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26: 141 9), fosforotioato (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1437; y Patente de Estados Unidos N° 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321), O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press) y cadenas principales y enlaces de ácidos peptidonucleicos (véase Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895; Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson et al. (1996) *Nature* 380: 207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097); cadenas principales no iónicas (Patentes de Estados Unidos N° 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; *Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13: 1597; Capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series* 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs et al. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34: 17; *Tetrahedron Lett.* 37: 743 (1996)) y cadenas principales distintas de ribosa, incluyendo las descritas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.235.033 y 5.034.506, y en los Capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series* 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook. Los ácidos

nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al. (1995), Chem. Soc. Rev. págs. 169- 176). Se describen varios análogos de ácidos nucleicos en Rawls, C & E News 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato pueden realizarse para facilitar la adición de restos adicionales tales como marcadores, o para aumentar la estabilidad y semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos.

[0032] Las expresiones “que hibrida específicamente con” e “hibridación específica” e “hibridar selectivamente con”, como se usan en la presente memoria, se refieren a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas. La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones en las que una sonda hibridará preferentemente con su subsecuencia diana y, en menor medida, o nada en absoluto, con otras secuencias. La hibridación rigurosa y las condiciones de lavado de hibridación rigurosas, en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos, dependen de la secuencia y son diferentes en parámetros ambientales diferentes. Se encuentra una guía exhaustiva hacia la hibridación de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I, capítulo 2, Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays, Elsevier, NY (Tijssen). Generalmente, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en una matriz o en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es de 42°C usando soluciones de hibridación convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, y la discusión detallada a continuación), llevándose a cabo la hibridación durante una noche. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es de NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con SSC 0,2x a 65°C durante 15 minutos (véase, por ejemplo, Sambrook anteriormente para una descripción de tampón SSC). Con frecuencia, un lavado de alta rigurosidad está precedido por un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 1x a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de un lavado de baja rigurosidad para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos es de SSC 4x a 6x a 40°C durante 15 minutos.

[0033] Cuando se aplica a ARN, la expresión “ácido nucleico aislado” se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada como se ha definido anteriormente. Como alternativa, el término puede referirse a una molécula de ARN que se haya separado lo suficiente de otros ácidos nucleicos con los que estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un “ácido nucleico aislado” (ADN o ARN) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos y separada de otros componentes presentes durante su producción.

[0034] Un “replicón” es cualquier elemento genético, por ejemplo, un plásmido, cósmido, bécido, plástido, fago o virus, que es capaz de una replicación en gran medida bajo su propio control. Un replicón puede ser ARN o ADN, y puede ser monocatenario o bicatenario.

[0035] Un “vector” es un replicón, tal como un plásmido, cósmido, bécido, fago o virus, al que puede unirse otra secuencia o elemento genético (ADN o ARN) para provocar la replicación de la secuencia o elemento unido.

[0036] Un “operón de expresión” se refiere a un segmento de ácido nucleico que puede poseer secuencias de control de la transcripción y de la traducción, tales como promotores, potenciadores, señales de inicio de la traducción (por ejemplo, codones ATG o AUG), señales de poliadenilación, terminadores y similares, y que facilitan la expresión de una secuencia codificante de un polipéptido en una célula u organismo hospedador.

[0037] El término “cebador”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido, ARN o ADN, monocatenario o bicatenario, derivado de un sistema biológico, generado por digestión con enzimas de restricción o producidos sintéticamente que, cuando se pone en el entorno apropiado, es capaz de actuar funcionalmente como iniciador de la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Cuando se presenta con un molde de ácido nucleico apropiado, precursores de nucleósido trifosfato adecuados de ácidos nucleicos, una enzima polimerasa, cofactores adecuados y condiciones tales como una temperatura y un pH adecuados, el cebador puede extenderse en su extremo terminal 3' por adición de nucleótidos mediante la acción de una polimerasa o una actividad similar para dar un producto de extensión de cebadores. El cebador puede variar en longitud dependiendo de las condiciones particulares y de los requisitos de la aplicación. Con frecuencia, los cebadores varían de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 o más nucleótidos de longitud. Los cebadores son típicamente de una complementariedad suficiente al molde deseado para cebar la síntesis del producto de extensión deseado. En otras palabras, los cebadores son capaces de hibridar con la cadena de molde deseada de una forma suficiente para proporcionar el resto hidroxilo 3' del cebador en una yuxtaposición apropiada para su uso en el inicio de la síntesis mediante una

polimerasa o enzima similar. No es necesario que la secuencia de cebador represente una complementaria exacta del molde deseado. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos no complementaria puede unirse al extremo 5' de un cebador de otro modo complementario. Como alternativa, pueden intercalarse bases no complementarias dentro de la secuencia del cebador oligonucleotídico, con tal de que la secuencia del cebador tenga una complementariedad suficiente con la secuencia de la cadena de molde deseada para proporcionar funcionalmente un complejo de molde-cebador para la síntesis del producto de extensión.

[0038] La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha descrito en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195, 4.800.195 y 4.965.188, cuyas descripciones completas se incorporan por referencia en la presente memoria.

[0039] Como se usan en la presente memoria, las expresiones "indicador", "sistema indicador", "gen indicador" o "producto génico indicador" significarán un sistema genético operativo en el que un ácido nucleico comprende un gen que codifica un producto que, cuando se expresa, produce una señal indicadora que es fácilmente medible, por ejemplo, mediante ensayo biológico, inmunoensayo, radioinmunoensayo o por métodos colorimétricos, fluorogénicos, quimioluminiscentes o de otro tipo. El ácido nucleico puede ser ARN o ADN, lineal o circular, monocatenario o bicatenario, de polaridad antisentido o con sentido, está unido operativamente a los elementos de control necesarios para la expresión del producto génico indicador. Los elementos de control variarán de acuerdo con la naturaleza del sistema indicador y si el gen indicador está en forma de ADN o ARN, pero pueden incluir, pero sin limitación, elementos tales como promotores, potenciadores, secuencias de control de la traducción, señales de adición de poli A, secuencias de terminación de la transcripción y similares.

[0040] Los términos "transformar", "transfectar", "transducir" se referirán a cualquier método o medio por el que un ácido nucleico se introduce en una célula u organismo hospedador, y pueden usarse indistintamente para transmitir el mismo significado. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, fusión con PEG y similares. El ácido nucleico introducido puede o no estar integrado (unido covalentemente) en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor. En células bacterianas, de levadura, vegetales y de mamíferos, por ejemplo, el ácido nucleico introducido puede mantenerse como un elemento episomal o replicón independiente tal como un plásmido. Como alternativa, el ácido nucleico introducido puede integrarse en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor y mantenerse de forma estable en esa célula u organismo y transmitirse además o heredarse a células u organismos de progenie de la célula u organismo receptor. Por último, el ácido nucleico introducido puede existir en la célula u organismo hospedador receptor sólo de forma transitoria.

[0041] La expresión "gen marcador de selección" se refiere a un gen que cuando se expresa confiere un fenotipo seleccionable, tal como resistencia a antibiótico, en una célula o planta transformada.

[0042] La expresión "unido operativamente" significa que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de la secuencia codificante se ponen en la molécula de ADN en las posiciones apropiadas respecto a la secuencia codificante para lograr la expresión de la secuencia codificante. Esta misma definición es a veces aplicable a la disposición de unidades de transcripción y otros elementos de control de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) en un vector de expresión.

[0043] Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos aminoacídicos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Con respecto a los péptidos descritos en la presente memoria, la identidad de secuencia se determina a lo largo de la longitud completa del péptido.

[0044] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

[0045] Un alineamiento óptimo de secuencias para su comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante aplicaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual (véase, en general, Ausubel et al, anteriormente).

[0046] Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento múltiple de secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos por parejas para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencia. También representa un árbol o dendograma que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35: 351-360. El método usado es similar al método descrito por Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5: 151-153. El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza con el alineamiento por parejas de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo se alinea después con la siguiente secuencia más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencias se alinean mediante una simple extensión del alineamiento por parejas de dos secuencias individuales. El alineamiento final se consigue mediante una serie de alineamientos progresivos por parejas. El programa se ejecuta por designación de secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencia y por designación de los parámetros del programa. Por ejemplo, una secuencia de referencia puede compararse con otras secuencias de ensayo para determinar la relación del porcentaje de identidad de secuencia usando los parámetros siguientes: peso de huecos por defecto (3,00), peso de longitud de huecos por defecto (0,10) y huecos terminales ponderados.

[0047] Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. El *software* para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero parejas de secuencia de alta puntuación (HSP) por identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coincidan o satisfagan alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con un palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al, anteriormente). Estas coincidencias de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden después en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para una pareja de restos emparejados; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos emparejados erróneamente; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada se hace cero o menos debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915).

[0048] Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona un indicio de la probabilidad por la que un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01 y, más preferentemente, inferior a aproximadamente 0,001.

[0049] La expresión "dirigir/administrar específicamente", cuando se usa, por ejemplo con referencia a un resto químico como se describe en la presente memoria, se refiere a la unión específica del resto a una diana (por ejemplo, una célula que sobreexpresa la proteína o proteínas diana), esto da como resultado un aumento en la duración y/o concentración local del resto en o dentro de la célula en comparación con la que se obtendría sin direccionamiento "específico". La especificidad no tiene que ser absoluta, sino simplemente una avidez/afinidad detectablemente mayor/apreciable que la observada para una célula que expresa la proteína o proteínas diana normalmente (por ejemplo, de tipo silvestre), o que la observada para una célula que no expresa la proteína o proteínas diana.

[0050] Los restos aminoácidos se identifican en la presente solicitud de acuerdo con las abreviaturas de 3 letras o de 1 letra convencionales (por ejemplo, como se expone en la norma WIPO ST 25) y/o como se expone en la Tabla 1.

[0051] Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos.

Aminoácido	Abreviatura de 3 letras	Abreviatura de 1 letra
L-Alanina	Ala	A
L-Arginina	Arg	R
L-Asparagina	Asn	N
L-Ácido aspártico	Asp	D
L-Cisteína	Cys	C
L-Glutamina	Gln	Q
L-Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
L-Histidina	His	H
L-Isoleucina	Ile	I
L-Leucina	Leu	L
L-Metionina	Met	M
L-Fenilalanina	Phe	F
L-Prolina	Pro	P
L-Serina	Ser	S
L-Treonina	Thr	T
L-Triptófano	Trp	W
L-Tirosina	Tyr	Y
L-Valina	Val	V
L-Lisina	Lys	K

5 **[0052]** Se prefiere que los aminoácidos enantioméricos descritos en la presente memoria estén en la forma isomérica "L". Sin embargo, los restos en la forma isomérica "D" pueden sustituir a cualquier resto de L-aminoácido con tal de que se conserven las propiedades deseadas del polipéptido. Todas las secuencias de restos aminoacídicos representadas en la presente memoria se ajustan a la orientación convencional de extremo amino terminal a extremo carboxi terminal de izquierda a derecha.

10 **[0053]** La expresión "proteína asilada" o "proteína aislada y purificada" se usa a veces en la presente memoria. Esta expresión se refiere principalmente a una proteína producida por expresión de una molécula de ácido nucleico aislada descrita en la presente memoria. Como alternativa, esta expresión puede referirse a una proteína que se ha separado lo suficiente de otras proteínas con las que estaría asociada de forma natural, para existir en forma "sustancialmente pura". El término "aislado" no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas con otros
15 compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieran con la actividad fundamental y que puedan estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta, a la adición de estabilizantes o a la preparación de compuestos en, por ejemplo, preparaciones inmunogénicas o preparaciones farmacéuticamente aceptables.

20 **[0054]** La expresión "sustancialmente pura" se refiere a una preparación que comprende al menos el 50-60% en peso de un material dado (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). Más preferentemente, la preparación comprende al menos el 75% en peso y, más preferentemente, el 90-95% en peso del compuesto dado. La pureza se mide por métodos apropiados para el compuesto dado (por ejemplo, métodos cromatográficos, electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, análisis de HPLC y similares).

25 **[0055]** El término "funcional", como se usa en la presente memoria, implica que la secuencia de ácido nucleico o aminoácido es funcional para el ensayo o fin mencionado.

30 **[0056]** La expresión "que consiste esencialmente en", cuando se refiere a un nucleótido o aminoácido particular, se refiere a una secuencia que tiene las propiedades de una SEC ID N° dada. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a una secuencia de aminoácidos, la expresión incluye la secuencia de por sí y modificaciones moleculares que no afectarían a las características básicas y novedosas de la secuencia.

35 **[0057]** Las expresiones "etiqueta", "secuencia de etiqueta" o "etiqueta proteica" se refieren a un resto químico, un nucleótido, oligonucleótido, polinucleótido o un aminoácido, péptido o proteína u otro agente químico que, cuando se añade a otra secuencia, proporciona una utilidad adicional o confiere propiedades útiles, particularmente en la detección o aislamiento de esa secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico homopolimérica o una secuencia de ácido nucleico complementaria a un oligonucleótido de captura puede añadirse a una secuencia de cebador o sonda para facilitar el aislamiento posterior de un producto de extensión o producto
40 hibridado. En el caso de etiquetas proteicas, pueden añadirse restos de histidina (por ejemplo, 4 a 8 restos de histidina consecutivos) al extremo amino o carboxi terminal de una proteína para facilitar el aislamiento de la proteína por cromatografía de metal quelante. Como alternativa, pueden añadirse secuencias de aminoácidos, péptidos, proteínas o compañeros de fusión que representan epítomos o determinantes de unión reactivos con moléculas de anticuerpo específicas u otras moléculas (por ejemplo, epítomo flag, epítomo c-myc, epítomo transmembrana de la proteína hemaglutinina del virus influenza A, proteína A, dominio de unión a celulosa, proteína de unión a

calmodulina, proteína de unión a maltosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa y similares) a proteínas para facilitar el aislamiento de proteínas por procedimientos tales como cromatografía de afinidad o inmunoafinidad. Los restos de etiquetas químicas incluyen moléculas tales como biotina que pueden añadirse a ácidos nucleicos o proteínas y facilitan el aislamiento o la detección por interacción con reactivos de avidina, y similares. El experto en la materia conoce y puede imaginar numerosos otros restos de etiqueta, y se contemplan dentro del alcance de esta definición.

[0058] Un “clon” o “población celular clonal” es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro común, por ejemplo, por mitosis.

[0059] Una “línea celular” es un clon de una célula o población celular primaria que es capaz de un crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0060] La Figura 1 muestra un diagrama esquemático del vector pUC/ALM.

[0061] La Figura 2 muestra una gráfica que ilustra la unión de proteínas ALM al dominio extracelular de HER3 en una microplaca de BIAcore.

[0062] La Figura 3 muestra una gráfica que ilustra la unión de proteínas ALM al dominio extracelular de HER2/*neu* en una microplaca de BIAcore.

[0063] La Figura 4 muestra una gráfica que ilustra la unión simultánea de proteínas ALM a HER3 y HER2/*neu* en una microplaca de BIAcore.

[0064] Las Figuras 5A y 5B muestran gráficas de resultados de citometría de flujo que presentan una reducción en HER2/*neu* y HER3 en superficie celular después de la incubación *in vitro* de ALM con células de cáncer de mama BT-474 humanas que expresan tanto HER2/*neu* como HER3.

[0065] La Figura 6 muestra una gráfica de los resultados de un ensayo de MTT que demuestra que ALM disminuye la proliferación de células de cáncer de mama BT-474 que expresan tanto HER2/*neu* como HER3.

[0066] La Figura 7 muestra una gráfica que ilustra los resultados de un ensayo de clonogenicidad de 17 días que demuestra que la incubación de células BT-474 con ALM a una concentración que es equimolar con la expresión de HER2/*neu* en superficie celular conduce a una reducción del 50% en la formación de colonias (supervivencia celular).

[0067] La Figura 8 muestra un análisis de transferencia de western que presenta alteraciones en la fosforilación de AKT a lo largo de 48 horas después de la incubación *in vitro* de diferentes concentraciones de ALM con células de cáncer de mama BT-474 humanas que expresan tanto HER2/*neu* como HER3.

[0068] La Figura 9 muestra una gráfica que mapea la biodistribución de ALM marcado con I a lo largo de 48 horas en ratones inmunodeficientes.

[0069] La Figura 10 ilustra un quelato ^{211}At -SAPS usado para marcar un anticuerpo biespecífico.

[0070] Las Figuras 11A a 11C muestran los efectos de ALM conjugado con ^{211}At a baja dosificación de 10 μg (Figura 11C) y a alta dosis de 80 μg (Figura 11B) en comparación con controles sin tratar (Figura 11A).

[0071] La Figura 12 ilustra el marcaje tumoral específico en un ratón usando un anticuerpo biespecífico marcado con ^{124}I (ALM). Imágenes de PET (parte superior derecha) y CT (parte superior izquierda) de ratones scid con xenoinjerto de carcinoma ovárico SK-OV-3 que expresa antígenos HER2/*neu* y HER3, y obtenidas las imágenes 48 horas post-inyección en un G.E. Discovery LS en FCCC. El espesor de corte de CT es de 0,63 mm. La fusión de imágenes (parte inferior derecha) realizada con el *software* MIM.

[0072] La Figura 13 muestra las secuencias de cadenas ligeras y pesadas de scFv según se determinaron por el Adams Lab y se usaron en la construcción de ciertas moléculas de bs-scFv. Se proporcionan las secuencias para la cadena pesada de C6.5 (SEC ID N° 38), cadena pesada de G98A (SEC ID N° 39), cadena pesada de ML3-9 (SEC ID N° 40), cadena pesada de H3B1 (SEC ID N° 41), cadena pesada de B1D2 (SEC ID N° 42), cadena ligera de C6.5 (SEC ID N° 43), cadena ligera de G98A (SEC ID N° 44), cadena ligera de ML3-9 (SEC ID N° 45), cadena ligera de H3B1 (SEC ID N° 46) y cadena ligera de B1D2 (SEC ID N° 47).

[0073] La Figura 14 muestra las secuencias proteicas deducidas de las regiones variables de cadena pesada y ligera de todas las IgG producidas en vector IDEC proporcionado por el Marks Lab. Se proporcionan las secuencias

para la cadena pesada de C6.5 (SEC ID N° 48), cadena pesada de G98A (SEC ID N° 49), cadena pesada de ML3-9 (SEC ID N° 50), cadena pesada de H3B1 (SEC ID N° 51), cadena pesada de B1D2 (SEC ID N° 52), cadena ligera de C6.5 (SEC ID N° 53), cadena ligera de G98A (SEC ID N° 54), cadena ligera de ML3-9 (SEC ID N° 55), cadena ligera de H3B1 (SEC ID N° 56) y cadena ligera de B1D2 (SEC ID N° 57).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0074] Los tumores sobreexpresan con frecuencia receptores de factores de crecimiento que se unen a diversos ligandos y facilitan un crecimiento tumoral ilimitado. Un ejemplo de dichos receptores de factores de crecimiento es la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

[0075] La transducción de señales a través de miembros de la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) depende de la formación de homodímeros o heterodímeros desencadenada por la unión de ligando. Esta familia de receptores está compuesta por cuatro proteínas unidas a membrana: EGFR, HER2/*neu*, HER3 y HER4. La sobreexpresión de estas proteínas se ha correlacionado con un mal pronóstico en varios tipos de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, cánceres de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata y glándula salival. Aunque varios grupos han desarrollado estrategias para dirigirse a miembros individuales de la familia de proteínas de EGFR (por ejemplo, HER2/*neu* o EGFR) para inhibir el crecimiento tumoral, ninguno de los tratamientos ha demostrado curar en última instancia estas formas de cáncer.

[0076] De acuerdo con la presente invención, se han desarrollado nuevas construcciones de anticuerpos que son capaces de dirigirse simultáneamente a múltiples miembros (o múltiples sitios en un miembro dado) de la familia de proteínas de EGFR. Las construcciones de anticuerpos comprenden típicamente un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo unidos entre sí, en las que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen específicamente a diferentes epítomos en el mismo miembro o a diferentes miembros de la familia de proteínas de EGFR. En ciertas realizaciones, las construcciones de anticuerpos biespecíficos son moléculas de cadena sencilla biespecíficas (por ejemplo, Fv de cadena sencilla biespecíficos (bs-scFv)), pero las construcciones no tienen que estar tan limitadas. Por lo tanto, por ejemplo, también se contemplan anticuerpos completos conjugados químicamente o fragmentos de anticuerpos.

[0077] Los anticuerpos biespecíficos de esta invención se unen a miembros seleccionados de la familia de proteínas de EGFR para impedir la señalización inducida por ligando y/o desencadenar efectos citostáticos y/o citotóxicos. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para marcar específicamente células cancerosas, tumores sólidos y similares y, más en general, para dirigir/administrar específicamente cualquier efector conjugado o acoplado de otro modo (por ejemplo, radioisótopo, marcador, citotoxina, fármaco, liposoma, anticuerpo, ácido nucleico, dendrímero, etc.) a células cancerosas incluyendo, pero sin limitación, células cancerosas aisladas, células metastásicas, células de tumores sólidos y similares.

[0078] En ciertas realizaciones preferidas, los anticuerpos biespecíficos de esta invención son anticuerpos Fv de cadena sencilla biespecíficos (bs-scFv). Los fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla son derivados de anticuerpos obtenidos por ingeniería genética que incluyen una región variable de cadena tanto pesada como ligera unidas por una molécula enlazadora peptídica y son potencialmente más eficaces que anticuerpos IgG no modificados debido a que su reducido tamaño permite que atraviesen tejidos y tumores sólidos más fácilmente que los anticuerpos IgG.

[0079] En una realización, los anticuerpos biespecíficos de esta invención (por ejemplo, las moléculas de anticuerpos bs-scFv) comprenden dos dominios que proporcionan dos especificidades de unión distintas. Un primer dominio tiene especificidad de unión por un epítomo en un miembro de la familia de proteínas de EGFR y el segundo dominio tiene especificidad de unión por un epítomo en un segundo miembro de la familia de proteínas de EGFR.

I. Anticuerpos que forman los anticuerpos biespecíficos de esta invención

[0080] Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos biespecíficos de esta invención comprenden típicamente dos o más dominios de unión, al menos dos de los cuales son específicos para diferentes epítomos de la familia de proteínas de EGFR, comprendiendo los anticuerpos dominios específicos contra epítomos de HER2/*neu* o HER3.

[0081] Usando estrategias de presentación en fago, se han generado varios anticuerpos de cadena sencilla que son específicos para diversos epítomos en estos miembros de la familia de proteínas de EGFR. Estos anticuerpos Fv de cadena sencilla pueden usarse como dominios/brazos para construir un anticuerpo biespecífico de acuerdo con esta invención. Se proporcionan anticuerpos ejemplares a continuación en la Tabla 2 y en las Figuras 13 y 14. Cada brazo (anticuerpo) puede emparejarse con un brazo diferente para formar un anticuerpo bs-scFv con especificidad de unión por dos epítomos distintos en diferentes miembros de la familia de proteínas de EGFR.

Tabla 2. Anticuerpos Fv de cadena sencilla dirigidos contra epítomos de la familia de proteínas de EGFR.

Anti-HER2/neu:	Anti-HER3:
C6-B1D2 (B1D2 o C6MH3-B1D2)	HER3.H3 (SEC ID N°: 4 proteína)

[0082] Además, los anticuerpos identificados en la Tabla 2 se han secuenciado (véanse, por ejemplo, las Figuras 13 y 14). Por lo tanto se conocen las secuencias de aminoácidos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Usando esta información de secuencia, las mismas o regiones determinantes de complementariedad similares pueden introducirse por ingeniería genética en otros anticuerpos para producir anticuerpos de tamaño completo y/o fragmentos de anticuerpo quiméricos, por ejemplo, para asegurar la compatibilidad de especie, para aumentar la semivida en suero y similares. Los expertos en la materia conocen bien un gran número de métodos de generación de anticuerpos quiméricos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.502.167, 5.500.362, 5.491.088, 5.482.856, 5.472.693, 5.354.847, 5.292.867, 5.231.026, 5.204.244, 5.202.238, 5.169.939, 5.081.235, 5.075.431 y 4.975.369).

[0083] En breve, los anticuerpos enumerados en la Tabla 2 pueden utilizarse fácilmente para generar otros anticuerpos que tengan las mismas o regiones determinantes de complementariedad (CDR) similares.

II. Preparación de moléculas de anticuerpos biespecíficos:

[0084] Los anticuerpos enumerados en la Tabla 2 pueden usarse para preparar anticuerpos biespecíficos de esta invención. Los anticuerpos pueden prepararse usando una diversidad de métodos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden prepararse por separado (por ejemplo, usando síntesis química de proteínas, métodos de expresión recombinante, tecnología de hibridoma, etc.) y después unirse químicamente entre sí, directamente o a través de un enlazador. Cuando ambos anticuerpos son anticuerpos de cadena sencilla unidos directamente en los extremos terminales o a través de un enlazador peptídico, la molécula biespecífica puede sintetizarse químicamente, o más preferentemente, se expresa de forma recombinante.

[0085] Los expertos en la materia conocen bien medios para conjugar químicamente moléculas. Los procedimientos para acoplar químicamente dos anticuerpos son sencillos. Los polipéptidos contienen típicamente una diversidad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH) o amina libre (-NH₂) que están disponibles para la reacción con grupos funcionales adecuados en el anticuerpo correspondiente o en un enlazador.

[0086] Como alternativa, los anticuerpos pueden derivatizarse para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas enlazadoras tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford Illinois. Los expertos en la materia conocen una diversidad de enlazadores adecuados (véanse, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea N° 188.256; las Patentes de Estados Unidos N° 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; 4.569.789; y 4.589.071; y Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075) y también se describen a continuación enlazadores adecuados con respecto al acoplamiento de efectores con anticuerpos biespecíficos.

[0087] Las moléculas de anticuerpos bs-scFv pueden producirse por expresión de fragmentos de anticuerpos recombinantes producidos en células hospedadoras. Los genes para estos genes de scFv pueden unirse operativamente directamente o mediante una molécula enlazadora. Las moléculas de ácido nucleico resultantes que codifican los fragmentos de anticuerpos bs-scFv se insertan en vectores de expresión y se introducen en células hospedadoras. Las moléculas de anticuerpos bs-scFv resultantes se aíslan después y se purifican a partir del sistema de expresión.

[0088] En determinadas realizaciones preferidas, las moléculas de anticuerpos scFv se emparejan entre sí con una nueva molécula enlazadora diseñada para proteger frente a la degradación proteolítica de las moléculas de anticuerpos bs-scFv. Este enlazador carece típicamente de un sitio de escisión proteolítica y, típicamente, se caracteriza por contener aminoácidos principalmente neutros (no cargados). Una secuencia enlazadora de este tipo tiene la secuencia: Asn Ser Gly Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ser Gly Glu Gly Ser Gly Ser Lys Leu (SEC ID N°: 37).

[0089] La pureza de las moléculas de anticuerpos bs-scFv de la invención puede evaluarse usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, ELISA, inmunohistoquímica, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), transferencia de western, resonancia de plasmón superficial y espectroscopía de masas.

[0090] Usando los anticuerpos, secuencias de ácido nucleico y otros contenidos proporcionados en la presente memoria, los anticuerpos biespecíficos de esta invención pueden expresarse de forma recombinante usando métodos de rutina tales como los expuestos en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, o Ausubel et al. (eds) (1997) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons N. Y. Además,

se exponen métodos ilustrativos de producción de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos recombinantes de esta invención en los Ejemplos. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es simplemente con fines ilustrativos.

5 **III. Restos quiméricos que comprenden anticuerpos biespecíficos**

10 **[0091]** En muchas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos anti-miembros de la familia de EGFR de esta invención son capaces de inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas sin el uso de ningún “efector” adicional. Los anticuerpos biespecíficos pueden acoplarse además con un efector, formando de este modo restos quiméricos que preferentemente dirigen/administran el efector a una célula que sobreexpresa los miembros de la familia de EGFR.

15 **[0092]** Puesto que las proteínas EGFR se encuentran con frecuencia reguladas positivamente en células cancerosas, estas proteínas pueden aprovecharse como dianas para la administración eficaz y específica de un efector (por ejemplo, una molécula efectora tal como una citotoxina, un radiomarcador, etc.) a diversas células cancerosas (por ejemplo, células aisladas, células metastásicas, células de tumores sólidos, etc.), en particular a células cancerosas epiteliales (por ejemplo, células de cáncer de mama). Las proteínas EGFR diana no tienen que existir únicamente en células cancerosas para proporcionar una diana eficaz. La expresión diferencial de EGFR en células cancerosas en comparación con células sanas es suficiente para proporcionar una ventaja de direccionamiento significativa y útil, es decir, dando como resultado una administración preferente del resto efector a y/o en la célula (por ejemplo, cancerosa) diana.

20 **[0093]** Los anticuerpos biespecíficos de esta invención pueden utilizarse en una estrategia de “predireccionamiento” (dando como resultado la formación de un resto quimérico en el sitio diana después de la administración del resto efector) o en una estrategia de “direccionamiento” en la que el anticuerpo biespecífico se acopla con una molécula efectora antes del uso para proporcionar un resto quimérico.

25 **[0094]** Una molécula quimérica o composición quimérica o resto quimérico se refiere a una molécula o composición en la que dos o más moléculas o composiciones que existen por separado en su estado nativo se unen entre sí para formar un solo resto molecular o composición que tenga la funcionalidad deseada de sus miembros constituyentes. Típicamente, una de las moléculas constituyentes de un resto quimérico es una “molécula de dirección”, es decir, en el presente caso un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a uno o más miembros de la familia de EGFR.

30 **[0095]** Otro constituyente de la molécula quimérica es un “efector”. La molécula efectora se refiere a una molécula o grupo de moléculas que se transportarán específicamente a la célula diana (por ejemplo, una célula que sobreexpresa un miembro de la familia de EGFR). La molécula efectora tiene típicamente una actividad característica que es la de administrarse a la célula diana. Las moléculas efectoras incluyen, pero sin limitación, citotoxinas, marcadores, radionúclidos, ligandos, anticuerpos, fármacos, liposomas y similares.

35 **[0096]** El efector puede ser un marcador detectable, incluyendo los marcadores detectables preferidos radionúclidos. Entre los radionúclidos y marcadores útiles en los conjugados de radionúclido-quelante (por ejemplo, biotina), los emisores de gamma, emisores de positrones, emisores de rayos x y emisores de fluorescencia son adecuados para la localización, diagnóstico y/o determinación de fase, y/o terapia, mientras que los emisores de beta y alfa y los agentes de captura de neutrones y electrones tales como boro y uranio también pueden usarse para terapia.

40 **[0097]** Los marcadores detectables pueden usarse junto con un detector externo y/o un detector interno y proporcionar un medio para localizar y/o visualizar eficazmente, por ejemplo, células cancerosas que sobreexpresen uno o más miembros de la familia de EGFR. Dicha detección/visualización puede ser útil en diversos contextos incluyendo, pero sin limitación, entornos preoperatorios e intraoperatorios, por ejemplo, en un método de detección y localización intraoperatoria de tejidos que tengan marcadores de la familia de EGFR en el cuerpo de un mamífero. Estos métodos implican típicamente administrar al mamífero una composición que comprende, en una cantidad suficiente para la detección por un detector (por ejemplo, una sonda de detección de gamma), un anticuerpo biespecífico de esta invención marcado con un marcador detectable (por ejemplo, anticuerpos anti-MUC-1 de esta invención marcados con un radioisótopo, por ejemplo, ¹⁶¹Tb, ¹²³I, ¹²⁵I y similares), y después permitir que la sustancia activa sea captada por el tejido diana y, preferentemente después del aclaramiento sanguíneo del marcador, someter al mamífero a una técnica de radioinmuno-detección en el área pertinente del cuerpo, por ejemplo, usando una sonda de detección de gamma.

45 **[0098]** El anticuerpo biespecífico unido a marcador puede usarse en la técnica de cirugía radioguiada, en la que pueden detectarse y localizarse de forma intraoperatoria tejidos pertinentes en el cuerpo de un sujeto por medio de un detector, por ejemplo, una sonda de detección de gamma. El cirujano puede, de forma intraoperatoria, usar esta sonda para encontrar los tejidos en los que ha tenido lugar la captación del compuesto marcado con un radioisótopo, es decir, por ejemplo, un emisor de fotones gamma de baja energía.

[0099] Además de marcadores detectables, los efectores preferidos incluyen citotoxinas (por ejemplo, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina, toxina de Diphtheria y similares) o fármacos o profármacos citotóxicos, en cuyo caso el resto quimérico puede actuar como un agente de destrucción de células potente que dirige específicamente la citotoxina a células que llevan el miembro o miembros de la familia de EGFR.

[0100] El efector puede incluir un liposoma que encapsula un fármaco (por ejemplo, un fármaco anti-cáncer tal como doxorubicina, vinblastina, taxol, etc.), un antígeno que estimula el reconocimiento de las células unidas por componentes del sistema inmune, un anticuerpo que se une específicamente a componentes del sistema inmune y los dirige contra la célula o células diana, y similares.

A) La molécula de dirección biespecífica anti-miembros de la familia de EGFR

[0101] En los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, el resto de dirección puede ser un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a dos miembros de la familia de EGFR como se describe en la presente memoria. El anticuerpo biespecífico puede comprender anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fv, Fab, etc.) y/o anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, scFv).

B) Ciertos efectores preferidos

1) Composiciones de formación de imágenes

[0102] Las moléculas quiméricas descritas en la presente memoria pueden usarse para dirigir marcadores detectables a un sitio tumoral. Esto puede facilitar la detección y/o localización de tumores. El componente efector de la molécula quimérica puede ser un marcador "radiopaco", por ejemplo, un marcador que puede visualizarse fácilmente usando rayos x. Los expertos en la materia conocen bien materiales radiopacos. Los materiales radiopacos más comunes incluyen sales de yoduro, bromuro o bario. También se conocen otros materiales radiopacos e incluyen, pero sin limitación, derivados de bismuto orgánico (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.939.045), poliuretanos radiopacos (véase la Patente de Estados Unidos 5.346.9810), compuestos de organobismuto (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.256.334), complejos poliméricos de bario radiopaco (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4.866.132) y similares.

[0103] Los anticuerpos biespecíficos de esta invención pueden acoplarse directamente al resto radiopaco o pueden unirse a un "paquete" (por ejemplo, un quelato, un liposoma, una micropelícula polimérica, etc.) que lleve o contenga el material radiopaco como se describe a continuación.

[0104] Además de marcadores radiopacos, también son adecuados para su uso otros marcadores. Los marcadores detectables adecuados para su uso como el componente de molécula efectora de las moléculas quiméricas incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

[0105] Diversos radiomarcadores preferidos incluyen, pero sin limitación ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{12}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh y ^{111}Ag .

[0106] Los expertos en la materia conocen bien medios de detección de dichos marcadores. Por lo tanto, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse usando una película fotográfica, detectores de centelleo y similares. Los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado.

[0107] Pueden usarse inmunoconjugados (restos quiméricos) para la detección de tumores y/o otras células cancerosas. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos de esta invención pueden conjugarse con radioisótopos emisores de gamma (por ejemplo, Na-22, Cr-51, Co-60, Tc-99, I-125, I-131, Cs-137, Ga-67, Mo-99) para la detección con una cámara de gamma, con isótopos emisores de positrones (por ejemplo, C-11, N-13, O-15, F-18, y similares) para la detección en un instrumento de tomografía por emisión de positrones (PET), y con agentes de contraste metálicos (por ejemplo, reactivos que contienen Gd, reactivos que contienen Eu y similares) para formación de imágenes de resonancia magnética (MRI). Además, los anticuerpos biespecíficos de esta invención pueden usarse en la inmunohistoquímica tradicional (por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores nanocristalinos, marcadores enzimáticos y colorimétricos etc.)

2) Radiosensibilizantes

5 **[0108]** El efector puede ser un radiosensibilizante que aumente el efecto citotóxico de la radiación ionizante (por ejemplo, como podría producirse mediante una fuente de ^{60}Co o rayos x) en una célula. Se conocen numerosos agentes radiosensibilizantes e incluyen, pero sin limitación, compuestos derivados de benzoporfirina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.945.439), óxidos de 1,2,4-benzotriazina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.849.738), compuestos que contienen ciertas diaminas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.700.825), BCNT (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.872.107), derivados de amida de ácido nitrobenzoico radiosensibilizantes (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4.474.814), diversos derivados heterocíclicos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.064.849), complejos de platino (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4.921.963) y similares.

3) Ligandos

15 **[0109]** La molécula efectora también puede ser un ligando, una etiqueta epitópica o un anticuerpo. Los ligandos y anticuerpos particularmente preferidos son los que se unen a marcadores de superficie en células inmunes. Las moléculas quiméricas que utilizan dichos anticuerpos como moléculas efectoras actúan como enlazadores bifuncionales que establecen una asociación entre las células inmunes que llevan a un compañero de unión para el ligando o anticuerpo y las células tumorales que expresan el miembro o miembros de la familia de EGFR.

3) Quelatos

20 **[0110]** Muchos de los agentes farmacéuticos y/o radiomarcadores descritos en la presente memoria se proporcionan preferentemente como un quelato, particularmente cuando se utiliza una estrategia de predirecciónamiento. La molécula quelante se acopla típicamente a una molécula (por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina, etc.) que se une específicamente a una etiqueta epitópica unida al anticuerpo biespecífico.

30 **[0111]** Los expertos en la materia conocen bien grupos quelantes. Los grupos quelantes pueden proceder de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA), ácido ciclohexil 1,2-diamino tetraacético (CDTA), ácido etilenglicol-O,O'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N,N-bis(hidroxibencil)-etilendiamino-N,N'-diacético (HBED), ácido trietilentetramino hexaacético (TTHA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido hidroxietildiamina triacético (HEDTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), DTPA sustituido, EDTA sustituido y similares.

35 **[0112]** Los ejemplos de ciertos quelantes preferidos incluyen 2-iminotiolanos y 2-iminotiociclohexanos sustituidos o no sustituidos, en particular, 2-imino-4-mercaptometiltiolano y SAPS (N-(4-[^{211}At]astatofenetil)succinimato).

40 **[0113]** Un agente quelante, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N,N'',N'''-tetraacético (DOTA), es de interés particular debido a su capacidad para quelar varios metales diagnóstica y terapéuticamente importantes, tales como radionúclidos y radiomarcadores.

45 **[0114]** Se han descrito conjugados de DOTA y proteínas tales como anticuerpos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.428.156 muestra un método para conjugar DOTA con anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Para generar estos conjugados, un grupo ácido carboxílico de DOTA se convierte en un éster activo que puede reaccionar con un grupo amina o sulfhidrilo en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Lewis et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5: 565-576, describe un método similar en el que un grupo carboxilo de DOTA se convierte en un éster activo y el DOTA activado se mezcla con un anticuerpo, uniendo el anticuerpo a DOTA mediante el grupo épsilon-amino de un resto de lisina del anticuerpo, convirtiendo de este modo un grupo carboxilo de DOTA en un resto amida.

50 **[0115]** Como alternativa, el agente quelante puede acoplarse, directamente o a través de un enlazador, a una etiqueta epitópica o a un resto que se une a una etiqueta epitópica. Se han descrito conjugados de DOTA y biotina (véase, por ejemplo, Su (1995) J. Nucl. Med., 36 (5 Supl): 154P, que describe el enlace de DOTA con biotina mediante derivados de biotina de cadena lateral amino disponible tales como DOTA-LC-biotina o DOTA-bencil-4-(6-amino-caproamida)-biotina). Yau et al., documento WO 95/15335, describe un método de producción de compuestos de nitro-bencil-DOTA que pueden conjugarse con biotina. El método comprende una reacción de ciclación mediante la protección transitoria de un grupo hidroxilo; tosilación de una amina; desprotección del grupo hidroxilo transitoriamente protegido; tosilación del grupo hidroxilo desprotegido; y ciclación de tosilato intramolecular. Wu et al. (1992) Nucl. Med. Biol, 19(2): 239-244 describe una síntesis de agentes quelantes macrocíclicos para radiomarcador proteínas con ^{111}In y ^{90}Y . Wu et al. genera un conjugado de DOTA-biotina marcado para estudiar la estabilidad y la biodistribución de conjugados con avidina, una proteína modelo para estudios. Este conjugado se generó usando una hidrazida de biotina que contenía un grupo amino libre para reaccionar con un derivado de DOTA activado generado *in situ*.

4) Citotoxinas

[0116] Las citotoxinas particularmente preferidas incluyen exotoxinas de *Pseudomonas*, toxinas de *Diphtheria*, ricina y abrina. Las más preferidas son la exotoxina de *Pseudomonas* y la toxina de *Diphtheria*.

[0117] La exotoxina de *Pseudomonas A* (PE) es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis proteica en células eucariotas a través de la inactivación del factor de elongación 2 (EF-2) por catálisis de su ADP-ribosilación (catalizando la transferencia del resto de ADP ribosilo de NAD oxidado sobre EF-2).

[0118] La toxina contiene tres dominios estructurales que actúan de común acuerdo para causar la citotoxicidad. El dominio I (aminoácidos 1-252) media la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación hacia el citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) mediada la ADP ribosilación del factor de elongación 2, que inactiva la proteína y causa muerte celular. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) sigue sin estar definida, aunque una gran parte del mismo, los aminoácidos 365-380, puede delecionarse sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 14256-14261.

[0119] Cuando la molécula de dirección (por ejemplo, anti-MUC-1) se fusiona a PE, una molécula de PE preferida es una en la que el dominio I (aminoácidos 1 a 252) se deleciona y los aminoácidos 365 a 380 se han delecionado del dominio Ib. Sin embargo, todo el dominio Ib y una porción del dominio II (aminoácidos 350 a 394) pueden delecionarse, particularmente si las secuencias delecionadas se sustituyen con un péptido de enlace tal como GGGGS (SEC ID N°: 11).

[0120] Además, las moléculas de PE pueden modificarse adicionalmente usando mutagénesis dirigida u otras técnicas conocidas en la materia, para alterar la molécula para una aplicación particular deseada. También pueden usarse medios para alterar la molécula de PE de una forma que no afecte sustancialmente a las ventajas funcionales proporcionadas por las moléculas de PE descritas en la presente memoria, y dichas moléculas resultantes pretenden abarcarse en la presente memoria.

[0121] Para propiedades citotóxicas máximas de una molécula de PE preferida, se recomiendan varias modificaciones en la molécula. Se prefiere una secuencia carboxilo terminal apropiada para la molécula recombinante para translocar la molécula hacia el citosol de células diana. Las secuencias de aminoácidos que se ha descubierto que son eficaces incluyen, REDLK (SEC ID N°: 23) (como en la PE nativa), REDL (SEC ID N°: 24), RDEL (SEC ID N°: 25) o KDEL (SEQ ID N°: 26), repeticiones de las mismas u otras secuencias que funcionen manteniendo o reciclando proteínas hacia el retículo endoplásmico, denominadas "secuencias de retención endoplásmica". Véase, por ejemplo, Chaudhary et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 308-312 y Seetharam et al., J. Biol. Chem. 266: 17376-17381. Las formas preferidas de PE comprenden la molécula de PE denominada PE38QQR (Debinski et al. Bioconj. Chem., 5: 40 (1994)) y PE4E (véase, por ejemplo, Chaudhary et al (1995) J. Biol. Chem., 265: 16306).

[0122] Los expertos en la materia conocen bien métodos de clonación de genes que codifican PE fusionada a diversos ligandos (véase, por ejemplo, Siegall et al. (1989) FASEB J., 3: 2647-2652; y Chaudhary et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4538-4542).

[0123] Como PE, la toxina de *Diphtheria* (DT) destruye células por ADP-ribosilación del factor de elongación 2, inhibiendo de este modo la síntesis de proteína, sin embargo la toxina de *Diphtheria* se divide en dos cadenas, A y B, unidas por un puente disulfuro. Al contrario que PE5, la cadena B de DT, que está en el extremo carboxilo, es responsable de la unión a receptor y la cadena A, que está presente en el extremo amino, contiene la actividad enzimática (Uchida et al. (1972) Science, 175: 901-903; Uchida et al. (1973) J. Biol. Chem., 248: 3838-3844).

[0124] Las proteínas de fusión de molécula de dirección-toxina de *Diphtheria* descritas en la presente memoria pueden tener el dominio de unión a receptor nativo eliminado por truncamiento de la cadena B de la toxina de *Diphtheria*. Se prefiere particularmente DT388, una DT en la que se elimina la secuencia carboxilo terminal que comienza en el resto 389. Chaudhary et al. (1991) Bioch. Biophys. Res. Comm, 180: 545-551. Como las citotoxinas quiméricas de PE, las moléculas de DT pueden conjugarse químicamente con el anticuerpo MUC-I, pero la molécula de dirección puede fusionarse a la toxina de *Diphtheria* por medios recombinantes (véase, por ejemplo, Williams et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 11885-11889).

5) Otros restos terapéuticos

[0125] Otras moléculas efectoras adecuadas incluyen agentes farmacológicos o sistemas de encapsulación que contienen diversos agentes farmacológicos. Por lo tanto, la molécula de dirección de la molécula quimérica puede unirse directamente a un fármaco que se va a administrar directamente al tumor. Dichos fármacos son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, doxorubicina, vinblastina, genisteína, una molécula antisentido y similares.

[0126] Como alternativa, la molécula efectora puede ser un sistema de encapsulación, tal como una cápside viral, un liposoma o micela que contenga una composición terapéutica tal como un fármaco, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido) u otro resto terapéutico que esté preferentemente protegido de la exposición directa al sistema circulatorio. Los expertos en la materia conocen bien medios de preparación de liposomas unidos a anticuerpos. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.957.735, Connor et al (1985) Pharm. Ther., 28: 341-365.

C) Unión de la molécula de dirección a la molécula efectora

[0127] Un experto apreciará que el anticuerpo biespecífico de esta invención y los restos efectores pueden unirse típicamente entre sí en cualquier orden. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la molécula de dirección es una proteína de cadena sencilla, la molécula efectora puede unirse al extremo amino o carboxi terminal de la molécula de dirección. El efector también puede unirse a una región interna del anticuerpo biespecífico, o a la inversa. De forma similar, el anticuerpo biespecífico puede unirse a una localización interna o un extremo terminal de la molécula efectora. En cualquier caso, los puntos de unión se seleccionan de modo que no interfieran con las actividades respectivas del anticuerpo biespecífico o del efector.

[0128] El anticuerpo biespecífico y la molécula efectora pueden unirse por cualquiera de varios medios bien conocidos por los expertos en la materia. Típicamente, la molécula efectora se conjuga, directamente o a través de un enlazador (espaciador) al anticuerpo biespecífico. Sin embargo, cuando tanto la molécula efectora como el anticuerpo biespecífico son ambos polipéptidos, es preferible expresar recombinantemente la molécula quimérica como una proteína de fusión de cadena sencilla.

1) Conjugación de la molécula efectora con la molécula de dirección

[0129] El anticuerpo biespecífico puede conjugarse químicamente con la molécula efectora (por ejemplo, una citotoxina, un marcador, un ligando, un fármaco, un anticuerpo, un liposoma, etc.). Los expertos en la materia conocen bien medios para conjugar químicamente moléculas.

[0130] El procedimiento para unir un agente a un anticuerpo u otra molécula de dirección polipeptídica variará de acuerdo con la estructura química del agente. Los polipéptidos contienen típicamente diversidad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH) o amina libre (-NH₂) que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en una molécula efectora para unir el efector a los mismos.

[0131] Como alternativa, el anticuerpo biespecífico y/o molécula efectora puede derivatizarse para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas enlazadoras tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

[0132] Un "enlazador", como se usa en la presente memoria, es una molécula que se usa para unir la molécula de dirección a la molécula efectora. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con la molécula de dirección como con la molécula efectora. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo biespecífico y la molécula efectora son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro con cisteína). Los enlazadores pueden unirse a los grupos amino y carboxilo de carbono alfa de los aminoácidos terminales.

[0133] Puede usarse un enlazador bifuncional, que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un agente particular y otro grupo reactivo con un anticuerpo, para formar el inmunoconjugado deseado. Como alternativa, la derivatización puede implicar el tratamiento químico del anticuerpo biespecífico, por ejemplo, la escisión por glicol de un resto de azúcar de un anticuerpo glicoproteico con periodato para generar grupos aldehído libres. Los grupos aldehído libres en el anticuerpo pueden reaccionar con grupos amina o hidrazina libres en un agente para unir el agente al mismo. (Véase la Patente de Estados Unidos N° 4.671.958). También se conocen procedimientos para la generación de grupos sulfhidrilo libres en el polipéptido, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.659.839).

[0134] Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazadoras para la unión de diversos compuestos incluyendo quelatos de metales de radionúclidos, toxinas y fármacos a proteínas tales como anticuerpos (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea N° 188.256; las Patentes de Estados Unidos N° 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; 4.569.789 y 4.589.071; y Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res 47: 4071-4075). En particular, la producción de diversas inmunotoxinas es bien conocida dentro de la técnica y puede encontrarse, por ejemplo, en "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpe et al, Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, págs. 168-190 (1982), Waldmann (1991) Science, 252: 1657, Patentes de Estados Unidos N° 4.545.985 y 4.894.443.

[0135] En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula efectora del anticuerpo biespecífico cuando el resto quimérico ha alcanzado a su sitio diana. Por lo tanto, pueden usarse conjugados quiméricos que comprenden enlaces que pueden escindirse en las proximidades del sitio diana cuando el efector debe liberarse en el sitio diana. La escisión del enlace para liberar al agente del anticuerpo puede provocarse por la actividad enzimática o las condiciones a las que se somete el inmunoc conjugado en el interior de la célula diana o en las proximidades del sitio diana. Cuando el sitio diana es un tumor, puede usarse un enlazador que pueda escindirse en las condiciones presentes en el sitio tumoral (por ejemplo, cuando se expone a las enzimas asociadas al tumor o a un pH ácido).

[0136] Los expertos en la materia conocen varios enlazadores escindibles diferentes. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.618.492; 4.542.225 y 4.625-014. Los mecanismos para la liberación de un agente de estos grupos enlazadores incluyen, por ejemplo, irradiación de un enlace fotolábil e hidrólisis catalizada por ácido. La Patente de Estados Unidos N° 4.671.958, por ejemplo, incluye una descripción de inmunoc conjugados que comprenden enlazadores que se escinden en el sitio diana *in vivo* mediante las enzimas proteolíticas del sistema del complemento del paciente. En vista del gran número de métodos que se han descrito para unir una diversidad de compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterápicos, fármacos, toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la materia será capaz de determinar un método adecuado para unir un agente dado a un anticuerpo u otro polipéptido.

2 Conjugación de quelatos

[0137] El efector puede comprender un quelato que se une a un anticuerpo o a una etiqueta epitópica. El anticuerpo biespecífico lleva una etiqueta epitópica o anticuerpo correspondiente, de modo que el simple contacto del anticuerpo biespecífico con el quelato da como resultado la unión del anticuerpo al efector. La etapa de combinación puede realizarse después de que se use el resto (estrategia de predireccionamiento) o el tejido diana puede unirse al anticuerpo biespecífico antes de que se administre el quelato. Los expertos en la materia conocen bien métodos de producción de quelatos adecuados para acoplarse a diversos restos de dirección (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°: 6.190.923, 6.187.285, 6.183.721, 6.177.562, 6.159.445, 6.153.775, 6.149.890, 6.143.276, 6.143.274, 6.139.819, 6.132.764, 6.123.923, 6.123.921, 6.120.768, 6.120.751, 6.117.412, 6.106.866, 6.096.290, 6.093.382, 6.090.800, 6.090.408, 6.088.613, 6.077.499, 6.075.010, 6.071.494, 6.071.490, 6.060.040, 6.056.939, 6.051.207, 6.048.979, 6.045.821, 6.045.775, 6.030.840, 6.028.066, 6.022.966, 6.022.523, 6.022.522, 6.017.522, 6.015.897, 6.010.682, 6.010.681, 6.004.533 y 6.001.329).

3) Producción de proteínas de fusión

[0138] Cuando el anticuerpo biespecífico y/o la molécula efectora son ambas proteínas de cadena sencilla y relativamente cortas (es decir, de menos de aproximadamente 50 aminoácidos) pueden sintetizarse usando técnicas químicas de síntesis de péptidos convencionales. Cuando ambos componentes son relativamente cortos, el resto quimérico puede sintetizarse como un solo polipéptido contiguo. Como alternativa, el anticuerpo biespecífico y la molécula efectora pueden sintetizarse por separado y después fusionarse por condensación del extremo amino terminal de una molécula con el extremo carboxilo terminal de la otra molécula, formando de este modo un enlace peptídico. Como alternativa, el anticuerpo biespecífico y las moléculas efectoras pueden condensarse cada uno con un extremo de una molécula espaciadora peptídica, formando de este modo una proteína de fusión contigua.

[0139] La síntesis en fase sólida, en la que el aminoácido C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble, seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia, es el método preferido para la síntesis química de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Se describen técnicas para la síntesis en fase sólida por Barany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; págs. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963), y Stewart et al, *Solid Phase Peptide Synthesis*. 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, 111. (1984).

[0140] Cuando el anticuerpo biespecífico es un polipéptido de cadena sencilla y el efector es un polipéptido, las proteínas de fusión quiméricas que se describen en la presente memoria pueden sintetizarse usando metodología de ADN recombinante. Generalmente, esto implica crear una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión, colocar el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar la proteína en un hospedador, aislar la proteína expresada y, si es necesario, renaturalizar la proteína.

[0141] El ADN que codifica las proteínas de fusión (por ejemplo, ALM-PE38QQR) descritas en la presente memoria puede prepararse por cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas o síntesis química directa por métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang et al. (1979). *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; el método fosfotriéster de Brown et al. (1979) *Meth Enzymol.* 68: 109-151; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) *Tetra Lett.*, 22: 1859-1862; y el método de soporte sólido de la Patente de Estados Unidos N° 4.458.066.

[0142] La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Éste puede convertirse en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena

sencilla como molde. Un experto reconocerá que aunque la síntesis química de ADN está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas por ligación de secuencias más cortas.

5 **[0143]** Como alternativa, las subsecuencias pueden clonarse y las subsecuencias apropiadas escindirse usando enzimas de restricción apropiadas. Después, los fragmentos pueden ligarse para producir la secuencia de ADN deseada.

10 **[0144]** El ADN que codifica las proteínas de fusión descritas en la presente memoria puede clonarse usando métodos de amplificación de ADN, tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo tanto, por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico se amplifica por PCR, usando un cebador con sentido que contiene el sitio de restricción para NdeI y un cebador antisentido que contiene el sitio de restricción para HindIII. Esto produce un ácido nucleico que codifica la secuencia del anticuerpo biespecífico y que tiene sitios de restricción terminales. Un fragmento PE38QQR puede cortarse del plásmido pWDMH4-38QQR o del plásmido pSGC242FdNI descrito por Debinski et al (1994) Int. J. Cancer, 58: 744-748. La ligación del anticuerpo biespecífico y las secuencias de PE38QQR, y la inserción en un vector produce un vector que codifica el anticuerpo biespecífico unido al extremo amino terminal de PE38QQR (posición 253 de PE). Las dos moléculas se unen mediante una unión de tres aminoácidos que consiste en ácido glutámico, alanina y fenilalanina introducidos por el sitio de restricción.

20 **[0145]** Aunque las dos moléculas preferentemente se unen esencialmente directamente entre sí, un experto apreciará que las moléculas pueden estar separadas por un espaciador peptídico que consiste en uno o más aminoácidos. Generalmente, el espaciador no tendrá una actividad biológica específica distinta de la de las proteínas o conservar cierta distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, los aminoácidos constituyentes del espaciador pueden seleccionarse para influir sobre alguna propiedad de la molécula tal como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobicidad.

25 **[0146]** Las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión pueden expresarse en una diversidad de células hospedadoras, incluyendo *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levaduras y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y líneas celulares de mieloma. El gen de proteína recombinante estará unido operativamente a secuencias de control de la expresión apropiadas para cada hospedador. Para *E. coli*, esto incluye un promotor tal como los promotores de T7, trp o lambda, un sitio de unión al ribosoma y, preferentemente, una señal de terminación de la transcripción. Para células eucariotas, las secuencias de control incluirán un promotor y, preferentemente, un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias donadoras yceptoras de corte y empalme.

35 **[0147]** Los plásmidos descritos en la presente memoria pueden transferirse a la célula hospedadora seleccionada por métodos bien conocidos tales como transformación con cloruro de calcio para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para células de mamíferos. Las células transformadas por los plásmidos pueden seleccionarse por la resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes *amp*, *gpt*, *neo* e *hyg*.

40 **[0148]** Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification.*, Academic Press, Inc. N.Y.). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de una homogeneidad de al menos aproximadamente el 90 al 95%, y es más preferida una homogeneidad del 98 al 99% o más para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los polipéptidos pueden usarse entonces terapéuticamente.

45 **[0149]** Un experto en la materia reconocerá que después de la síntesis química, la expresión biológica o la purificación, la proteína de fusión dirigida a polipéptido de EGFR puede poseer una conformación sustancialmente diferente a las conformaciones nativas de los polipéptidos constituyentes. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y después provocar que el polipéptido se vuelva a plegar en la conformación preferida. Los expertos en la materia conocen bien métodos de reducción y desnaturalización de proteínas y de inducción de replegamiento (Véase, Debinski et al. (1993) *J. Biol Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4: 581-585; y Buchner, et al. (1992) *Anal. Biochem.*, 205: 263-270).

50 **[0150]** Un experto reconocerá qué modificaciones pueden realizarse en las proteínas de fusión sin disminuir su actividad biológica. Algunas modificaciones pueden realizarse para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula de dirección en una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida al extremo amino terminal para proporcionar un sitio de inicio, o aminoácidos adicionales colocados en cualquier extremo terminal para crear sitios de restricción o codones de terminación convenientemente localizados.

65

IV. Usos de moléculas de anticuerpos biespecíficos y/o restos quiméricos:

5 **[0151]** Los anticuerpos biespecíficos que tienen afinidad por dos antígenos distintos tienen amplias aplicaciones en terapia y diagnóstico. En concreto, las moléculas de anticuerpos bs de la invención (por ejemplo, bs-scFv) pueden usarse: (1) para alterar directamente el crecimiento de tumores que sobreexpresen miembros de la familia de proteínas de EGFR; (2) en combinación con otros agentes citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterápicos, radiación de haz externo, radioisótopos dirigidos y otros anticuerpos o inhibidores de la transducción de señales); y (3) para reclutar una diversidad de agentes citotóxicos o células efectoras diferentes directamente hacia células tumorales diana que expresen miembros de la familia de proteínas de EGFR.

10 **[0152]** El direccionamiento de agentes citotóxicos o células efectoras hacia células tumorales específicas utilizando las moléculas de anticuerpos bs-scFv de la invención proporciona una especificidad dirigida a tumores añadida debido a la expresión aumentada de estas dianas en células tumorales respecto al tejido normal. Además, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a múltiples receptores o componentes de receptores, entrecruzando de este modo receptores o componentes de receptores, produciendo un efecto citotóxico y/o citostático. Típicamente, los agentes basados en anticuerpos que sólo se unen a una diana en tejido normal no entrecruzarán los receptores y desencadenarán resultados citotóxicos.

15 **[0153]** Además, los anticuerpos mono-específicos muestran típicamente menor avidez hacia la célula diana. Por el contrario, los anticuerpos biespecíficos de esta invención muestran mayor avidez hacia la célula o células diana, lo que contribuye a estabilizar el complejo de anticuerpo/diana y proporciona una asociación a largo plazo del anticuerpo con la célula, proporcionando de este modo una especificidad añadida por el agente en células tumorales que sobreexpresan ambas dianas.

20 **[0154]** Además, la unión de anticuerpos a los miembros de la familia de proteínas de EGFR con frecuencia desencadena la internalización de estas proteínas, haciendo que estos anticuerpos sean plataformas eficaces para la administración de toxinas, fármacos, radioisótopos u otros agentes citotóxicos. Por lo tanto, la combinación de estas moléculas de bs-scFv con agentes citotóxicos o de otro tipo (efectores), por ejemplo, en un resto quimérico, dará como resultado una administración eficaz a células que sobreexpresen ambas dianas, aumentando de este modo la especificidad y eficacia de la terapia. Por incorporación de secuencias adicionales (por ejemplo, brazos de dirección de receptor de Fc) que interactúen con células efectoras, también puede incorporarse un aumento similar en la especificidad de direccionamiento en estrategias de tratamiento basadas en células efectoras.

25 **[0155]** Las moléculas de anticuerpos biespecíficos de la invención también pueden usarse en terapia génica para la dirección e internalización directa de ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos (por ejemplo, exotoxina de Pseudomonas, toxina de Diphtheria, diversos genes supresores de tumores, diversos marcadores, etc.). Además, los anticuerpos biespecíficos pueden conjugarse, por ejemplo, mediante un quelato con restos radiactivos citotóxicos (por ejemplo, ²¹¹At), con agentes potenciadores de la radiación y con diversos marcadores detectables (por ejemplo, marcadores radiopacos). Además, las moléculas de anticuerpos biespecíficos pueden acoplarse a lípidos, liposomas, dendrímeros y similares. Los lípidos, liposomas y dendrímeros pueden combinarse con y/o encapsular diversos restos terapéuticos (por ejemplo, fármacos anticancerosos incluyendo, pero sin limitación, agentes alquilantes tales como busulfán, clorambucilo, cisplatino, cianomorfolinodoxorubicina, etc., agentes antimetabólicos tales como alcoholchicina, colchicina, taxol, vinblastina, vincristina y similares, inhibidores de la topoisomerasa I tales como camptotecina, aminocamptotecina y similares, inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, amonafida, daunorubicina, desoxidoxorubicina, mitoxantrona y similares, antimetabolitos de ARN/ADN, tales como acivicina, ftorafur, metotrexato, trimetrexato y similares; antimetabolitos de ADN tales como 2' desoxi-5-fluorouridina, ciclotidina, guanazol y similares). Los lípidos, liposomas y dendrímeros también pueden formar complejos con agentes terapéuticos proteicos, ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, restos terapéuticos y similares.

30 **[0156]** Cuando se usan como componente de direccionamiento de un resto quimérico, como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos biespecíficos de esta invención preferentemente dirigen/administran el efector asociado a la célula o células diana que expresan las proteínas EGFR diana. Aumentando la asociación (por ejemplo, la duración del contacto o la cantidad de contacto) del efector con la célula (en contacto o estrecha proximidad), los anticuerpos de esta invención aumentan la probabilidad de que el efector se internalice en la célula y/o ejerza su actividad característica en esa célula.

35 **[0157]** Por lo tanto, por ejemplo, los liposomas dirigidos de anticuerpos biespecíficos u otras vesículas terapéuticas (liposomas, virus, etc.) muestran una exposición aumentada (duración/concentración) a tumores diana. Los liposomas pueden tachonarse mediante las moléculas de anticuerpos bs-scFv de la invención para facilitar el direccionamiento específico de tumor. Agentes anticancerosos tales como agentes quimioterápicos, anticuerpos, moléculas antisentido y/o radioisótopos pueden encapsularse en liposomas así modificados.

40 **[0158]** Las moléculas de anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bs-scFv) pueden usarse para dirigir vectores de terapia génica, incluyendo, pero sin limitación, virus modificados, a células que expresen ambos antígenos diana. También pueden utilizarse virus para administrar los genes para estas moléculas de anticuerpos

bs-scFv a células tumorales en las que podrían producirse y secretarse al entorno celular o, a través de la adición de secuencias de direccionamiento intracelular adicionales, podrían convertirse en intracuerpos que se localicen en compartimentos celulares específicos e inactiven genéticamente (*knock out*) la expresión de sus dianas.

5 **[0159]** Además, las moléculas de anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bs-scFv) de la invención pueden usarse para aprovecharse para detectar la expresión aberrante de miembros de la familia de proteínas de EGFR. Dicha detección puede conducir a un diagnóstico temprano de cánceres asociados con un crecimiento tumoral aberrante facilitado por estas proteínas de superficie celular. En general, la detección de la formación de inmunocomplejos es bien conocida en la técnica y puede conseguirse mediante la aplicación de numerosas
10 estrategias. Estos métodos se basan generalmente en la detección de un marcador o indicador, tal como cualquier etiqueta o marcador radiactivo, fluorescente, biológico o enzimático de uso convencional en la técnica. Las Patentes de Estados Unidos acerca del uso de dichos marcadores incluyen las Patentes de Estados Unidos N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Por supuesto, se pueden descubrir ventajas
15 adicionales mediante el uso de un ligando de unión secundario tal como un anticuerpo secundario o una disposición de unión a ligando de biotina/avidina, como se sabe en la técnica.

V. Administración de moléculas de anticuerpos bs-scFv:

A) Formulaciones farmacéuticas

20 **[0160]** Los anticuerpos biespecíficos o moléculas de anticuerpos bs-scFv o restos quiméricos, como se describen en la presente memoria, incluyen composiciones farmacológicas a granel útiles en la fabricación de composiciones no farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente (es decir, sujeto humano o no
25 humano) que pueden usarse directamente y/o en la preparación de formas de dosificación unitarias. Dichas composiciones pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y/o restos quiméricos que comprenden dichos anticuerpos) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 **[0161]** Como se ha indicado anteriormente, los agentes descritos en la presente memoria pueden usarse en una amplia diversidad de contextos incluyendo, pero sin limitación, la detección y/o formación de imágenes de tumores o células cancerosas, la inhibición del crecimiento tumoral y/o del crecimiento y/o proliferación de células cancerosas, y similares. Uno o más anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos pueden administrarse por inyección, es decir, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea,
35 intraduodenal o intraperitoneal. Además, los compuestos pueden administrarse por inhalación, por ejemplo, por vía intranasal. Además, ciertos compuestos pueden administrarse por vía oral o transdérmica.

[0162] La expresión "farmacéuticamente aceptable" puede significar autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado, o enumerado en la farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos, o adecuado para su
40 administración a un animal o ser humano. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo o incompleto)), excipiente o medio de soporte con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se
45 administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo,
50 glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

55 **[0163]** Generalmente, los ingredientes de las composiciones descritas en la presente memoria se suministran por separado o se mezclan entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado deshidratado en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, pueden dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se
60 administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[0164] Las composiciones descritas en la presente memoria pueden proporcionarse como formas neutras o formas de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de

sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

5 **[0165]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria pueden fabricarse por medio de procedimientos de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de forma convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o adyuvantes fisiológicamente aceptables que faciliten el procesamiento de las moléculas en preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada.

15 **[0166]** Para administración tópica o transdérmica, los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados, y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria pueden formularse como soluciones, geles, pomadas, cremas, lociones, emulsiones, suspensiones, etc., como se conocen bien en la técnica. Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para su administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosa, por inhalación, oral o pulmonar.

20 **[0167]** Para inyección, los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, las composiciones que comprenden el agente o agentes quelantes de hierro pueden estar en forma de polvo para su constitución con un medio de soporte adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes del uso.

[0168] Para la administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados para la barrera a atravesar en la formulación. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.

30 **[0169]** Para administración oral, los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria pueden formularse fácilmente por combinación del agente o agentes con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que el agente o agentes se formen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para su ingestión oral por un paciente a tratar. Para formulaciones sólidas orales, tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes de unión. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico, o una sal del mismo tal como alginato sódico.

[0170] Si se desea, las formas de dosificación sólida pueden estar recubrirse con azúcares o recubrimientos entéricos usando técnicas convencionales.

45 **[0171]** Para preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Además, pueden añadirse agentes saporíferos, conservantes, agentes colores y similares.

50 **[0172]** Para la administración bucal, el agente o agentes quelantes de hierro pueden adoptar la forma de comprimidos, pastillas, etc., formuladas de forma convencional.

55 **[0173]** Para su administración por inhalación, los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria se administran convenientemente en forma de una pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o de un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse que contengan una mezcla en polvo del agente o agentes quelantes de hierro y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

60 **[0174]** Los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

65

[0175] Además de las formulaciones descritas anteriormente, los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria también pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, el agente o agentes descritos en la presente memoria pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

[0176] También pueden emplearse otros sistemas de administración farmacéutica. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de medios de soporte de administración que pueden usarse para administrar los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria. También pueden emplearse ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque habitualmente a costa de una mayor toxicidad. Además, los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria pueden administrarse usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación sostenida y son bien conocidos por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar el agente o agentes activos durante unos pocos días, unas pocas semanas o hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del agente o agentes, pueden emplearse estrategias adicionales para su estabilización.

[0177] Como los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria pueden contener cadenas laterales o extremos terminales cargados, pueden incluirse en cualquiera de las fórmulas descritas anteriormente como los ácidos o bases libres o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas sales que conservan sustancialmente la actividad biológica de las bases libres y que se preparan por reacción con ácidos inorgánicos. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en agua y otros disolventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

B) Dosificaciones eficaces

[0178] Los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria se usarán generalmente en una cantidad eficaz para conseguir el propósito deseado (por ejemplo, formar imágenes de un tumor o célula cancerosa, inhibir al crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas, etc.). Los grupo anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados, y/o restos quiméricos utilizados en los métodos descritos en la presente memoria se administran a una dosis que es eficaz para inhibir parcialmente o totalmente la proliferación y/o crecimiento de células cancerosas, o para permitir la visualización de una célula cancerosa o tumor caracterizado por la sobreexpresión de una proteína de la familia de EGFR. Pueden seleccionarse dosificaciones que inhiban el crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas al 90%, más preferentemente al 95%, y más preferentemente al 98% o 99% de nivel de confianza. Las cantidades eficaces preferidas son aquellas que reducen o impiden el crecimiento de tumores o que facilitan la detección y/o visualización de células cancerosas. Con respecto a inhibidores del crecimiento y de la proliferación celular, los compuestos también pueden usarse profilácticamente a los mismos niveles de dosis.

[0179] Típicamente, los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para reducir o prevenir la aparición o la progresión (por ejemplo, crecimiento y/o proliferación) de una célula cancerosa y/o un tumor. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

[0180] Para la administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en circulación que incluya la CI_{50} según se determina en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos.

[0181] Las dosificaciones iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en la materia. Un experto en la materia podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en datos de animales.

[0182] La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de los inhibidores que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico.

[0183] Los expertos en la materia conocen dosificaciones para agentes terapéuticos típicos. Además, dichas dosificaciones son típicamente recomendadas por naturaleza y pueden ajustarse dependiendo del contexto

terapéutico particular, la tolerancia del paciente, etc. Pueden administrarse administraciones individuales o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y frecuencia según sea necesario y tolerado por el paciente.

5 [0184] Una dosificación inicial de aproximadamente 1 µg, preferentemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por kilogramo diarios puede ser eficaz. Se prefiere un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg. Las dosificaciones, sin embargo, pueden variarse dependiendo de las necesidades del paciente, la gravedad de la afección que se esté tratando y el compuesto que se esté empleando. La determinación de la dosificación apropiada para una situación particular está dentro de la especialidad en la técnica. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones menores que son inferiores a la
10 dosis óptima del compuesto. Después de eso, la dosificación se aumenta mediante pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto óptimo en las circunstancias. Por comodidad, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día si se desea. Las dosificaciones típicas estarán entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 mg/kg, e idealmente de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mg/kg.

15 [0185] En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de los anticuerpos biespecíficos y/o moléculas quiméricas puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Un experto en la materia será capaz de optimizar dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin una experimentación excesiva. La cantidad de anticuerpo y/o resto quimérico dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, del peso del sujeto, de la gravedad de la afección, de la forma de administración y del juicio del médico que lo prescriba.

20 [0186] La terapia puede repetirse intermitentemente. La preparación farmacéutica que comprende las moléculas de anticuerpos biespecíficos puede administrarse a intervalos apropiados, por ejemplo, al menos dos veces al día o más hasta que se reduzcan o alivien los síntomas patológicos, después de lo cual la dosificación puede reducirse a un nivel de mantenimiento. El intervalo apropiado en un caso particular dependería normalmente de la afección del
25 paciente. La terapia puede proporcionarse en solitario o en combinación con otros fármacos y/o radioterapia y/o procedimientos quirúrgicos.

C) Toxicidad.

30 [0187] Preferentemente, una dosis terapéuticamente eficaz de anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria proporcionará un beneficio terapéutico sin causar una toxicidad sustancial.

35 [0188] La toxicidad de los agentes descritos en la presente memoria puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, determinando la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) o la DL₁₀₀ (la dosis letal para el 100% de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren agentes que muestran altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación que no sea tóxico para su uso en seres humanos. La dosificación
40 de los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados y/o restos quiméricos descritos en la presente memoria se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la dosis eficaz con escasa o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse por el médico individual en vista de la afección del
45 paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al. (1975) en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Cap.1, pág.1).

VI. Kits.

50 [0189] Se describen en la presente memoria kits que comprenden los anticuerpos biespecíficos de la invención para su uso en la detección de células que expresen o sobreexpresen miembros de la familia de proteínas de EGFR *in vivo* y/o en muestras biológicas. Dichos kits también se proporcionan para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células que expresen o sobreexpresen miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, células cancerosas).

55 [0190] Los kits comprenden uno o más anticuerpos biespecíficos como se describen en la presente memoria. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos scFv biespecíficos. Dependiendo del uso, los anticuerpos pueden funcionalizarse con enlazadores y/o quelantes para acoplarse a un efector (por ejemplo, un resto radiactivo, un liposoma, una citotoxina, otro anticuerpo, etc.) como se describe en la presente memoria.

60 [0191] Los kits pueden comprender, por ejemplo, las moléculas de anticuerpos bs-scFv de la invención, así como tampones y otras composiciones que se usarán para la detección de las moléculas de anticuerpos bs-scFv.

65 [0192] Los kits también pueden incluir materiales de instrucciones que muestren el uso de los anticuerpos para detectar, por ejemplo, células cancerosas y/o que muestran la combinación de los anticuerpos con reactivos de funcionalización o que muestren el uso de anticuerpos funcionalizados para aplicaciones de formación de imágenes

y/o terapéuticas. El anticuerpo puede proporcionarse funcionalizado con un enlazador y/o un quelante (en un recipiente) junto con uno o más efectores, por ejemplo, citotoxinas, marcadores radiactivos (en un segundo recipiente) de modo que los dos componentes puedan administrarse por separado (por ejemplo, en estrategias de predireccionamiento) o de modo que los dos componentes pueden administrarse poco antes del uso.

[0193] Ciertos materiales de instrucciones proporcionarán un régimen de dosificación recomendado, indicaciones de mostrador y similares. Aunque los materiales de instrucciones comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a tales. Se contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y de comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, pero sin limitación, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones a sitios de internet que las proporcionen.

EJEMPLOS

[0194] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración.

Ejemplo 1

Preparación de moléculas de anticuerpos bs-scFv

[0195] La sobreexpresión de EGFR y HER2/*neu* se ha correlacionado con un mal pronóstico en muchos tumores sólidos. Los anticuerpos que alteran la señalización a través de estos receptores, tales como Herceptina⁷ (anti-HER2) y C225 (anti-EGFR), han demostrado una utilidad significativa en el tratamiento del cáncer. La transducción de señales a través de miembros de la familia de EGFR (EGFR, Her-2/*neu*, Her3 y Her4) depende de la formación de homodímeros, heterodímeros o multímeros heterogéneos de estos receptores desencadenada por la unión de ligando. Se han generado, como se describe a continuación en la presente memoria, moléculas de anticuerpos scFv biespecíficos que se acoplan a múltiples parejas de epítomos de estas proteínas receptoras, para su uso en la prevención de la formación de estos complejos de señalización en células tumorales cancerosas.

1. Materiales y métodos:

[0196] Se proporcionan los siguientes materiales y métodos para facilitar la práctica de la presente invención:

A. Clonación:

[0197] Todos los genes que codifican moléculas de anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) específicas para los diferentes miembros de la familia de EGFR (EGFR, HER2/*neu*, HER3, HER4) se obtuvieron del Dr. Jim Marks (University of California, San Francisco). Los genes de scFv se aislaron a partir de grandes bibliotecas de scFv humanos sin tratamiento previo. Los genes de scFv específicos para las proteínas EGFR se aislaron por selección contra los dominios extracelulares de estas proteínas. Todos los genes de scFv se proporcionaron como insertos en un vector pUC119myc/his, entre los sitios de restricción NcoI y NotI.

1. Construcción de molécula enlazadora de 20 aminoácidos:

[0198] La degradación proteolítica de las moléculas de anticuerpos bs-scFv en circulación puede limitar su eficacia. Por lo tanto, se diseñó y sintetizó un nuevo enlazador de 20 aminoácidos que estaba desprovisto de todos los sitios proteolíticos conocidos. Los aminoácidos empleados en la construcción del enlazador se seleccionaron para que fueran principalmente neutros (no cargados, hidrófobos o hidrófilos) para facilitar un transporte eficaz de la proteína hacia el espacio periplásmico bacteriano. Se sintetizaron los dos cebadores siguientes que codifican la nueva molécula enlazadora: LW583 (5'-AAT TCA GGT GCT GGT ACT TCA GGT TCA GGT GCT TCA GGT GAA GGT TCA GGT TCAA-3', SEC ID N° 12); y LW584 (5'-AGC TTT GAA CCT GAA CCTTCA CCT GAA GCA CCT GAA CCT GAA GTA CCA GCA CCT G-3', SEC ID N° 13).

[0199] La hibridación de estos oligonucleótidos formaba un enlazador de extremos "cohesivos" con extremos digeridos con EcoRI y HindIII. Este producto se insertó en el vector pET20b(+) previamente digerido con EcoRI y HindIII. Se generó el ADN plasmídico a partir de *E. coli* DH5 α transformadas usando un kit disponible en el mercado para el aislamiento y la purificación de ADN plasmídico (Qiagen o Gibco BRL Co.) y se denominó posteriormente "pET20b(+)/Enlazador". La molécula enlazadora está codificada por la secuencia de ácido nucleico siguiente: 5'-AAT TCA GGT GCT GGT ACT TCA GGT TCA GGT GCT TCA GGT GAA GGT TCA GGT TCA AAG CTA->3 (SEC ID N° 14), y la molécula enlazadora resultante tiene la secuencia de aminoácidos siguiente: NSG AGT SGS GAS GEG SGS KL (SEC ID N° 37).

2. Clonación de gen anti-HER3 en vector pET20b(+)/Enlazador:

[0200] El gen que codifica la molécula de anticuerpo scFv anti-HER3, A5, se amplificó a partir del plásmido A5-

pUC19myc/his con los dos cebadores siguientes: LW687 (5'-CGA CCA TGG CCC AGG TGC AGC TGG TGC AG-3', SEC ID N° 15); y LW688 (5'-CGA ATT CAC CTA GGA CGG TCA GCT TGG-3', SEC ID N° 16).

[0201] El producto amplificado y el vector, pET20b(+)/Enlazador, se digirieron ambos con las enzimas NcoI y EcoRI, se ligaron y se transformaron en *E. coli* DH5 α competentes para la producción de ADN plasmídico. Las enzimas seleccionadas dirigían el gen A5 cadena arriba del enlazador. El nuevo plásmido, denominado "pET20b(+)/A5/Enlazador", se aisló y purificó después.

3. Clonación de gen anti-HER2/neu en vector pET20b(+)/A5S/Enlazador:

[0202] El gen que codifica la molécula de anticuerpo scFv anti-HER2/neu, ML3.9, se amplificó a partir del plásmido ML3.9-pUC119myc/his usando los dos cebadores siguientes: LW697 (5'-GGG AAG CTT CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3', SEC ID N° 17); y LW698 (5'-GGG CTC GAG ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT TCC-3', SEC ID N° 18).

[0203] El producto amplificado por PCR y el ADN plasmídico, pET20b(+)/A5/Enlazador, se digirieron con las enzimas de restricción HindIII y XhoI, se ligaron y se transformaron en *E. coli* DH5 α competentes para la producción del nuevo ADN plasmídico, pET20b(+)/A5/Enlazador/ML3.9. Las enzimas seleccionadas dirigían el gen ML3.9 cadena abajo de la secuencia enlazadora. El nuevo plásmido, denominado ApET20b(+)/A5/Enlazador/ML3.9", se aisló y purificó después.

4. Clonación del gen A5/Enlazador/ML3.9 en vector pUC119/myc/his:

[0204] La molécula de ácido nucleico que codifica el producto bs-scFv de pET20b(+) se clonó en un vector pUC119myc/his. Una etiqueta de (histidina)₆ y un codón de "terminación", que son parte del vector pET, se amplificaron junto con la construcción de ácido nucleico A5/Enlazador/ML3.9. La amplificación por PCR se realizó usando los dos cebadores siguientes: LW687 (5'-CGA CCA TGG CCC AGG TGC AGC TGG TGC AG-3', SEC ID N° 15); y LW686 (5'-GATATA ATG CGG CCG CTC AGT GGT GGT GGT GGTG-3'.

[0205] La digestión del vector pUC119myc/his y del producto amplificado con las enzimas NcoI y NotI estaba seguida de una etapa de ligación y transformación de *E. coli* DH5 α . El ADN plasmídico resultante, denominado "pUC/ALM", se purificó y aisló después (Figura 1).

B. Transformación del clon de expresión TG1:

[0206] Se transformó pUC/ALM en la cepa de *E. coli* TG1, y los clones que producían las moléculas de anticuerpos bs-scFv A5/Enlazador/ML3.9 se aislaron de la forma siguiente. Las moléculas de bs-scFv se dializaron durante una noche, se purificaron por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados usando resina Ni-NTA (Quiagen), seguida de cromatografía de exclusión por tamaño en un sistema de HPLC usando una columna Superdex-75 (Pharmacia).

II. Resultados:

[0207] Como prueba de concepto, se crearon dos moléculas de anticuerpos bs-scFv diferentes. La primera, denominada "ALM", estaba compuesta por el scFv A5 y el scFv ML3.9 que se unen específicamente tanto a HER3 como a HER2/neu, respectivamente. La segunda molécula de anticuerpo bs-scFv, denominada "ALF", estaba compuesta por dos moléculas scFv distintas, A5 y F4, ambas con una especificidad por HER3. Ambas moléculas de anticuerpos bs-scFv se clonaron y se expresaron a partir de *E. coli*.

[0208] El ALM se evaluó en una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Su capacidad para unirse simultáneamente tanto a HER3 como a HER2/neu, individualmente y simultáneamente, se demostró por resonancia de plasmón superficial en un instrumento de BIAcore (Figuras 2, 3 y 4). *In vitro*, la incubación de ALM con células de cáncer de mama BT-474 humanas que sobreexpresan tanto HER3 como HER2/neu condujo a una expresión en superficie celular reducida de HER2/neu y HER3 (Figura 5), disminuyó la proliferación en ensayos de MTT (Figura 6), redujo la supervivencia en un ensayo de clonogenicidad (Figura 7) y aumentó la fosforilación, seguido de una desfosforilación marcada de AKT2 (Figura 8), una proteína importante en la ruta apoptótica. Estos efectos eran comparables (ensayo de MTT) o superiores (desfosforilación de AKT2) a los observados usando Herceptina⁷ (no se muestran los datos).

[0209] *In vivo*, el ALM radioyodado presentaba un direccionamiento a tumores específico aumentado en las 24 horas siguientes a su administración a ratones inmunodeficientes que llevaban xenoinjertos de tumores BT-474 humanos s.c. (Figura 9).

[0210] Estos resultados demuestran la utilidad de las moléculas de anticuerpos bs-scFv descritas en la presente memoria para el tratamiento de células tumorales que sobreexpresan proteínas EGFR. Las nuevas moléculas de anticuerpos bs-scFv pueden usarse en solitario o en combinación con métodos quimioterápicos existentes para

tratar una diversidad de cánceres incluyendo, pero sin limitación, cánceres de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata y glándula salival.

Ejemplo 2

Estrategias quimioterápicas combinadas

[0211] HER2/*neu* es una diana convincente para estrategias de quimioterapia combinada, ya que se sobreexpresa en una diversidad de tumores y su sobreexpresión se ha correlacionado con un mal pronóstico. Aunque HER2/*neu* carece de un ligando que pueda desencadenar la señalización a través de su dominio de tirosina quinasa, cuando se sobreexpresa a altas concentraciones, HER2/*neu* puede formar espontáneamente homodímeros (Yarden y Sliwkowski (2001) Nature Reviews, Molecular Cell Biology 2: 127-137). HER3 es en muchas formas la opuesta de HER2/*neu*. Se une activamente a ligando pero carece de un dominio tirosina quinasa funcional, requiriendo por lo tanto la heterodimerización con HER2/*neu* para su señalización. De hecho, muchos creen que esta combinación es la más potente de los complejos de señalización formados por los miembros de la familia de EGFR (Lohrisch y Piccart (2001) Sem. Oncology (28) Supl 18: 3-11).

[0212] Muchos agentes quimioterápicos conducen a daños que en una célula normal desencadenarán la apoptosis. Sin embargo, algunas células tumorales tienen una señalización aberrante que interfiere con la ruta de señalización de apoptosis normal. La fosforilación de AKT2 en células tumorales que sobreexpresan HER2/*neu* conduce a una cascada anti-apoptótica que podría interferir con los efectos antitumorales de agentes quimioterápicos o biológicos (Zhou et al. (2000) J. Biol. Chem., 275: 8027-8031). Por lo tanto, dirigirse a HER2/*neu* con moléculas de anticuerpos bs-scFv en combinación con tratamientos quimioterápicos existentes será más eficaz en la destrucción de células tumorales que la quimioterapia solamente.

Ejemplo 3

Eficacia *in vivo* de scFv biespecífico marcado con ²¹¹At

[0213] Se realizó un estudio *in vivo* para evaluar la eficacia de scFv biespecífico marcado con ²¹¹At frente a tumores. El anticuerpo biespecífico según se marcó usando el quelato ²¹¹At-SAPS (N-(4-[²¹¹At]astatofenil)succinimato) (véase, por ejemplo, la Figura 10).

[0214] Cuatro días antes de la inyección de células de cáncer de mama BT474, a los ratones se les implantó un comprimido de β-estradiol. El día cero, a los ratones se les inyectaron 5 x 10⁶ células de cáncer de mama BT474. El día 14, la primera dosis terapéutica de anticuerpo biespecífico conjugado con ²¹¹At (ALM) se administró i.p. a una alta dosis de 80 μg y a una baja dosis de 10 μg. Se administraron dosis terapéuticas posteriores el día 16 y el día 18. Después, se realizó un seguimiento del volumen tumoral como se muestra en las Figuras 11A a 11C.

[0215] El volumen tumoral era generalmente inferior en los animales tratados (Figuras 11B y 11C) en comparación con el control sin tratar (Figura 11A).

Ejemplo 4

Formación de imágenes de cáncer

[0216] La Figura 12 muestra una imagen de PET-CT de dos ratones usando Fv de cadena sencilla biespecífico ALM marcado con yodo 124. Los ratones se inyectaron i.v. con 50 microCuries (50 microgramos) de ALM marcado y se formaron imágenes 48 horas después.

[0217] Esto debería ilustrar la eficacia de los anticuerpos biespecíficos de esta invención para la detección de cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0218]

- 5 <110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA THE FOX CHASE CANCER CENTER
<120> MOLÉCULAS DE ANTICUERPOS FV DE CADENA SENCILLA BIESPECÍFICOS Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS
- 10 <130> UCSF-p013x1.WO
<140> PCT/US2006/023479
<141> 14-06-2006
- 15 <150> US 11/154.103
<151> 15-06-2005
<160> 58
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 291
<212> PRT
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> Anticuerpo sintético
- 30 <400> 1

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

Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile
 165 170 175
 Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Gly Val His
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly
 195 200 205
 Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Phe Lys
 210 215 220
 Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Trp
 245 250 255
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu
 260 265 270
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His
 275 280 285
 His His His
 290

- <210> 2
- <211> 290
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Anticuerpo sintético
- <400> 2

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly
 20 25 30
 Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45
 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu
 115 120 125

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 145 150 155 160

Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 165 170 175

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu
 180 185 190

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

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln
 260 265 270

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His
 275 280 285

His His
 290

- <210> 3
- <211> 288
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Anticuerpo sintético
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (140)..(140)
- <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <400> 3

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

Ile Ser **Glu** **Glu** Asp Leu Asn **Gly** Ala Ala His His **His** His His His
275 280 285

5 <210> 4
<211> 290
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Anticuerpo sintético

<400> 4

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

Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ile Ile Ser Gly Leu Gln Ala Asp Asp Glu
 225 230 235 240
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Ser Ser Ser Thr His Val Ile
 245 250 255
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln
 260 265 270
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His
 275 280 285
 His His
 290

5 <210> 5
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Anticuerpo sintético
 <400> 5

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

Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr
 165 170 175
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp Leu Ala Trp Tyr
 180 185 190
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser
 195 200 205
 Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 225 230 235 240
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Leu Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 245 250 255
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile
 260 265 270
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
 275 280 285

<210> 6
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Anticuerpo sintético
 10
 <400> 6

ES 2 377 098 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly
20 25 30
Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45
Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
65 70 75 80
Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90
Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp

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

5 <210> 7
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo sintético
 10 <400> 7

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45
 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 65 70 75 80
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu
 85 90 95
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Glu Gly Pro Tyr Cys Ser Ser
 115 120 125
 Thr Ser Cys Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 130 135 140
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
 165 170 175
 Leu Gly Gln Thr Val Lys Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Phe Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Thr Leu
 195 200 205
 Val Met Tyr Ala Arg Asn Asp Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe
 210 215 220
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 225 230 235 240
 Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 245 250 255
 Leu Asn Gly Tyr Leu Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 260 265 270
 Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
 275 280 285
 Ala His His His His His His
 290 295

<210> 8
<211> 0

<212> PRT
<213> Secuencia delecionada

5 <400> 8
000

<210> 9
<211> 291
<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>
<223> Anticuerpo sintético

15 <400> 9

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

ES 2 377 098 T3

210	215	220
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 225 230 235 240	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp 245 250 255	Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu 260 265 270
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His 275 280 285	His His His 290	

<210> 10
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Anticuerpo sintético

<400> 10

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 165 170 175
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 180 185 190
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 195 200 205
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 225 230 235 240
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
 245 250 255
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu
 260 265 270
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His
 275 280 285
 His His His
 290

5 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Enlazador peptídico
 <400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

15 <210> 12
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

25 <400> 12
 aattcaggtg ctggtacttc aggttcaggt gcttcaggtg aaggttcagg ttaa 55
 <210> 13

<211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 13
 agctttgaac ctgaacctc acctgaagca cctgaacctg aagtaccagc acctg 55

10 <210> 14
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 14
 aattcagtg ctggtactc aggtcaggt gcttcaggtg aaggtcagg ttcaaagcta 60

20 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 15
 cgaccatggc ccaggtgcag ctggtgcag 29

30 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 16
 cgaattcacc taggacggtc agcttgg 27

40 <210> 17
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 17
 gggaaagcttc aggtgcagct ggtgcagtct gg 32

50 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 18
 gggctcgaga cctaggacgg tcagcttgg tcc 33

60 <210> 19
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<210> 19
<211> 243
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Anticuerpo sintético

10

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly
 145 150 155 160

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

Lys Leu Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Phe Asn
 180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ala Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser
 195 200 205

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

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

Gly Asn Ser

<210> 20
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

5

<223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla

<400> 20

```

atggcccagg tgcagctggt ggagctctggg ggagggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg      60
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgca ctgggtccgc      120
caggctccag gcaaggggct ggagtggttg gcagttatat catatgatgg aagtaataaa      180
tactatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg      240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctgagtatta ctgtgcgaag      300
tattcctttaa actggggcca gggaaacctg gtcaccgtct cctcaggtgg aggcggttca      360
ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcg cagtctgctc tgactcagcc tgcctccgtg      420
tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc tctgcactg gaaccagcag tgacgttggg      480
ggttataact atgcttcctg gtaccaacag caccaggca aggcccccaa actcatgatt      540
tatgaggtca gtaatcggcc ctcaggggtt ttcaatcgtc tctctggcgc caagtctggc      600
aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc caggctgagg acgaggctga ttattactgc      660
aactcatata caagcagcag cacttggttg ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta      720
gggaattcc                                         729
    
```

5

<210> 21

<211> 295

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Anticuerpo sintético.

15

<400> 21

```

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
 1           5           10           15
Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys
 20           25           30
Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35           40           45
Trp Val Ser Ala Ile Ser Ala Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Asn Ser Glu Asn Ser
 65           70           75           80
    
```

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

<210> 22
 <211> 885
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla.

<400> 22

atggcccagg tgcagctgca ggagtcgggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg

60

agactctcct gtgcagcgtc cggattcacc ttcaagagct atggcatgca ctgggtccgc 120
 caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtgctagtgg tggtagcaca 180
 tactacgcag actccgtgaa gggccgcttc accatcttca gagacaattc cgagaactca 240
 ctgtatcttc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtctatta ctgtgcgaga 300
 gattcaagtg ggtcctttga ctactggggc cagggaaacc tggtcacctg ctcctcaggt 360
 ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cggacatcgt gatgaccag 420
 tctccttcca ccctgtccgc atctattgga gacagagtca ccatcacctg ccgggccagt 480
 gagggtattt atcactgggt ggcctgggtat cagcagaagc cagggaaagc ccctaaactc 540
 ctgatctata aggcctctag tttagccagt ggggccccat caaggttcag cggcagtgga 600
 tctgggacag ataccatcac ctgccgggcc agtgagggta tttatcactg gttggcctgg 660
 tatcagcaga agccagggaa agcccctaaa ctctgatct ataaggcctc tagtttagcc 720
 agtggggccc catcaagggt cagcggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc 780
 agcagcctgc aggctgaaga tgtggcagta tactactgtc agcaatatta tagaagtccg 840
 ctcactttcg gtggagggac caagctggag aacaaacgga attcc 885

5 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de señalización de translocación
 <400> 23

Arg Glu Asp Leu Lys
1 5

15 <210> 24
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de señalización de translocación
 <400> 24

Arg Glu Asp Leu
1

25 <210> 25
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de señalización de translocación

<400> 25

Arg Asp Glu Leu
1

5 <210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de señalización de translocación

<400> 26

Lys Asp Glu Leu
1

15 <210> 27
<211> 873
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla

25 <400> 27

atgaaatacc	tattgcctac	ggcagccgct	ggattgttat	tactcgcggc	ccagccggcc	60
atggcccagg	tgcagctggt	ggagtctggg	ggaggcttgg	tacagcctgg	ggggtccttg	120
agactctcct	gtgcagcctc	tggattcacc	tttcgcagct	atgccatgag	ctgggtccgc	180
caggctccag	ggaaggggct	ggagtgggtc	tcagctatta	gtggtcgtgg	tgataacaca	240
tactacgcag	actccgtgaa	gggccggttc	accatctcca	gagacaattc	caagaacacg	300
ctgtatctgc	aatgaacag	cctgagagcc	gaggacacgg	ccgtttatta	ctgtgcgaaa	360
atgacaagta	acgcgttcgc	atgtgactac	tggggccagg	gaaccctggt	caccgtctcc	420
tcagggtggag	gcggttcagg	cggaggtggc	tctggcggtg	gcggatcgca	gtctgtgttg	480
acgcagccgc	cctcagtgtc	tggggcccca	gggcagaggg	tcaccatctc	ctgcactggg	540
agcagctcca	acatcggggc	aggttatggt	gtacactggt	accagcagct	tccaggaaca	600
gccccaaac	tcctcatcta	tggtaacacc	aatcggccct	caggggtccc	tgaccgattc	660
tctggcttca	agtctggcac	ctcagcctcc	ctggccatca	ctgggtcca	ggctgaggat	720
gaggctgatt	attactgcc	gtcctatgac	agcagcctga	gtggttgggt	gttcggcgga	780
gggaccaagc	tgaccgtcct	aggtgcggcc	gcagaacaaa	aactcatctc	agaagaggat	840
ctgaatgggg	ccgcacatca	ccatcatcac	cat			873

30 <210> 28
<211> 873
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 377 098 T3

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla

<400> 28

5

```

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc      60
atggcccagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg      120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttcgcagct atgccatgag ctgggtccgc      180
caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtggtcgtgg tgataacaca      240
tactacgcag actccgtgaa gggccgggtc accatetcca gagacaattc caagaacacg      300
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtttatta ctgtgcgaaa      360
atgacaagta acgcgttcgc atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc      420
tcaggtggag gcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggatcgca gtctgtgttg      480
acgcagccgc cctcagtgtc tggggcccca gggcagaggg tcaccatctc ctgcactggg      540
agcagctcca acatcggggc aggttatggt gtacactggt accagcagct tccaggaaca      600
gcccccaaac tcctcatcta tggtaacacc aatcggccct caggggtccc tgaccgatcc      660
tctggcttca agtctggcac ctcagcctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat      720
gaggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctga gtggttgggt gttcggcgga      780
gggaccaagc tgaccgtcct aggtgcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat      840
ctgaatgggg ccgcacatca ccatcatcac cat      873

```

<210> 29

<211> 864

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla.

<400> 29

atgaaatacc	tattgcctac	ggcagccgct	ggattggtat	tactcgcggc	ccagccggcc	60
atggcccagg	tacagctgca	gcagtcaggg	ggaggcctgg	tcaaacctgg	ggggtcctg	120
agactctcct	gtgcagcctc	tggattcacc	ttcagtagct	atagcatgaa	ctgggtccgc	180
caggtcccag	ggaaggggct	ggagtgggtc	tcatccatta	gtagtagtag	tagttacata	240
tactacgcag	actctgtgaa	gggccgattc	accatctcca	gagacaatgc	caagaactca	300
ctgtatctgc	aatgaacag	cctgagagac	gaggacacgg	ctgtgtatta	ctgtgcgaga	360
gatgacggtc	ccccatcca	gcactggggc	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctcctcacgt	420
ggaggcggtt	caggcggagg	tggctctggc	ggtggcggat	cgcagtctgt	gttgagccag	480
ccgccctcgg	tatctggggc	cccagggcag	agggtcacca	tctcctgcac	tgggagcagc	540
tccaacatcg	gggcaagttt	tgatgtacag	tggtaccagc	aacttccagg	aacagccccc	600
aaactcctca	tctatggtaa	caacaatcgg	ccctcagggg	tccctgaccg	attctctgcc	660
tccaagtctg	gcacctcagc	ctccctgggc	atcaccggac	tccagatcgg	ggacgaggcc	720
gattattact	gcggctcata	tacaggcacc	tactcttggg	tgttcggcgg	agggaccaag	780
gtcaccgtcc	taggtgcggc	cgcagaacaa	aaactcatct	cagaagagga	tctgaatggg	840
gccgcacatc	accatcatca	ccat				864

<210> 30
 <211> 870
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla

10

<400> 30

atgaaatacc tattgccgac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
 atggcccagg tgcagctgca ggagtcgggg ggaggcttgg tcaagcctgg ggggtccctg 120
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagtagct attggatgag ctgggtccgc 180
 caggctccag gaaaggggct ggagtgggtc gccaacataa accgcgatgg aagtgccagt 240
 tattatgtgg actctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacgacgc caagaactca 300
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga 360
 gatcggggcg tggggtactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac cgtctcctca 420
 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcgcagtc tgccttgact 480
 cagcctgcct ccgtgtctgg atctcctgga cagtcgatca ccctcctctg cactggaacc 540
 agcagtgatg ttggtggtta taactttgtc tcctgggtacc aacagcacc caggcaaagcc 600
 cccaaactca tgatttatga tgtcagtgat cgaccctcag gggctcttga tcggttctct 660
 ggctccaagt ctggcaacac ggcctccctg atcatctctg gcctccaggc tgacgacgag 720
 gctgattatt actgcagctc atatggaagc agcagcacc atgtgatttt cggcggaggg 780
 accaaggcca ccgtcctagg tgcggccgca gaacaaaaac tcctctcaga agaggatctg 840
 aatggggccg cacatcacca tcatcaccat 870

<210> 31
 <211> 861
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla.

10

<400> 31

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
 atggcccagg tgcagctggt ggagtcctgg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg 120
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtgaact attatataca ctgggtccgc 180
 caggctccag gcaaggggct ggagtgatg gcagttattt catatgatgg caataataaa 240
 tactacgccg cctccgtgaa ggaccgattc accatctcca gagacaattc caagaacagc 300
 gtgtctctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga 360
 gatctctacg gtgactacgc tcttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
 tcaggtggag gcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggatcggg catccagatg 480
 acccagctc cttccaccct gtctgcatct ctgggagaca gagtcaccat cacttgccgg 540
 gccagtcaga gtattggtag ctggttggcc tggatcagc agaaaccagg gaaagcccct 600
 aaactcctga tctataaggc gtctacttta gaaagtgggg tcccatcaag gttcaccggc 660

agtggatctg ggacagaatt cactctcaca atcagcggcc tccagcctga agattttgca 720
acttatract gtcagaagct tagtagttac ccgctcactt tcggcggagg gaccaaggtg 780
gaaatcaaac gtgCGGCCGC agaacaaaaa CTCatctcag aagaggatct gaatggggcc 840
gcacatcacc atcatcacca t 861

5 <210> 32
 <211> 873
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla.
 <400> 32

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattggtat tactcgcggc ccagccggcc 60
atggcccagg tgcagctggt gcagctctggg ggaggcttgg tacagcctgg caggctccctg 120
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttgatgatt atgccatgca ctgggtccgg 180
caagctccag ggaagggcct ggagtgggtc tcaggattaa gttggaatag tggtagcata 240
ggctatgCGG actctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactca 300
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagacct gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgCGaga 360
gatcttggtg ccaagcagtg gctggagggg tttgactact ggggCCaggg caccctggtc 420
accgtctcct cagggtggagg cggttcaggc ggagggtggct ctggcgggtgg cggatcgaat 480
tttatgctga CTCaggacc tgctgtgtct gtggccttgg gacagacagt caggatcaca 540
tgccaaggag acagcctcag aagctattat gcaagctggt accagcagaa gccaggacag 600
gcccctgtac ttgtcateta tggtaaaaac aaccggccct cagggatccc agaccgattc 660
tctggctcca cctcaggaaa CTCagcttcc ttgaccatca ctggggctca ggcggaagat 720
gaggctgact attactgtaa ctcccgggac agcagtggtg accattgggt gttcggcgga 780
gggaccaagg tcaccgtcct aggtgCGGCC gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 840
ctgaatgggg ccgcacatca ccatcatcac cat 873

15 <210> 33
 <211> 885
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla.
 <400> 33

ES 2 377 098 T3

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc	60
atggccgagg tgcagctggt gcagtctggg gctgaggatga agaagcctgg gtcctcggtg	120
aaggctctcct gcaaggcttc tggaggcacc ttcagcagct atgctatcag ctgggtgcga	180
caggcccctg gacaaggcct tgagtggatg ggagggatca tccctatctt tggtagcaga	240
aactacgcac agaagttcca gggcagagtc acgattaccg cggacgaatc cacgagcaca	300
gcctacatgg aggtgagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga	360
gaggaggggc catattgtag tagtaccagc tgctatgggg cttttgatat ctggggccaa	420
ggcaccctgg tcaccgtctc ctcaggtgga ggcggttcag gcggaggatg ctctggcggt	480
ggcggatcgc agtctgtgct gactcaggac cctgctgtgt ctgtggcctt gggacagaca	540
gtcaagatca catgccaagg agacagcctc agaagctatt ttgcaagctg gtaccagcag	600
aagccaggac aggccctac acttgctcatg tatgctagaa atgaccggcc cgcaggggtc	660
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc	720
cagtctgagg atgaggctga ttattattgt gcagcatggg atgacagcct gaatggttat	780
ctcttcggag ctgggaccaa gctgaccgtc ctagggtcgg ccgcagaaca aaaactcatc	840
tcagaagagg atctgaatgg ggccgcacat caccatcatc accat	885

<210> 34
 <211> 861
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla.

10

<400> 34

ES 2 377 098 T3

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattggtat tactcgcggc ccagccggcc 60
atgccccagg tgcagctgca ggagtcgggc ccaggactgg tgaagccttc ggagaccctg 120
tccctcacct gcactgtctc tgggtggctcc ttcagaagtt actactggag ctggatccgg 180
tagccccag ggaagggact ggagtgata gggatatct ttacagtgg gagcaccaac 240
tacaatccct ccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc 300
tccctgaagc tgagctcttt gaccgctgcg gacacggccg tgtattattg tgcgagagga 360
catttggggg agttaggatg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
tcaagtggag gcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggatcgga catccagatg 480
accagttctc catcctccct gtctgcatct gtaggagaca gaggcaccat cacttgccag 540
gcgagtcagg acattagcaa ctatttaaatt tggatcagc agaagccggg gaaagcccct 600
aaactcctga tctttgctgc atcccgttta gcgagcgggg tcccctcaag attcagcggc 660
agtggatctg gcacagattt cagtctcacc atcagcagcc tgcagcctga cgattttgca 720
acttattatt gtctacaaga ttccgattac cccctcactt tcggcggagg gaccaaggtg 780
gaaatcaaac gtgcggccgc agaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gaatggggcc 840
gcacatcacc atcatcacca t 861

5 <210> 35
<211> 873
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Anticuerpo sintético.

<400> 35

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattggtat tactcgcggc ccagccggcc 60
atggcccagg tgcagctggt gcagttcggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg 120
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgcatgag ctgggtccgc 180
caggctccag ggaaggggct ggagtggctg tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca 240
tactacgcag actccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcaaga 360
gagggatata gcagcaactg gaataactgg tacttcgatc tctggggccg tggcaccctg 420
gtcaccgtct cctcaggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcg 480
gatgttgatga tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 540
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 600
gggaaggccc ctgaactcct gatctatgct gcatcccgtt taaaagtgg ggtcccatca 660
aggttcagtg gcagtggatc tgggaccgaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 720
gatgattttg caacttatta cggccaacaa tattataatt atccgtggac gttcggccga 780
gggaccaagg tggaaatcaa acgtgcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 840
ctgaatgggg ccgcacatca ccatcatcac cat 873

5 <210> 36
 <211> 873
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena sencilla
 <400> 36

ES 2 377 098 T3

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattggtat tactcgcggc ccagccggcc 60
atggcccagg tgcagctgca ggagtcgggg ggaggcatgg tccagcctgg gaggtccctg 120
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgccatgag ctgggtccgc 180
caggctccag ggaaggggct ggagtggttc tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca 240
tactacgcag actccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300
ctgtatctgc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccctgtatta ctgtgcaaga 360
gagggatata gcagcaactg gaataactgg tacttcgatc tctggggccg tggcacctg 420
gtcaccgtct cctcaggtgg aggcggttca ggcggagggtg gctctggcgg tggcggatcg 480
gaaattgtgc tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 540
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 600
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 660
aggttcagtg gcagtggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 720
gacgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccttggaac gttcggccaa 780
gggaccaagc tggagatcaa acgtgcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 840
ctgaatgggg ccgcacatca ccatcatcac cat 873

5 <210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador peptídico
<400> 37

Asn Ser Gly Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ser Gly Glu Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ser Lys Leu
20

15 <210> 38
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial
<400> 38

ES 2 377 098 T3

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

Ser

- <210> 39
- <211> 129
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial

- <400> 39

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

Ser

- <210> 40
- <211> 129
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial
- <400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Trp
100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

5 <210> 41
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial
<400> 41

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp
100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

15 <210> 42
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 377 098 T3

<220>

<223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial.

5

<400> 42

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

Ser

10

<210> 43

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial

<400> 43

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

<210> 44
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial

10

<400> 44

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

15

<210> 45

ES 2 377 098 T3

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial.
 <400> 45

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

10
 15 <210> 46
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial.
 20 <400> 46

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

<210> 47
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial

10

<400> 47

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

15

<210> 48

ES 2 377 098 T3

<211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial

<400> 48

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

10
 <210> 49
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial.

20 <400> 49

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

Ser

<210> 50
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial

10

<400> 50

Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Trp
 100 105 110
 Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 51
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial

10

<400> 51

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

Ser

<210> 52
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de VH de anticuerpo artificial

<400> 52

10

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

<210> 53
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial

<400> 53

20

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

5 <210> 54
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial
 <400> 54

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

15 <210> 55
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial
 <400> 55

ES 2 377 098 T3

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

<210> 56
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial

10

<400> 56

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

15

<210> 57

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de VL de anticuerpo artificial

<400> 57

```

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

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo unidos entre sí, en el que dicho primer anticuerpo tiene especificidad de unión por al menos un epítipo en HER2/*neu* y el segundo anticuerpo tiene especificidad de unión por un segundo epítipo en HER3 y en el que dicho primer anticuerpo comprende:
- un dominio VH que comprende la secuencia de CDR1 de VH de C6B1D2 SYWIA, la secuencia de CDR2 de VH de C6B1D2 LIYPGSDTKYSPSFQG, la secuencia de CDR3 de VH de C6B1D2 HDVGYCTDRTPCAKWPEWLGV, la región flanqueante 1 de C6B1D2 que comprende la secuencia QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT o QVQLLQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT, la región flanqueante 2 de C6B1D2 que comprende la secuencia WVRQMPGKGLEMYG, la región flanqueante 3 de C6B1D2 que comprende la secuencia QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR, y la región flanqueante 4 de C6B1D2 que comprende la secuencia WGQGTLVTVSS; y
- un dominio VL que comprende la secuencia de CDR1 de VL de C6B1D2 SGSSSNIGNNYVS, la secuencia de CDR2 de VL de C6B1D2 DHTNRPA, la secuencia de CDR3 de VL de C6B1D2 ASWDYTLSGWV, la región flanqueante 1 de C6B1D2 que comprende la secuencia QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC o ESVLTQPPSVSAAPGQKVTISC, la región flanqueante 2 de C6B1D2 que comprende la secuencia WYQQLPGTAPKLLIY, la región flanqueante 3 de C6B1D2 que comprende la secuencia GVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC; y la región flanqueante 4 de C6B1D2, que comprende la secuencia FGGGTKVTVLG o FGGGTKLTVLG; y
- en el que además dicho segundo anticuerpo comprende las CDR del anticuerpo HER3.H3 (SEC ID N°: 4).
2. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho primer anticuerpo es un Fv de cadena sencilla y dicho segundo anticuerpo es un Fv de cadena sencilla.
3. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 2, en el que dicho primer anticuerpo se une a un segundo anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 37.
4. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho anticuerpo biespecífico está en un portador farmacéuticamente aceptable.
5. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en terapia.
6. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento del cáncer.
7. El uso de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
8. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 6, o el uso de la reivindicación 7, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata y glándula salival.
9. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso para inhibir específicamente el crecimiento y/o proliferación de una célula cancerosa que lleva un receptor HER2/*neu* y un receptor HER3.
10. Uso de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la fabricación de un medicamento para inhibir específicamente el crecimiento y/o proliferación de una célula cancerosa que lleva un receptor HER2/*neu* y un receptor HER3.
11. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 u 8, o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 ó 10, en el que el uso es en el tratamiento del cáncer y el anticuerpo biespecífico o medicamento se administra a un paciente en combinación con otro agente citotóxico seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterápico, radiación de haz externo, un radioisótopo dirigido y un inhibidor de la transducción de señal.
12. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que un anticuerpo que comprende dicho anticuerpo biespecífico se une a un marcador detectable, para su uso en un método de detección de una célula o tejido que expresa uno o más miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico, comprendiendo el método
- poner en contacto una célula o tejido con el anticuerpo biespecífico unido a un marcador; y detectar dicho marcador, en el que la detección de dicho marcador en asociación con dicha célula o tejido indica la presencia de una célula o

tejido que expresa uno o más miembros de la familia de proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

13. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 12, en el que dicho marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un emisor de gamma, un emisor de positrones, un marcador de MRI y un marcador fluorescente.

5 14. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 12 ó 13, en el que dicha célula o tejido es una célula o tejido canceroso.

10 15. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 14, en el que la célula o tejido es una célula o tejido canceroso seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, colon, ovario, endometrial, gástrico, pancreático, próstata y glándula salival.

15 16. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2.

17. El vector de la reivindicación 16, que se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, cósmido, fago y virus.

18. Una célula hospedadora transformada con el vector de la reivindicación 16 ó 17.

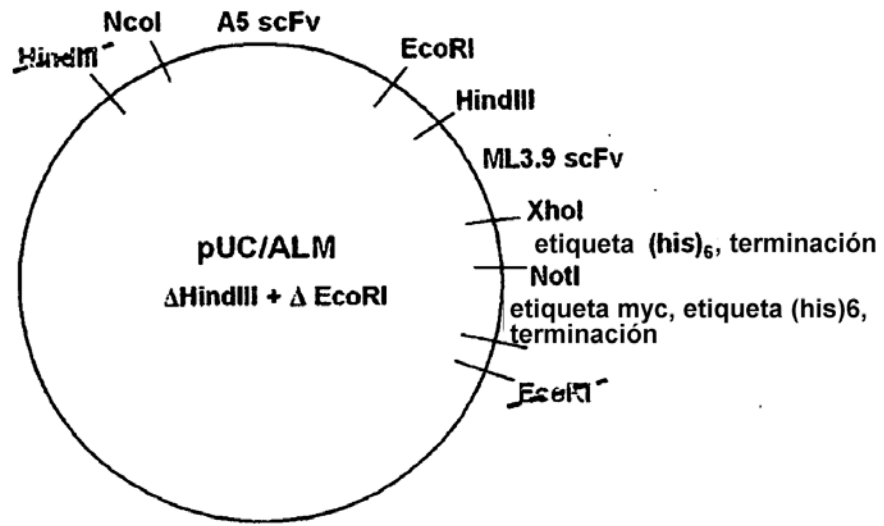


Fig. 1

Superposición: Proteínas ALM sobre microplaca de Her3-ECD

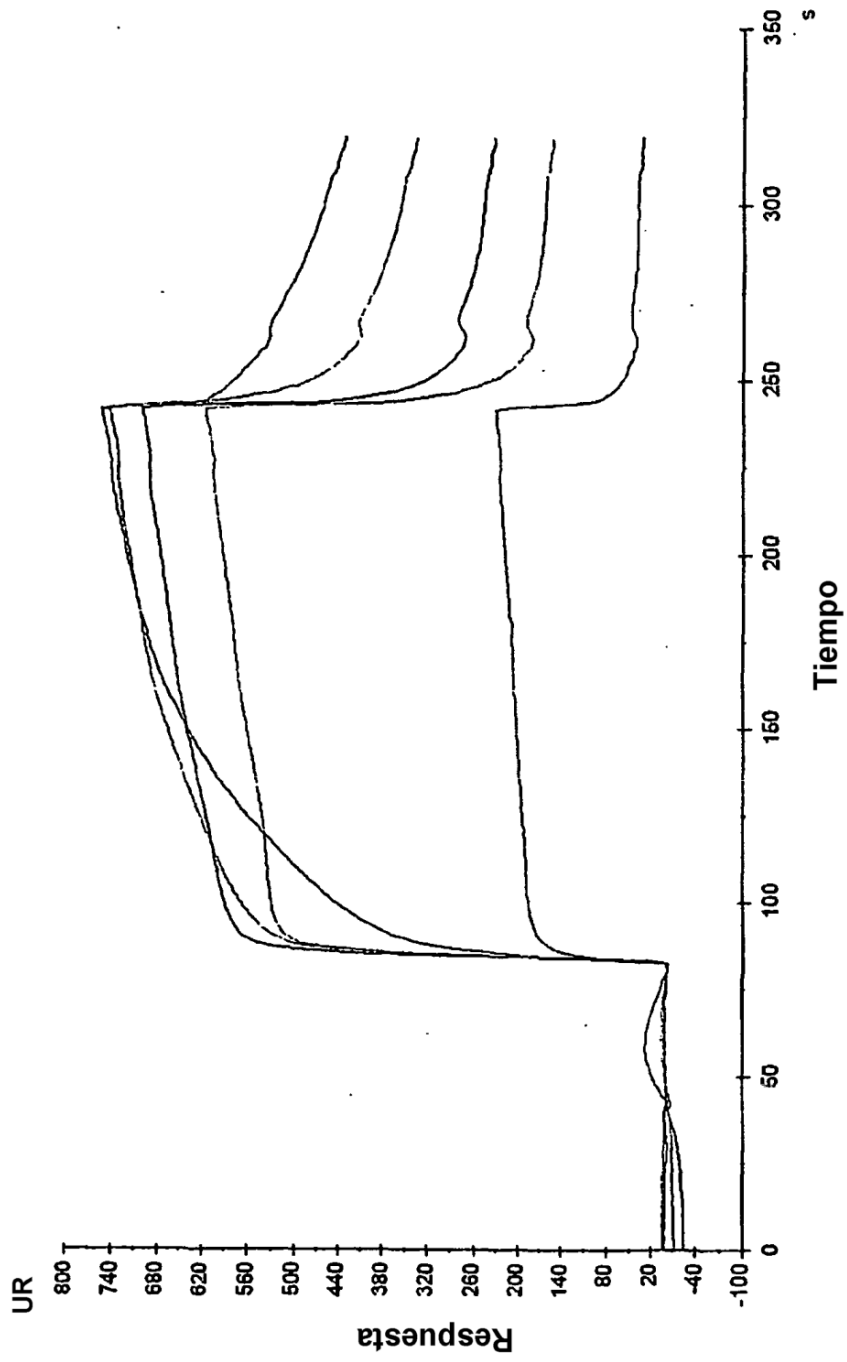


Fig. 2

Superposición: Proteínas ALM sobre microplaca de Her2-ECD

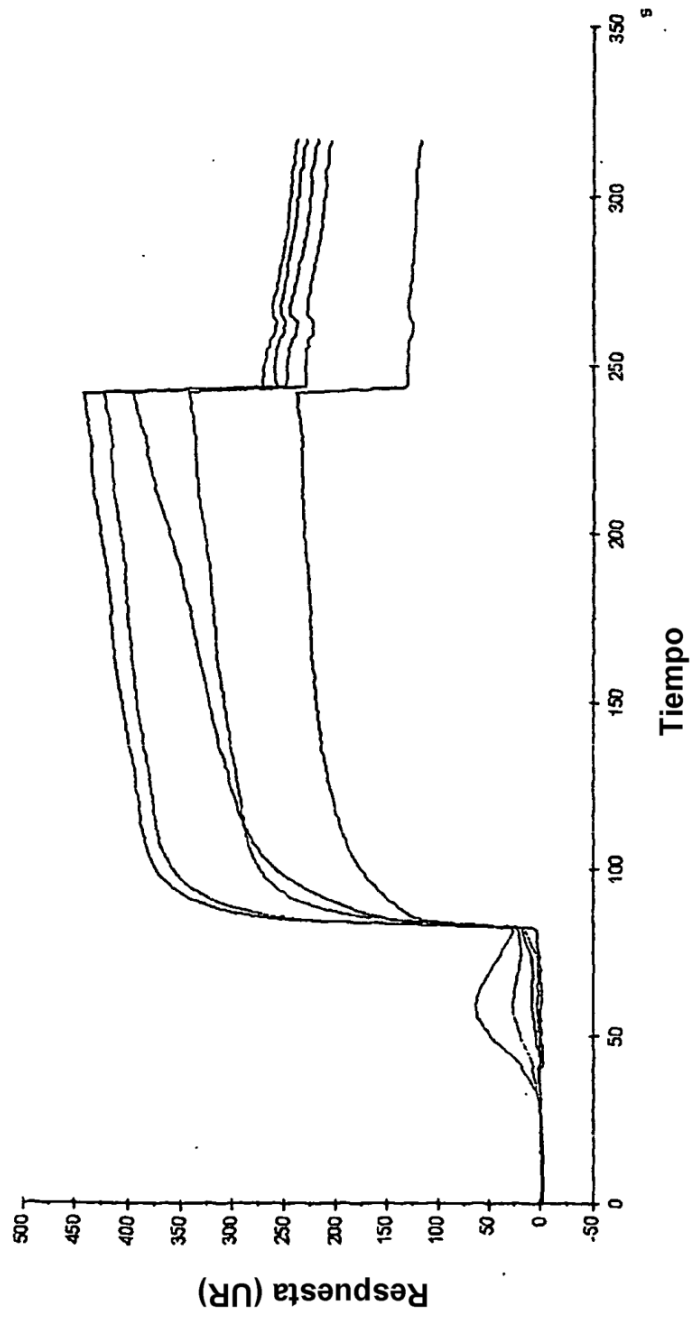


Fig. 3

Ensayo tipo sándwich de HER2/neu, ALM, HER3

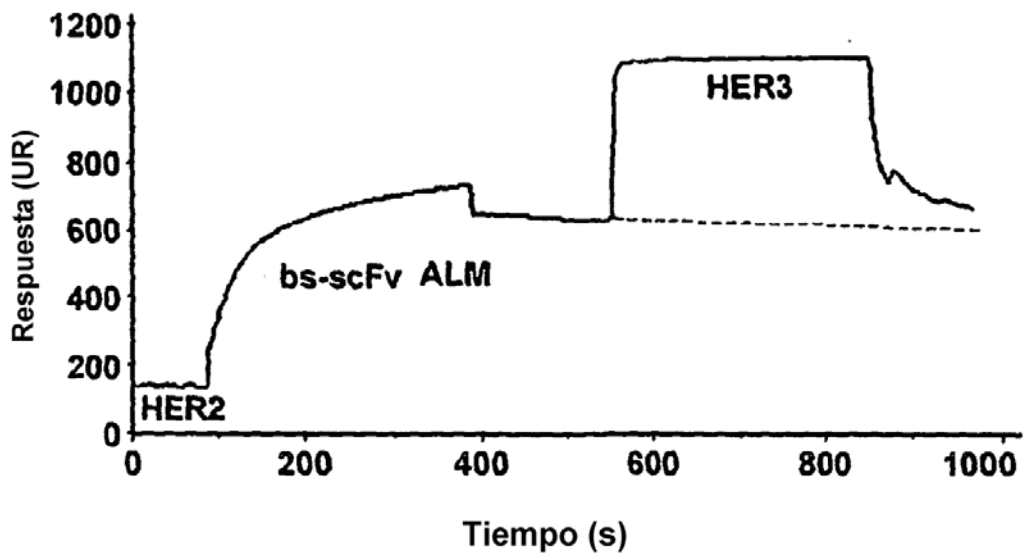


Fig. 4

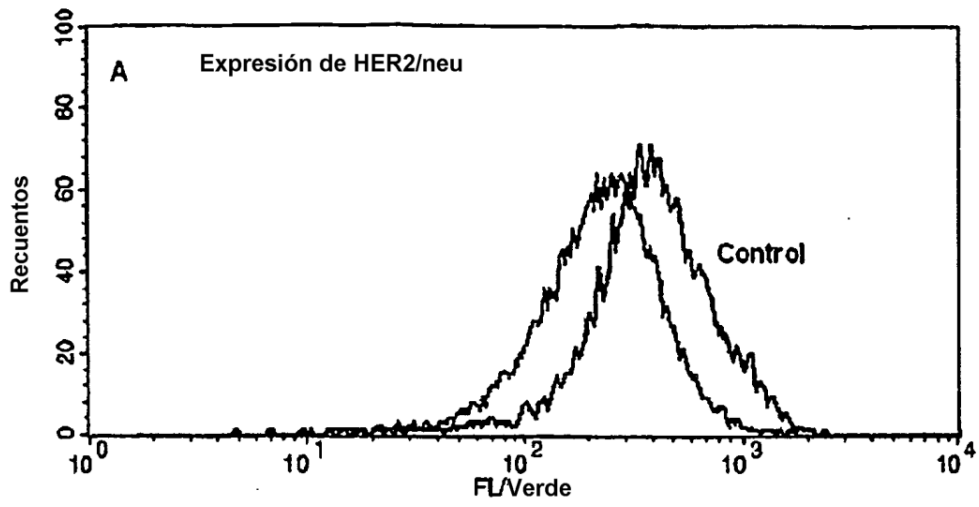


Fig. 5A

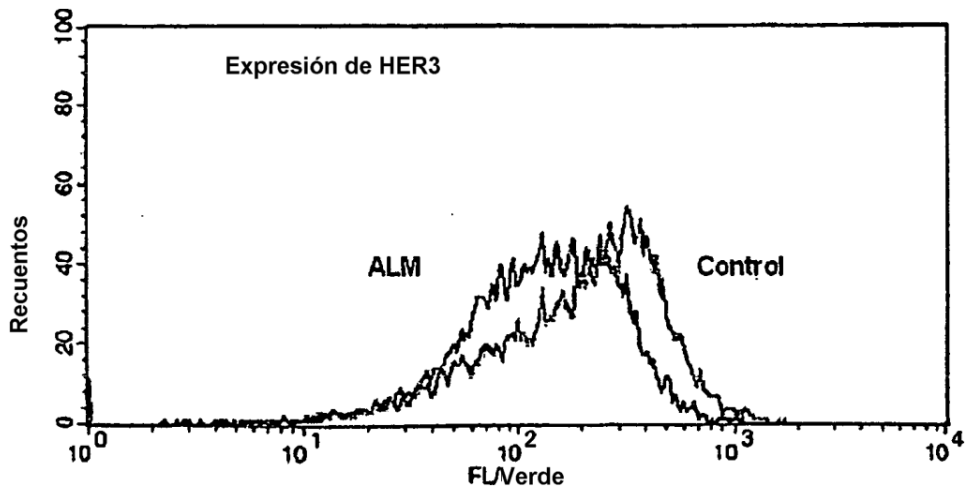


Fig. 5B

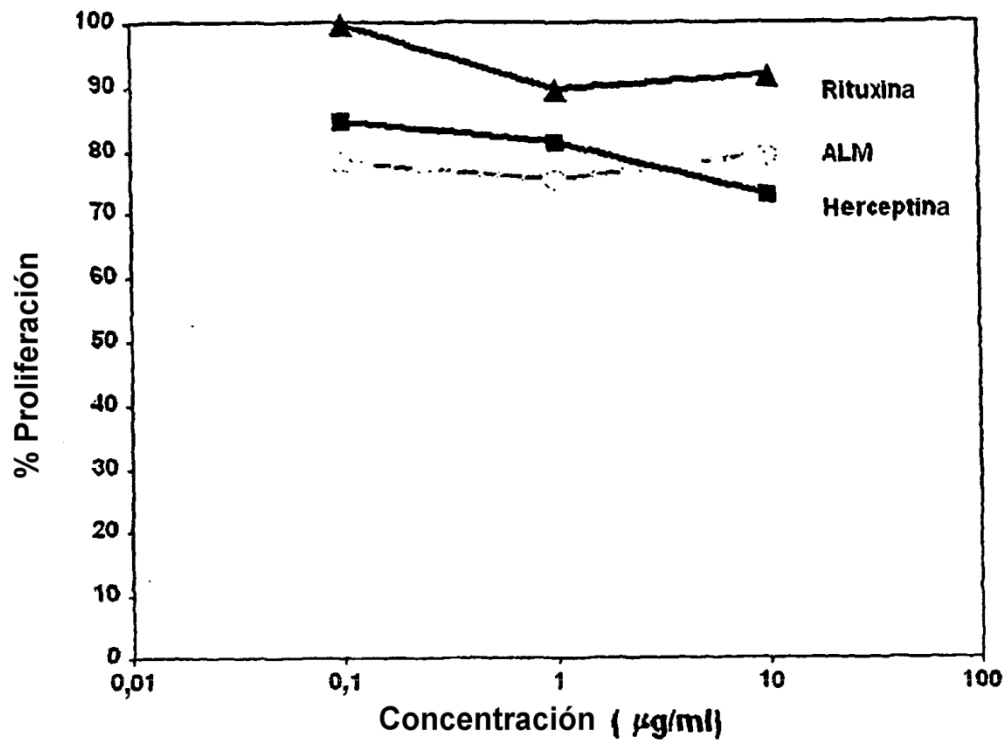


Fig. 6

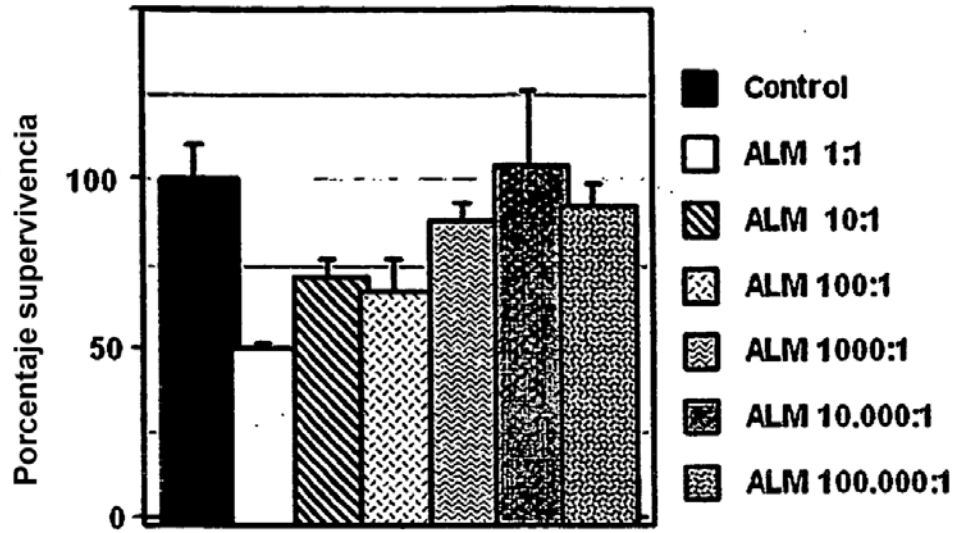


Fig. 7

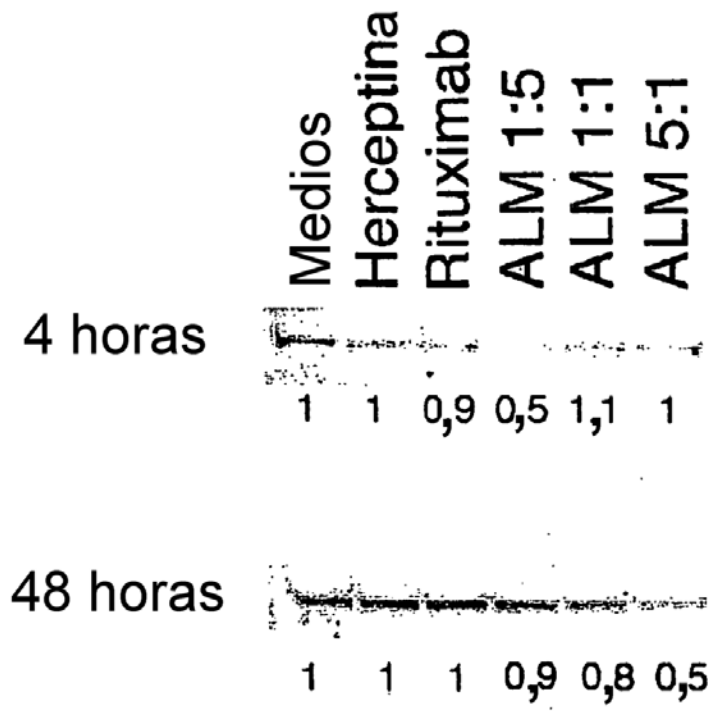


Fig. 8

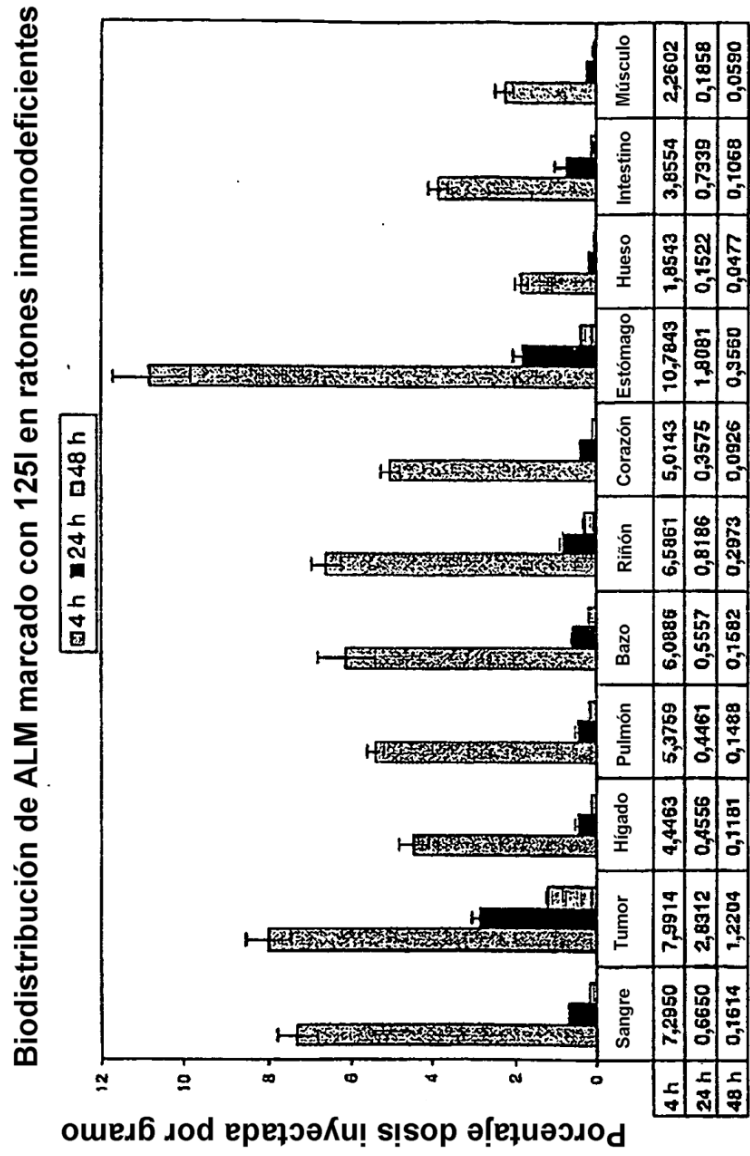


Fig. 9

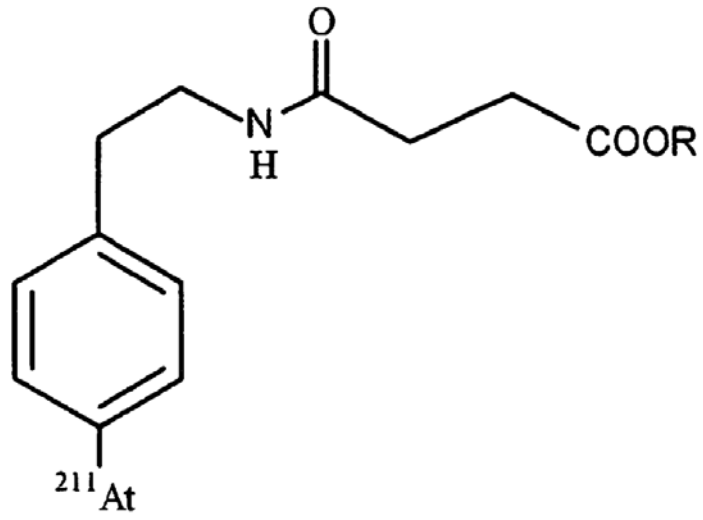


Fig. 10

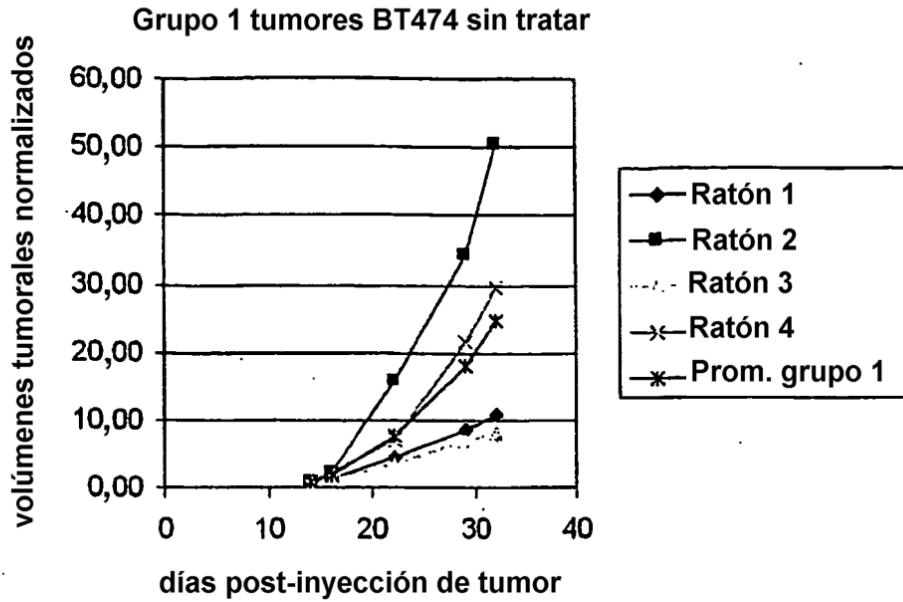


Fig. 11A

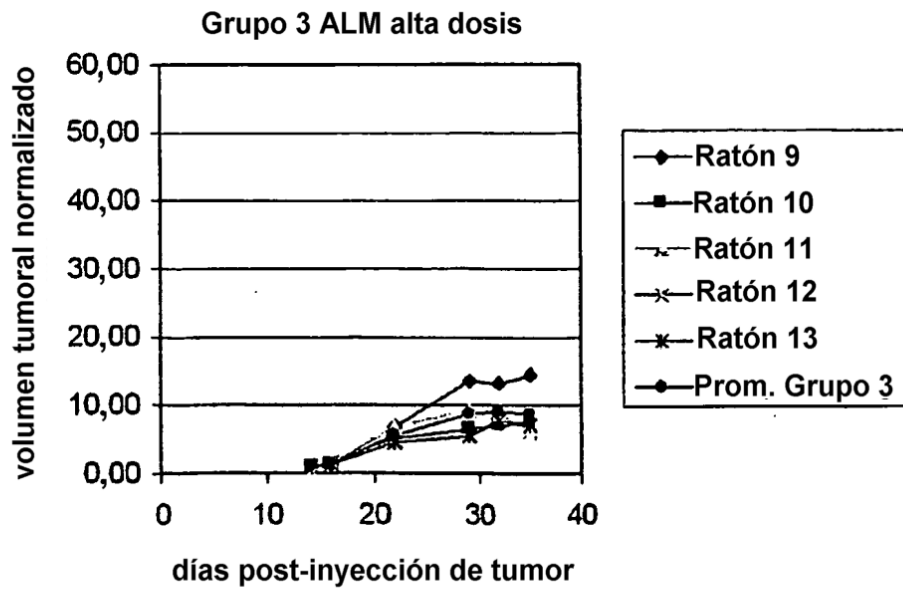


Fig. 11B

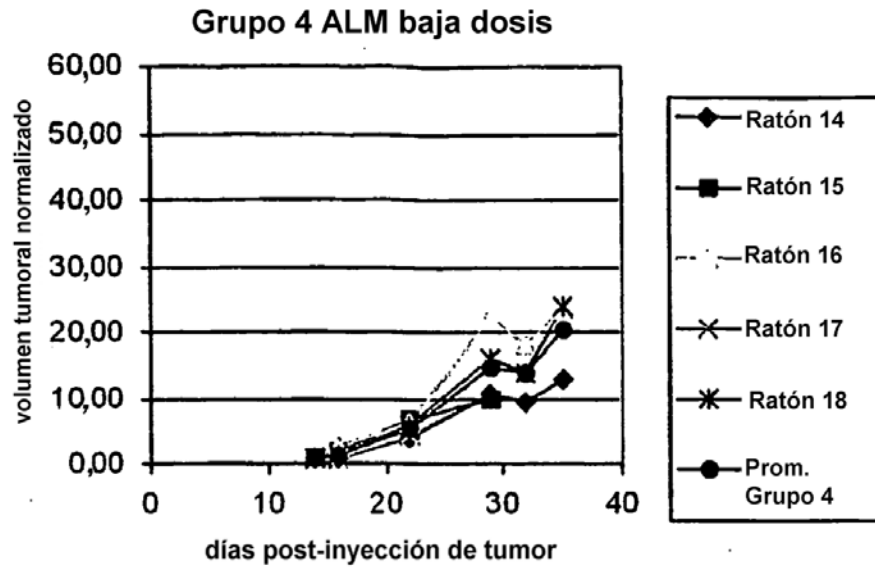


Fig. 11C

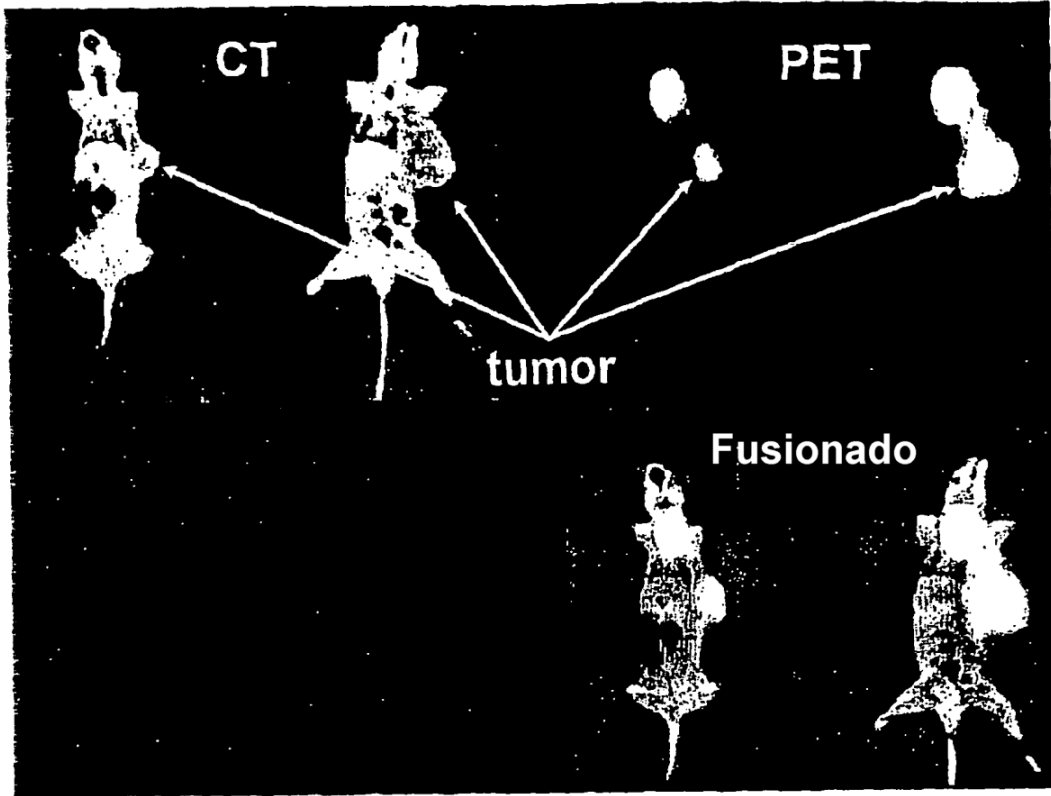


Fig. 12

Cadena Pesada:

Clon	Región flanqueante 1	CDR1	Región flanqueante 2	CDR2
C6.5	QVQLVQSGAEVKKPQGESLKI SCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGLIYMG	LIYPGDSDTKYSPSFQG
G98A	QVQLVQSGAEVKKPQGESLKI SCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGLIYMG	LIYPGDSDTKYSPSFQG
ML3-9	QVQLVQSGAEVKKPQGESLKI SCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGLIYMG	LIYPGDSDTKYSPSFQG
H3B1	QVQLVQSGAEVKKPQGESLKI SCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGLIYMG	LIYPGDSDTKYSPSFQG
B1D2	QVQLVQSGAEVKKPQGESLKI SCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGLIYMG	LIYPGDSDTKYSPSFQG

	Región flanqueante 3	CDR3	Región flanqueante 4
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVGYCSSSNCARWPEYFQH	WGQGTLVTVSS
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVAYCSSSNCARWPEYFQH	WGQGTLVTVSS
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVGYCSSSNCARWPEYFQH	WGQGTLVTVSS
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVGYCTDRTCAKWPPEYFQH	WGQGTLVTVSS
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVGYCTDRTCAKWPPEYFQH	WGQGTLVTVSS

Cadena Ligera

Clon	Región flanqueante 1	CDR1	Región flanqueante 2	CDR2
C6.5	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	GHTNRPA
G98A	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	GHTNRPA
ML3-9	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DHTNRPA
H3B1	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DHTNRPA
B1D2	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DHTNRPA

	Región flanqueante 3	CDR3	Región flanqueante 4
	GVPDRFSGSKSGTASALAI SGFRSEDEADYYC	AAWDDSLSGWV	FGGGTKLTVLG
	GVPDRFSGSKSGTASALAI SGFRSEDEADYYC	ASWDYTLSGWV	FGGGTKLTVLG
	GVPDRFSGSKSGTASALAI SGFRSEDEADYYC	ASWDYTLSGWV	FGGGTKLTVLG
	GVPDRFSGSKSGTASALAI SGFRSEDEADYYC	ASWDYTLSGWV	FGGGTKVTVLG
	GVPDRFSGSKSGTASALAI SGFRSEDEADYYC	ASWDYTLSGWV	FGGGTKVTVLG

Fig. 13

Cadena Pesada:

Nombre de clon	Región flanqueante 1	CDR1	Región flanqueante 2	CDR2
C6.5	QVQLLQSGAELKPKGESLKI SCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGL EYM3	LIYPGDSDTKYSPSFQ6
G98A	QVQLLQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGL EYM3	LIYPGDSDTKYSPSFQ6
ML3-9	QVQLLQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGL EYM3	LIYPGDSDTKYSPSFQ6
H3B1	QVQLLQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGL EYM3	LIYPGDSDTKYSPSFQ6
B1D2	QVQLLQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFT	SYWIA	WVRQMPGKGL EYM3	LIYPGDSDTKYSPSFQ6

	Región flanqueante 3	CDR3	Región flanqueante 4
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVGYCSSSNCAKWP EYFQH	WGQGTILVTVSS
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVAYCSSSNCAKWP EYFQH	WGQGTILVTVSS
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVGYCSSSNCAKWP EYFQH	WGQGTILVTVSS
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVGYCTDRTCAKWP EYFQH	WGQGTILVTVSS
	QVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCAR	HDVGYCTDRTCAKWP EALGV	WGQGTILVTVSS

Cadena Ligera

Nombre de clon	Región flanqueante 1	CDR1	Región flanqueante 2	CDR2
C6.5	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	GHTNRPA
G98A	ESVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DHTNRPA
ML3-9	ESVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DHTNRPA
H3B1	ESVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DHTNRPA
B1D2	ESVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DHTNRPA

	Región flanqueante 3	CDR3	Región flanqueante 4
	GVFDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC	AAWDDSLSGWV	FGGGTKLTVLG
	GVFDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC	ASWDYTLSGWV	FGGGTKLTVLG
	GVFDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC	ASWDYTLSGWV	FGGGTKLTVLG
	GVFDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC	ASWDYTLSGWV	FGGGTKLTVLG
	GVFDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC	ASWDYTLSGWV	FGGGTKLTVLG

Fig. 14

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 5733743 A [0028]
- US 5091513 A [0028]
- US 5132405 A [0028]
- US 4956778 A [0028]
- 15 • US 5644048 A [0031]
- US 5386023 A [0031]
- US 5637684 A [0031]
- US 5602240 A [0031]
- US 5216141 A [0031]
- 20 • US 4469863 A [0031]
- US 5235033 A [0031]
- US 5034506 A [0031]
- US 4683195 A [0038]
- 25 • US 4800195 A [0038]
- US 4965188 A [0038]
- US 5502167 A [0082]
- US 5500362 A [0082]
- US 5491088 A [0082]
- 30 • US 5482856 A [0082]
- US 5472693 A [0082]
- US 5354847 A [0082]
- US 5292867 A [0082]
- 35 • US 5231026 A [0082]
- US 5204244 A [0082]
- US 5202238 A [0082]
- US 5169939 A [0082]
- 40 • US 5081235 A [0082]
- US 5075431 A [0082]
- US 4975369 A [0082]
- EP 188256 A [0086] [0134]
- US 4671958 A [0086] [0133] [0134] [0136]
- 45 • US 4659839 A [0086] [0133] [0134]
- US 4414148 A [0086] [0134]
- US 4699784 A [0086] [0134]
- US 4680338 A [0086] [0134]
- 50 • US 4569789 A [0086] [0134]
- US 4589071 A [0086] [0134]
- US 5939045 A [0102]
- US 53469810 B [0102]
- US 5256334 A [0102]
- 55 • US 4866132 A [0102]
- US 5945439 A [0108]
- US 5849738 A [0108]
- US 5700825 A [0108]
- 60 • US 5872107 A [0108]
- US 4474814 A [0108]
- US 5064849 A [0108]
- US 4921963 A [0108]
- US 5428156 A [0114]
- WO 9515335 A, Yau [0115]
- US 4957735 A [0126]
- US 4545985 A [0134]
- US 4894443 A [0134]
- US 4618492 A [0136]
- US 4542225 A [0136]
- US 4625014 A [0136]
- US 6190923 B [0137]
- US 6187285 B [0137]
- US 6183721 B [0137]
- US 6177562 B [0137]
- US 6159445 A [0137]
- US 6153775 A [0137]
- US 6149890 A [0137]
- US 6143276 A [0137]
- US 6143274 A [0137]
- US 6139819 A [0137]
- US 6132764 A [0137]
- US 6123923 A [0137]
- US 6123921 A [0137]
- US 6120768 A [0137]
- US 6120751 A [0137]
- US 6117412 A [0137]
- US 6106866 A [0137]
- US 6096290 A [0137]
- US 6093382 A [0137]
- US 6090800 A [0137]
- US 6090408 A [0137]
- US 6088613 A [0137]
- US 6077499 A [0137]
- US 6075010 A [0137]
- US 6071494 A [0137]
- US 6071490 A [0137]
- US 6060040 A [0137]
- US 6056939 A [0137]
- US 6051207 A [0137]
- US 6048979 A [0137]
- US 6045821 A [0137]
- US 6045775 A [0137]
- US 6030840 A [0137]
- US 6028066 A [0137]
- US 6022966 A [0137]
- US 6022523 A [0137]
- US 6022522 A [0137]
- US 6017522 A [0137]
- US 6015897 A [0137]
- US 6010682 A [0137]
- US 6010681 A [0137]
- US 6004533 A [0137]

- US 6001329 A [0137]
- US 4458066 A [0141]
- US 3817837 A [0159]
- US 3850752 A [0159]
- US 3939350 A [0159]
- US 3996345 A [0159]
- US 4277437 A [0159]
- US 4275149 A [0159]
- US 4366241 A [0159]
- US 2006023479 W [0218]
- US 11154103 B [0218]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- HYNES ; STEM. *Biochim Biophys Acta.*, 1994, vol. 1198, 165-184 [0006]
- SESHADRI et al. *J Clin. Oncol.*, 1993, vol. 11, 1936-1942 [0006]
- BERGER et al. *Cancer Res.*, 1988, vol. 48, 1238-1243 [0006]
- O'REILLY et al. *Br. J. Cancer*, 1991, vol. 63, 444-446 [0006]
- ADAMS et al. *Antibody, Immunoconj. Radiopharm.*, 1992, vol. 5, 81-95 [0007]
- MILENIC et al. *J. Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 6363-6371 [0007] [0008]
- MILENIC et al. *J. Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 6363-6371 [0007]
- ADAMS et al. *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 4026-4034 [0007] [0008]
- BEAUMIER et al. *J Nucl. Med.*, 1985, vol. 26, 1172-1179 [0007]
- COLCHER et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, vol. 82, 1191-1197 [0007]
- ADAMS et al. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 1996, vol. 37, 472 [0008]
- WOLF et al. *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0008]
- HOLLIGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0011]
- ADAMS et al. *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 4026-4034 [0011]
- PACK et al. *Bio/Technology*, 1993, vol. 11, 1271-1277 [0011]
- PACK. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 1579-1584 [0011]
- HU et al. *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 3055-3061 [0011]
- Fundamental Immunology. Raven Press, 1993 [0028]
- HUSTON et al. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0028]
- REITER et al. *Protein Eng.*, 1995, vol. 8, 1323-1331 [0028]
- BEAUCAGE et al. *Tetrahedron*, 1993, vol. 49 (10), 1925 [0031]
- LETSINGER. *J. Org. Chem.*, 1970, vol. 35, 3800 [0031]
- SPRINZL et al. *Eur. J. Biochem.*, 1977, vol. 81, 579 [0031]
- LETSINGER et al. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 3487 [0031]
- SAWAI et al. *Chem. Lett.*, 1984, 805 [0031]
- LETSINGER et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, vol. 110, 4470 [0031]
- PAUWELS et al. *Chemica Scripta*, 1986, vol. 26, 141-9 [0031]
- MAG et al. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, 1437 [0031]
- BRIU et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 2321 [0031]
- ECKSTEIN. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*. Oxford University Press [0031]
- EGHOLM. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, 1895 [0031]
- MEIER et al. *Chem. Int. Ed. Engl.*, 1992, vol. 31, 1008 [0031]
- NIELSEN. *Nature*, 1993, vol. 365, 566 [0031]
- CARLSSON et al. *Nature*, 1996, vol. 380, 207 [0031]
- DENPCY et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 6097 [0031]
- ANGEW. *Chem. Intl. Ed. English*, 1991, vol. 30, 423 [0031]
- LETSINGER et al. *Nucleoside & Nucleotide*, 1994, vol. 13, 1597 [0031]
- Carbohydrate Modifications in Antisense Research. ASC Symposium Series 580 [0031]
- MESMAEKER et al. *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.*, 1994, vol. 4, 395 [0031]
- JEFFS et al. *J. Biomolecular NMR*, 1994, vol. 34, 17 [0031]
- *Tetrahedron Lett.*, 1996, vol. 37, 743 [0031]
- Carbohydrate Modifications in Antisense Research. ASC Symposium Series. vol. 580 [0031]
- JENKINS et al. *Chem. Soc. Rev.*, 1995, 169-176 [0031]
- RAWLS. *C & E News*, 02 June 1997 [0031]
- Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays. TIJSSEN. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*. Elsevier, 1993 [0032]
- SAMBROOK. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989, vol. 1-3 [0032]
- SMITH ; WATERMAN. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0045]
- NEEDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0045]
- PEARSON ; LIPMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0045]

- **FENG ; DOOLITTLE.** *J. Mol. Evol.*, 1987, vol. 35, 351-360 [0046]
- **HIGGINS ; SHARP.** *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-153 [0046]
- 5 • **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0047]
- **HENIKOFF ; HENIKOFF.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 89, 10915 [0047]
- 10 • **KARLIN ; ALTSCHUL.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5873-5787 [0048]
- **BORLINGHAUS et al.** *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 4071-4075 [0086] [0134]
- 15 • **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0090]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1997 [0090]
- 20 • **LEWIS et al.** *Bioconjugate Chem.*, 1994, vol. 5, 565-576 [0114]
- **SU.** *J. Nucl. Med.*, 1995, vol. 36 (5), 154 [0115]
- **WU et al.** *Nucl. Med. Biol.*, 1992, vol. 19 (2), 239-244 [0115]
- 25 • **SIEGALL et al.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 14256-14261 [0118]
- **CHAUDHARY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 87, 308-312 [0121]
- **SEETHARAM et al.** *J. Biol. Chem.*, vol. 266, 17376-17381 [0121]
- 30 • **DEBINSKI et al.** *Bioconj. Chem.*, 1994, vol. 5, 40 [0121]
- **CHAUDHARY et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 265, 16306 [0121]
- 35 • **SIEGALL et al.** *FASEB J.*, 1989, vol. 3, 2647-2652 [0122]
- **CHAUDHARY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 4538-4542 [0122]
- 40 • **UCHIDA et al.** *Science*, 1972, vol. 175, 901-903 [0123]
- **UCHIDAEF et al.** *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, 3838-3844 [0123]
- 45 • **CHAUDHARY et al.** *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 1991, vol. 180, 545-551 [0124]
- **WILLIAMS et al.** *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 11885-11889 [0124]
- **CONNOR et al.** *Pharm. Ther.*, 1985, vol. 28, 341-365 [0126]
- *Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet.* **THORPE et al.** *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*. Academic Press, 1982, 168-190 [0134]
- **WALDMANN.** *Science*, 1991, vol. 252, 1657 [0134]
- **BARANY ; MERRIFIELD.** *Solid-Phase Peptide Synthesis. The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, vol. 2, 3-284 [0139]
- **MERRIFIELD et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2156 [0139]
- **STEWART et al.** *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chem. Co, 1984 [0139]
- **NARANG et al.** *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 68, 90-99 [0141]
- **BROWN et al.** *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 68, 109-151 [0141]
- **BEAUCAGE et al.** *Tetra. Lett.*, 1981, vol. 22, 1859-1862 [0141]
- **DEBINSKI et al.** *Int. J. Cancer*, 1994, vol. 58, 744-748 [0144]
- **R. SCOPES.** *Protein Purification*. Springer-Verlag, 1982 [0148]
- **DEUTSCHER.** *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification*. Academic Press, Inc, 1990, vol. 182 [0148]
- **DEBINSKI et al.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 14065-14070 [0149]
- **KREITMAN ; PASTAN.** *Bioconjug. Chem.*, 1993, vol. 4, 581-585 [0149]
- **BUCHNER et al.** *Anal. Biochem.*, 1992, vol. 205, 263-270 [0149]
- **FINGL et al.** *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 1975, 1 [0188]
- **YARDEN ; SLIWKOWSKI.** *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2001, vol. 2, 127-137 [0211]
- **LOHRISCH ; PICCART.** *Sem. Oncology*, 2001, vol. 18 (28), 3-11 [0211]
- **ZHOU et al.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 8027-8031 [0212]