

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 100**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2010 E 10712365 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2417156**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos trivalentes**

30 Prioridad:

07.04.2009 EP 09005108

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

02.06.2015

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**BRINKMANN, ULRICH;
CROASDALE, REBECCA;
HOFFMANN, EIKE;
KLEIN, CHRISTIAN;
MOESSNER, EKKEHARD;
SCHANZER, JUERGEN MICHAEL;
UMANA, PABLO y
SUSTMANN, CLAUDIO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 537 100 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos trivalentes

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos trivalentes, a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 10 En el pasado reciente se ha desarrollado una amplia diversidad de formatos de anticuerpo recombinante multiespecífico, por ejemplo anticuerpos biespecíficos tetravalentes mediante la fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (ver, por ejemplo, Coloma M.J. *et al.*, Nature Biotech. 15:159-163, 1997, documento nº WO 2001/077342, y Morrison S.L., Nature Biotech. 25:1233-1234, 2007).

- 15 Además, se han desarrollado varios otros formatos nuevos en los que ya no se retiene la estructura nuclear del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, minicuerpos, varios formatos de cadena sencilla (scFv, Bis-scFv), que son capaces de unirse a dos o más antígenos (Holliger P. *et al.*, Nature Biotech. 23:1126-1136, 2005; Fischer N. y Léger O., Pathobiology 74:3-14, 2007; Shen J. *et al.*, Journal of Immunological Methods 318:65-74, 2007; Wu C. *et al.*, Nature Biotech. 25:1290-1297, 2007).

- 20 La totalidad de dichos formatos utiliza conectores para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a una proteína ligante adicional (por ejemplo scFv) o para fusionar, por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv (Fischer N. y Léger O., Pathobiology 74:3-14, 2007). Puede desearse la conservación de las funciones efectoras, tales como, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), las cuales se encuentran mediadas por la unión de un receptor Fc, mediante el mantenimiento de un grado elevado de similitud con los anticuerpos naturales.

- 25 En el documento nº WO 2007/024715 se informa de inmunoglobulinas duales de dominio variable en forma de proteínas construidas ligantes multivalentes y multiespecíficas. Se informa de un procedimiento para la preparación de anticuerpos diméricos biológicamente activos en la patente US nº 6.897.044. Se informa de un constructo de anticuerpo Fv multivalente que presenta por lo menos cuatro dominios variables que se encuentran unidos entre sí mediante conectores peptídicos en la patente US nº 7.129.330. Se informa de estructuras de unión de antígeno diméricas y multiméricas en el documento nº US 2005/0079170. En la patente US nº 6.511.663 se informa de una proteína anterior de unión a antígeno monoespecífica tetravalente que comprende tres o cuatro fragmentos Fab unidos entre sí covalentemente mediante una estructura de conexión, no siendo esta proteína una inmunoglobulina natural. En el documento nº WO 2006/020258 se informa de anticuerpos biespecíficos tetravalentes que pueden expresarse eficientemente en células procarióticas y eucarióticas, y que resultan útiles en métodos terapéuticos y diagnósticos. Se informa en el documento nº US 2005/0163782 de un método para la separación o la síntesis preferente de dímeros unidos mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas, a partir de dímeros que no se encuentran unidos por, como mínimo, un enlace disulfuro entre cadenas, en el que se parte de una mezcla que comprende los dos tipos de polipéptidos diméricos. Se informa de receptores tetravalentes biespecíficos en la patente US nº 5.959.083. Se informa de anticuerpos construidos con tres o más sitios de unión de antígeno funcionales en el documento nº WO 2001/077342.

- 30 Se informa de polipéptidos de unión a antígeno multiespecíficos y multivalentes en el documento nº WO 1997/001580. El documento nº WO 1992/004053 informa de homoconjugados, típicamente preparados a partir de anticuerpos monoclonales de la clase IgG que se unen al mismo determinante antigénico, unidos covalentemente mediante entrecruzamiento sintético. Se informa de anticuerpos monoclonales oligoméricos con elevada avidéz para antígenos en el documento nº WO 1991/06305, en la que se secretan oligómeros, típicamente de la clase IgG, que presentan dos o más monómeros inmunoglobulina asociados entre sí formando moléculas de IgG tetravalentes o hexavalentes. Se informa de anticuerpos derivados de ovejas y constructos de anticuerpo manipulados en la patente US nº 6.350.860, que pueden utilizarse para tratar enfermedades en las que la actividad del interferón gamma resulta patogénica. En el documento nº US 2005/0100543 se informa de constructos potenciales dianas que son portadores multivalentes de anticuerpos biespecíficos, es decir, cada molécula de un constructo diana potencial puede servir como portador de dos o más anticuerpos biespecíficos. Se informa de anticuerpos tetravalentes biespecíficos genéticamente manipulados en el documento nº WO 1995/009917. En el documento WO nº 2007/109254 se informa de moléculas de unión estabilizadas que consisten o que comprenden un scFv estabilizado.

- 35 El documento nº WO 2009/018386 da a conocer un formato de anticuerpo biespecífico tetravalente en el que se encuentran fusionados dos scFv con los extremos C-terminales de un anticuerpo de longitud completa, y da a conocer además un formato de anticuerpo bivalente en el que se encuentran fusionados un dominio VH y un dominio VL con los dos extremos C-terminales de un fragmento Fab, respectivamente.

Descripción resumida de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que comprende:

- 5 a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste de dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo,
- b) un polipéptido que consiste de:
- ba) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, o
- bb) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, y un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VH mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,
- 10 c) un polipéptido que consiste de:
- ca) un dominio variable de cadena ligera (VL), o
- cb) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VL mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,
- 15 y en el que el dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH) del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) del polipéptido de c) conjuntamente forman un sitio de unión de antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno
- 20

Un aspecto adicional de la invención es una molécula de ácidos nucleicos codificante de un anticuerpo biespecífico trivalente según la invención.

- 25 Son aspectos todavía adicionales de la invención una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico trivalente.

Los anticuerpos biespecíficos trivalentes según la invención muestran, por una parte, nuevas propiedades debido a su unión a diferentes antígenos, y por otra parte, resultan adecuados para la producción y formulación farmacéutica debido a su estabilidad, agregación reducida y propiedades farmacocinéticas y biológicas. Debido a su núcleo de Ig todavía conservan las propiedades de los anticuerpos naturales tales como ADCC y CDC.

30

Descripción detallada de la invención

- 35 Un aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que comprende:
- a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste de dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo,
- b) un polipéptido que consiste de:
- ba) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, obb) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VH mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,
- 40 c) un polipéptido que consiste de:
- ca) un dominio variable de cadena ligera (VL), o
- cb) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VL mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa, y en el que el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo del polipéptido en b) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo del polipéptido en c) conjuntamente forman un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno.
- 45
- 50

Opcionalmente el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo del polipéptido de c) se encuentran unidos y estabilizados mediante un puente disulfuro entre cadenas mediante la introducción de un enlace disulfuro entre las posiciones siguientes:

- 55 i) posición 44 del dominio variable de cadena pesada a posición 100 del dominio variable de cadena ligera,
- ii) entre las posición 105 del dominio variable de cadena pesada y la posición 43 del dominio variable de cadena ligera, o ii) entre la posición 101 del dominio variable de cadena ligera y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera (la numeración en todo caso según el índice EU de Kabat).

60 Las técnicas para introducir puentes disulfuro no naturales para la estabilización se describen en, por ejemplo, el documento nº WO 94/029350, Rajagopal V. *et al.*, Prot. Engin. 1453-59, 1997; Kobayashi H. *et al.*, Nuclear Medicine & Biology vol. 25:387-393, 1998, o Schmidt M. *et al.*, Oncogene 18:1711-1721, 1999. En una realización, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos de b) y c) se encuentra entre la posición 44 del

dominio variable de cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera. En una realización, el enlace disulfuro opcional entre dominios variables de los polipéptidos de b) y c) se encuentra entre la posición 105 del dominio variable de cadena pesada y la posición 43 del dominio variable de cadena ligera (la numeración en todo caso según el índice EU de Kabat). En una realización, resulta preferente un anticuerpo biespecífico trivalente sin dicha estabilización opcional con disulfuro entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab de cadena sencilla.

La expresión "anticuerpo de longitud completa" se refiere a un anticuerpo que consiste de dos "cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa" y dos "cadenas ligeras de anticuerpo de longitud completa" (ver la fig. 1). La expresión "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" se refiere a un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 de cadena pesada (CH1) de anticuerpo, una región bisagra (HR) de anticuerpo, un dominio constante 2 de cadena pesada (CH2) de anticuerpo, y un dominio constante 3 de cadena pesada (CH3) de anticuerpo, abreviadamente: VH-CH1-HR-CH2-CH3, y opcionalmente un dominio constante 4 de cadena pesada (CH4) de anticuerpo en el caso de un anticuerpo de la subclase IgE. Preferentemente la "cadena pesada de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de VH, CH1, HR, CH2 y CH3. La expresión "cadena ligera de anticuerpo de longitud completa" se refiere a un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, en forma abreviada: VL-CL. El dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo puede ser κ (kappa) o λ (lambda). Las dos cadenas de anticuerpo de longitud completa se encuentran unidas entre sí mediante enlaces disulfuro entre polipéptidos, entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagra de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa. Son ejemplos de anticuerpos de longitud completa típicos anticuerpos naturales tales como IgG (por ejemplo IgG1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos de longitud completa según la invención pueden ser de una única especie, por ejemplo el ser humano, o puede ser anticuerpos quimerizados o humanizados. Los anticuerpos de longitud completa según la invención comprende dos sitios de unión de antígeno formados por una pareja de VH y VL, los cuales se unen específicamente al mismo antígeno. El extremo C-terminal de las cadenas pesada y ligera de dicho anticuerpo de longitud completa indica el último aminoácido en el extremo C-terminal de dicha cadena pesada o ligera.

El extremo N-terminal del dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo del polipéptido de c) indica el último aminoácido en el extremo N-terminal del dominio VH o VL.

Los dominios CH3 de dicho anticuerpo de longitud completa según la invención pueden alterarse mediante la tecnología de "botón en ojal" que se describe en detalle mediante varios ejemplos en, por ejemplo, el documento nº WO 96/027011, Ridgway J.B. *et al.*, Protein Eng. 9:617-621, 1996, y en Merchant A.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 16:677-681, 1998. En dicho método, se alteran las superficies de interacción de los dos dominios CH3 para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen dichos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente los heterodimeros (Merchant A.M. *et al.*, Nature Biotech. 16:677-681, 1998; Atwell S. *et al.*, J. Mol. Biol. 270:26-35, 1997) e incrementa el rendimiento.

De esta manera, en un aspecto de la invención, dicho anticuerpo biespecífico trivalente se caracteriza además porque el dominio CH3 de una cadena pesada del anticuerpo de longitud completa y el dominio CH3 de la otra cadena pesada del anticuerpo de longitud completa se reúnen, cada uno, en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo, en el que dicha interfaz se altera para estimular la formación del anticuerpo biespecífico trivalente, en el que la alteración se caracteriza porque:

a) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada de manera que, dentro de la interfaz original, el dominio CH3 de una cadena pesada que se reúne con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada en el anticuerpo biespecífico trivalente, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral mayor, generando de esta manera una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que es posicionable en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada, y

b) el dominio CH3 de la otra cadena pesada se encuentra alterado, de manera que en la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 en el anticuerpo biespecífico trivalente, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de esta manera una cavidad en la interfaz del segundo dominio CH3 dentro de la cual puede posicionarse una protuberancia en la interfaz del primer dominio CH3.

Preferentemente, dicho residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más grande se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Preferentemente, dicho residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

5 En un aspecto de la invención, ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como el aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de manera que pueda formarse un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

10 En una realización preferente, dicho anticuerpo biespecífico trivalente comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena del botón", y las mutaciones T366S, L368A y Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal". También puede utilizarse un puente disulfuro adicional entre cadenas entre los dominios CH3 (Merchant A.M. *et al.*, Nature Biotech. 16:677-681, 1998), por ejemplo mediante la introducción de una mutación Y349C en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la "cadena del ojal". De esta manera, en otra realización preferente, dicho anticuerpo biespecífico trivalente comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3, y las mutaciones E356C, T366S, L368A y Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o dicho anticuerpo biespecífico trivalente comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3, y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (formando la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación E356C o S354C adicional en el otro dominio CH3 un puente disulfuro entre cadenas) (la numeración en todo caso según el índice EU de Kabat). Sin embargo, también pueden utilizarse alternativa o adicionalmente otras tecnologías de botones en ojales, tal como se describe en el documento EP nº 1 870 459 A1. Un ejemplo preferente de dicho anticuerpo biespecífico trivalente son las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón", y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal" (numeración en todo caso según el índice EU de Kabat).

25 En otra realización preferente, dicho anticuerpo biespecífico trivalente comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal", y además las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón", y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

30 En otra realización preferente, dicho anticuerpo biespecífico trivalente comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3, y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o dicho anticuerpo biespecífico trivalente comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3, y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, y además las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

35 El anticuerpo biespecífico de la invención comprende tres sitios de unión de antígeno (A), el anticuerpo de longitud completa comprende dos sitios idénticos de unión de antígeno que se unen específicamente a un primer antígeno, y B) el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo del polipéptido de c) forman conjuntamente un sitio de unión de antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno. Las expresiones "sitio de unión" o "sitio de unión de antígeno" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una o más regiones de dicho anticuerpo biespecífico según la invención a las que se une específicamente el antígeno respectivo. Los sitios de unión de antígeno en el anticuerpo de longitud completa o en el dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH) del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) del polipéptido de c) están formados, cada uno, por una pareja que consiste de un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

50 Los sitios de unión de antígeno que se unen específicamente al antígeno deseado pueden derivarse a) de anticuerpos conocidos contra el antígeno, o b) de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo nuevos obtenidos mediante métodos de inmunización *de novo* utilizando, *inter alia*, la proteína o ácido nucleico antigénico o fragmentos de los mismos, o mediante expresión fágica.

55 Un sitio de unión de antígeno de un anticuerpo de la invención contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en grados diversos a la afinidad del sitio de unión para el antígeno. Existen tres CDRs de dominio variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDRs de dominio variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las regiones CDR y de marco (FRs) se determina mediante comparación con una base de datos compilada a partir de secuencias de aminoácidos en las que dichas regiones se han definido según la variabilidad entre secuencias.

60 La especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento específico del anticuerpo para un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. La expresión "anticuerpos biespecíficos" según la invención se refiere a anticuerpos que presentan dos especificidades de unión de antígeno diferentes. En el caso de que un anticuerpo presente más de una especificidad, los epítopos reconocidos pueden asociarse a un único antígeno o a más de un antígeno. El término "monoespecífico" referido a un anticuerpo tal como se utiliza en la

presente memoria se refiere a un anticuerpo que presenta uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítipo del mismo antígeno. El término "valente" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Un anticuerpo natural, por ejemplo, o un anticuerpo de longitud completa según la invención, presenta dos sitios de unión y es bivalente. El término "trivalente" se refiere a la presencia de tres sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos según la invención son "trivalentes". La expresión "anticuerpo biespecífico trivalente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que presenta tres sitios de unión de antígeno de los cuales dos se unen al mismo antígeno (o al mismo epítipo del antígeno) y el tercero se une a un antígeno diferente o a un epítipo diferente del mismo antígeno. Los anticuerpos de la presente invención presentan tres sitios de unión y son biespecíficos.

Otra realización de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente, que comprende:

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste de:

aa) dos cadenas pesadas de anticuerpo que consisten, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 de cadena pesada (CH1) de anticuerpo, una región bisagra (HR) de anticuerpo, un dominio constante 2 de cadena pesada (CH2) de anticuerpo y un dominio constante 3 de cadena pesada (CH3) de anticuerpo, y ab) dos cadenas ligeras de anticuerpo que consisten de, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, y

b) un polipéptido que consiste de:

ba) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, obb) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VH mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa, en el que dicho conector peptídico es un péptido de por lo menos 5 aminoácidos, preferentemente de entre 25 y 50 aminoácidos,

c) un polipéptido que consiste de:

ca) un dominio variable de cadena ligera (VL), o

cb) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VL mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa, en el que dicho conector peptídico es idéntico al conector peptídico en b),

y en el que el dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH) del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) del polipéptido de c) forman conjuntamente un sitio de unión de antígeno que se une específicamente al segundo antígeno.

Comprendido dentro de la presente realización, preferentemente el anticuerpo biespecífico trivalente comprende una mutación T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, y más preferentemente el anticuerpo biespecífico trivalente comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones D356C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (formando la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación D356C adicional en el otro dominio CH3 un puente disulfuro entre cadenas).

En una realización de la invención, el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención se caracteriza porque:

a) dicho anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a ErbB-3 comprende como dominio variable de cadena pesada la secuencia SEC ID n° 1, y como dominio variable de cadena ligera, la secuencia SEC ID n° 2

b) dicho polipéptido de b) comprende, a modo de dominio variable de cadena pesada, la secuencia SEC ID n° 3, y

c) dicho polipéptido de c) comprende, a modo de dominio variable de cadena ligera, la secuencia SEC ID n° 4.

En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención comprende:

a) un anticuerpo de longitud completa que se une a un primer antígeno, que consiste de dos cadenas pesadas de anticuerpo VH-CH1-H4-CH2-CH3 y dos cadenas ligeras de anticuerpo VL-CL (en las que preferentemente uno de los dos dominios CH3 comprende las mutaciones Y349C y T366W y el otro de los dos dominios CH3 comprende las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V),

b) un polipéptido que consiste de:

ba) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, o

bb) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VH mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,

c) un polipéptido que consiste de:

ca) un dominio variable de cadena ligera (VL), o

cb) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VL mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa, y en el que el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo del polipéptido en b) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo del polipéptido en c) conjuntamente forman un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno.

Otra realización de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente, que comprende:

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a ErbB-3 humano y que consiste de:

aa) dos cadenas pesadas de anticuerpo que consisten de, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante de cadena pesada 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio constante de cadena pesada 2 (CH2) de anticuerpo y un dominio constante de cadena pesada 3 (CH3) de anticuerpo, y

ab) dos cadenas ligeras de anticuerpo que consisten de, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, abreviadamente VL-CL, y

b) un fragmento Fv de una sola cadena que se une específicamente a c-Met humano.

en el que dicho fragmento Fv de cadena sencilla de b) se encuentra fusionado con dicho anticuerpo de longitud completa de a) mediante un conector peptídico en el extremo C-terminal o N-terminal de la cadena pesada o ligera (preferentemente en el extremo C-terminal de la cadena pesada) de dicho anticuerpo de longitud completa, en el que dicho conector peptídico es un péptido de por lo menos 5 aminoácidos, preferentemente de entre 25 y 50 aminoácidos.

Preferentemente dicho anticuerpo biespecífico trivalente comprende además las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 del anticuerpo de longitud completa, y las mutaciones S354C (o E356C), T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 del anticuerpo de longitud completa.

Otra realización de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente, que comprende:

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a ErbB-3 humano y que consiste de:

aa) dos cadenas pesadas de anticuerpo que consisten, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 de cadena pesada (CH1) de anticuerpo, una región bisagra (HR) de anticuerpo, un dominio constante 2 de cadena pesada (CH2) de anticuerpo y un dominio constante 3 de cadena pesada (CH3) de anticuerpo, y

ab) dos cadenas ligeras de anticuerpo que consisten de, en dirección N-terminal a C-terminal, un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, y

b) un polipéptido que consiste de:

ba) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, o

bb) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VH mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa, en el que dicho conector peptídico es un péptido de por lo menos 5 aminoácidos, preferentemente de entre 25 y 50 aminoácidos,

c) un polipéptido que consiste de:

ca) un dominio variable de cadena ligera (VL), o

cb) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VL mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa, en el que dicho conector peptídico es idéntico al conector peptídico en b),

y en el que el dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH) del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) del polipéptido de c) conjuntamente forman un sitio de unión de antígeno que se une específicamente a c-Met humano.

Los anticuerpos de longitud completa de la invención comprenden regiones constantes de inmunoglobulina de una o más clases de inmunoglobulina. Entre las clases de inmunoglobulina se incluyen los isotipos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y, en el caso de IgA e IgA, los subtipos de las mismas. En una realización preferente, un anticuerpo de longitud completa de la invención presenta una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir la región de unión, procedente de una fuente o especie, y por lo menos una parte de una región constante derivada de una

fuerza o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana resultan preferentes. Otras formas preferentes de "anticuerpos quiméricos" comprendidas en la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión de receptor Fc (FcR). Este tipo de anticuerpos quiméricos también se denomina "anticuerpos de clase intercambiada". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN codificantes de regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN codificantes de regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Morrison, S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1985, y las patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244).

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) han sido modificadas para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente de la de la inmunoglobulina parental.

En una realización preferente, se injerta una CDR murina en la región marco de un anticuerpo humano para preparar un "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger, M.S. *et al.*, Nature 314:268-270, 1985. Las CDRs particularmente preferentes corresponden a aquéllas que representan secuencias que reconocen los anteriormente indicados antígenos de los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" comprendidas dentro de la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la del receptor de Fc (FcR).

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos del estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5:368-374, 2001). También pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulinas de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes para la línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el reto de antígeno (ver, por ejemplo, Jakobovits A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555, 1993; Jakobovits, A. *et al.*, Nature 362:255-258, 1993; Brüggemann, M. *et al.*, Year Immunol. 7 (1993) 33-40). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de expresión fágica (Hoogenboom, H.R. y Winter, G.J., Mol. Biol. 227:381-388, 1992; Marks, J.D. *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991). Las técnicas de Cole S.P.C. *et al.* y de Boerner P. *et al.* también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole S.P.C. *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, páginas 77 a 96, 1985; y Boerner P. *et al.*, J. Immunol. 147:86-95, 1991). Tal como se ha indicado para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, la expresión "anticuerpo humano" tal como se utiliza en la presente memoria también comprende anticuerpos modificados en la región constante para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión de FcR, por ejemplo mediante "intercambio de clase", es decir, el cambio o la mutación de partes de Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).

La expresión "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 ó CHO, o de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o para anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Dichos anticuerpos recombinantes humanos presentan regiones variables y constantes en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención han sido sometidos a hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de anticuerpos de la línea germinal humana.

La expresión "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada cadena de la pareja de cadenas ligera y pesada que participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas variables ligeras y pesadas humanas presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas y conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de hoja β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de hojas β. Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el

sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y, por lo tanto, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

5 Las expresiones "región hipervariable" o "parte de unión a antígeno de un anticuerpo", tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "de marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDRs en cada cadena se encuentran separadas por dichos aminoácidos de marco. En particular, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

10
15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "de unión" o "de unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare, Uppsala, Suecia) con antígeno de tipo salvaje purificado. La afinidad de la unión está definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). La unión o unión específica se refiere a una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o inferior, preferentemente de entre 10^{-9} y 10^{-13} moles/l. De esta manera, un anticuerpo biespecífico trivalente según la invención se une específicamente a cada antígeno para el que es específico con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o inferior, preferentemente de entre 10^{-9} M y 10^{-13} moles/l.

20
25 La unión del anticuerpo a Fc γ RIII puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión está definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a).

30 El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el determinante epítipo incluye grupos superficiales químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales sacáridas, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas realizaciones, puede presentar características estructurales tridimensionales específicas, o presentar características de carga específica. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo.

35 En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno en el caso de que reconozca preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

40 La expresión "conector peptídico" tal como se utiliza en la invención se refiere a un péptido con secuencias de aminoácidos que preferentemente son de origen sintético. Estos conectores peptídicos según la invención se utilizan para fusionar los polipéptidos en b) y c) a los extremos C-terminales de cadena pesada del anticuerpo de longitud completa para formar el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención. Preferentemente dichos conectores peptídicos son péptidos con una secuencia de aminoácidos de una longitud de por lo menos 5 aminoácidos, preferentemente de una longitud de entre 10 y 100 aminoácidos, más preferentemente de una longitud de entre 25 y 50 aminoácidos. Preferentemente, dicho conector peptídico en b) y c) son péptidos idénticos de una longitud de por lo menos 25 aminoácidos, preferentemente de una longitud de entre 25 y 50 aminoácidos, y más preferentemente dicho conector peptídico es $(GxS)_n$ o $(GxS)_nG_m$, en donde G=glicina, S=serina y ($x=3$, $n=6$, 7 o 8 , y $m=0$, 1 , 2 o 3) o ($x=4$, $n=3$, 4 , 5 , 6 o 7 , y $m=0$, 1 , 2 o 3), preferentemente $x=4$ y $n=5$, 6 o 7 .

45
50 En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG1 humana, o de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A.

55 En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG2 humana.

En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG3 humana.

60 En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG4 humana o de la subclase IgG4 humana con la mutación adicional S228P.

Preferentemente, el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG1 humana, de la subclase IgG4 humana con la mutación adicional S228P.

5 Ahora se ha encontrado que los anticuerpos biespecíficos trivalentes según la invención presentan características mejoradas, tales como la actividad biológica o farmacológica, las propiedades farmacocinéticas o la toxicidad. Pueden utilizarse, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

10 En una realización adicional, el anticuerpo biespecífico trivalente según la invención se caracteriza porque se une específicamente a ErbB3 y a c-Met. La expresión "región constante" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la suma de los dominios de un anticuerpo que no son la región variable. La región constante no se encuentra directamente implicada en la unión de un antígeno, aunque muestra diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de cadena ligera (CL) que pueden encontrarse en la totalidad de las cinco clases de anticuerpo se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

20 La expresión "región constante derivada de un origen humano" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una región constante de cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4 y/o una región constante de cadena ligera kappa o lambda. Dichas regiones constantes son bien conocidas del estado de la técnica y son descritas por, por ejemplo, Kabat, E.A. (ver, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28:214-218, 2000; Kabat, E.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2785-2788, 1975).

25 Aunque los anticuerpos de la subclase IgG4 muestran un nivel reducido de unión al receptor de Fc (Fc γ R1), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro328, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 son residuos que, en caso de alterarse, también proporcionan un nivel reducido de unión de Fc (Shields, R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, 2001; Lund, J. *et al.*, *FASEB J.* 9:115-119, 1995; Morgan, A. *et al.*, *Immunology* 86:319-324, 1995; patente EP n° 0 307 434).

35 En una realización, un anticuerpo según la invención presenta un nivel reducido de unión a FcR en comparación con un anticuerpo IgG1 y el anticuerpo parental de longitud completa presenta un nivel reducido de unión a FcR en comparación con un anticuerpo de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una realización, las mutaciones en el anticuerpo parental de longitud completa son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236. En otra realización, las mutaciones en el anticuerpo parental de longitud completa son, en IgG4, S228P, y en IgG1, L234A y L235A.

40 La región constante de un anticuerpo participa directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia a partir de la unión del factor del complemento C1q a la región constante de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión de la región constante son conocidos del estado de la técnica y son descritos por, por ejemplo, Lukas T.J. *et al.*, *J. Immunol.* 127:2555-2560, 1981; Brunhouse R. y Cebrera J.J., *Mol. Immunol.* 16:907-917, 1979; Burton D.R. *et al.*, *Nature* 288:338-344, 1980; Thomason J.E. *et al.*, *Mol. Immunol.* 37:995-1004, 2000; Idusogie E.E. *et al.*, *J. Immunol.* 164:4178-4184, 2000; Hezareh M. *et al.*, *J. Virol.* 75:12161-12168, 2001; Morgan A. *et al.*, *Immunology* 86:319-324, 1995, y la patente EP n° 0 307 434. Dichos sitios de unión de la región constante se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat).

50 La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células diana humanas por un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan antígeno con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, tales como las PBMC recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, por ejemplo monocitos o células asesinas naturales (NK) o una línea celular de NK de crecimiento continuo.

60 La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a un proceso iniciado por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión de la parte Fc son conocidos del estado de la técnica (ver anteriormente). Dichos sitios de unión de la parte Fc se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente

muestran activación del complemento, incluyendo la unión de C1q y C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q y/o a C3.

5 Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales pueden potenciarse mediante la manipulación de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y la patente US nº 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos terapéuticos utilizados más habitualmente, son glucoproteínas que presentan un sitio N-ligado de glucosilación conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia resulta esencial para
10 que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M.R. *et al.*, Glycobiology 5:813-822, 1995; Jefferis, R. *et al.*, Immunol. Rev. 163:59-76, 1998; Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). Umana, P. *et al.* Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y la patente WO nº 99/54342 mostraron que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de la β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos
15 biantenarios, incrementaba significativamente la actividad de ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición del carbohidrato de Asn297 o su eliminación también afecta a la unión a Fc γ R y a C1q (Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999; Davies, J. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294, 74; Mimura, Y. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:45539-45547, 2001; Radaev, S. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:16478-16483, 2001; Shields, R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001; Shields, R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:26733-26740, 2002; Simmons, L.C. *et al.*, J. Immunol. Methods 263:133-147, 2002.

Los métodos para potenciar las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se
25 nforman en, por ejemplo, los documentos nº WO 2005/018572, nº WO 2006/116260, nº WO 2006/114700, nº WO 2004/065540, nº WO 2005/011735, nº WO 2005/027966, nº WO 1997/028267, nº US 2006/0134709, nº US 2005/0054048, nº US 2005/0152894, nº WO 2003/035835 y nº WO 2000/061739.

Inesperadamente, los anticuerpos biespecíficos <ErbB3-c-Met> que son una realización de la invención muestran una regulación negativa e internalización reducidas del antígeno diana en comparación con sus anticuerpos parentales <ErbB3> y/o <c-Met>. Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, el anticuerpo
30 biespecífico se encuentra glucosilado (en el caso de que comprende una parte Fc de subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferentemente de subclase IgG1 o IgG3) con una cadena sacárida en Asn297 en la que la cantidad de fucosa en dicha cadena sacárida es de 65% o inferior (numeración según Kabat). En otra realización, la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena sacárida se encuentra comprendida entre 5% y 65%, preferentemente entre 20% y 40%. El término "Asn297" según la invención se refiere al aminoácido asparagina situado en aproximadamente la
35 posición 297 en la región de Fc. Basado en variaciones de secuencia menores de los anticuerpos, Asn297 también puede encontrarse situado a algunos aminoácidos (habitualmente no más de 63 aminoácidos) cadena arriba o abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300. En una realización, el anticuerpo glucosilado según la invención es de la subclase IgG1 humana, de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A o de la subclase IgG3. En una realización adicional, la cantidad de ácido N-glucolilneuramínico (NGNA) es de 1% o menos,
40 y/o la cantidad de alfa-1,3-galactosa N-terminal es de 1% o menos dentro de dicha cadena sacárida. La cadena sacárida muestra preferentemente las características de los glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula CHO.

La expresión "las cadenas sacáridas muestran características de glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula CHO" se refiere a que la cadena sacárida en Asn297 del anticuerpo parental de longitud completa según la invención presenta la misma estructura y secuencia de residuos sacáridos, excepto por el residuo fucosa, que los del mismo anticuerpo expresado en células CHO no modificadas, por ejemplo que las células de las que se informa en el documento nº WO 2006/103100.

50 El término "NGNA" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al residuo sacárido del ácido N-glucolilneuramínico.

La glucosilación de IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 en forma de glucosilación nuclear de oligosacárido complejo biantenario fucosilado terminado en, como máximo, dos residuos Gal. Se informa en detalle de regiones
55 constantes de cadena pesada humana de la subclase IgG1 o IgG3 en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y en Brüggermann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987; Love, T.W. *et al.*, Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Estas estructuras se denominan G0, G1 (α -1,6- o α -1,3-) o residuos glicanos G2, dependiendo de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de partes Fc de anticuerpo se describe en, por ejemplo, Routier, F.H., Glyconjugate J. 14:201-207, 1997. Los anticuerpos que se expresan recombinantemente en células CHO huésped no glucomodificadas habitualmente se encuentran fucosiladas en Asn297 en una proporción de por lo menos 85%. Los oligosacáridos modificados del anticuerpo parental de longitud completa pueden ser híbridos o complejos. Preferentemente, los oligosacáridos bifurcados,
60

reducidos/no fucosilados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos bifurcados reducidos/no fucosilados son complejos.

Según la invención, la expresión "cantidad de fucosa" se refiere a la cantidad de dicho azúcar en la cadena sacárida en Asn297, referida a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) según medición realizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y calculado como valor medio. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa en relación a la totalidad de las glucoestructuras identificadas en una muestra tratada con N-glucosidasa F (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y estructuras de bajo y alto contenido en manosa, respectivamente) según el MALDI-TOF.

El anticuerpo según la invención se produce por medios recombinantes. De esta manera, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico codificante del anticuerpo según la invención, y un aspecto adicional es una célula que comprende dicho ácido nucleico codificante de un anticuerpo según la invención. Los métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprende la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el aislamiento posterior del anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos tal como se ha indicado anteriormente en una célula huésped, se insertan ácidos nucleicos codificantes de las cadenas ligeras y pesadas modificadas respectivas en los vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o de la parte celular tras la lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos del estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17:183-202, 1999; Geisse, S. *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8:271-282, 1996; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16:151-160, 2000; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos biespecíficos trivalentes según la invención se preparan convenientemente a partir del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes (o mutantes) de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico trivalente se preparan mediante la introducción de cambios nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos. Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones que no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tal como el isotipo y la unión de antígeno del IgG pero que podrían mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

La expresión "célula huésped" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a cualquier tipo de sistema celular que puede manipularse para generar los anticuerpos según la presente invención. En una realización, se utilizan células HEK293 y CHO como células huésped. Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiabilmente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada.

La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes L.M. *et al.*, *Cytotechnology* 32:109-123, 2000; Barnes L.M. *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73:261-270, 2001. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher Y. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 30:E9, 2002. La clonación de dominios variables se describe en Orlandi, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837, 1989; Carter, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289, 1992, y en Norderhaug, L. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204:77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK293) se describe en Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., *Cytotechnology* 30:71-83, 1999, y en Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194:191-199, 1996.

Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariotas se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión ribosómica. Es conocido que las células eucarióticas utilizan promotores, intensificadores y señales de poliadenilación.

5 Un ácido nucleico se encuentra “operablemente ligado” en el caso de que se encuentre situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN de un polipéptido en el caso de que se exprese en forma de una preproteína que participe en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre situado de manera que facilite la traducción. Generalmente, la expresión “operablemente ligado” se refiere a que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, a que son contiguas y se encuentran en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o conector según la práctica convencional.

La purificación de los anticuerpos se lleva a cabo con el fin de eliminar los componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/de SDS, la formación de bandas en CsCl, la cromatografía de columna, la electroforesis en gel de agarosa, y otras técnicas bien conocidas de la técnica (ver Ausubel, F. *et al.*, editor, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Una serie de diferentes métodos se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75:93-102, 1998).

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. Otro aspecto de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica. Un aspecto adicional de la invención es un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo según la presente invención, formulado conjuntamente con un portador farmacéutico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “portador farmacéutico” incluye cualquiera y la totalidad de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión).

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede resultar necesario recubrir el compuesto con un material, o coadministrar el compuesto con un material, para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse en un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo liposomas o un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina y soluciones tamponadoras acuosas. Entre los portadores farmacéuticos se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida de la técnica.

Las expresiones “administración parenteral” y “administrado parenteralmente” tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal

El término “cáncer” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de células pulmonares no pequeñas (CPCNP), cáncer

5 pulmonar de células bronquioloalveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o
 cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal,
 10 cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de
 Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad
 de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula
 tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de
 uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uretra, carcinoma de células renales,
 carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasma del sistema nervioso
 15 central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas,
 schwanomas, ependinomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario
 y sarcoma de Ewings, incluyendo las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriormente indicados, o
 de una combinación de uno o más de los cánceres anteriormente indicados.

15 Dichas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes,
 agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede
 garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes
 antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabén, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede
 resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones.
 20 Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de
 agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden
 utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se
 formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por
 el experto en la materia.

30 Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente
 invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para
 conseguir la respuesta terapéutica deseada en un paciente, composición y modo de administración particulares, sin
 resultar tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores
 farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, la vía
 de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se utiliza, la
 duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las
 35 composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general e historia médica del
 paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de la técnica médica.

La composición debe ser estéril y líquida en grado suficiente para que la composición resulte administrable mediante
 jeringa. Además de agua, el portador preferentemente es una solución salina tamponada isotónica.

40 Puede mantenerse la fluidez correcta, por ejemplo mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina,
 mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la
 utilización de surfactantes. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares,
 polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición.

45 Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan
 intercambiamente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones
 “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con
 independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser
 exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida
 50 la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula
 originalmente transformada. En donde se pretendan utilizar denominaciones diferentes, éstas resultarán evidentes a
 partir del contexto.

55 El término “transformación” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento de transferencia
 de un vector/ácido nucleico al interior de una célula huésped. En el caso de que se utilicen células sin grandes
 barreras de pared celular a modo de células huésped, la transfección se lleva a cabo mediante, por ejemplo, el
 método de precipitación con fosfato de calcio, tal como se describe en Graham F.L. y van der Eb A.J., *Virology*
 52:456-467, 1973. Sin embargo, también pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como
 la inyección nuclear o la fusión de protoplasto. En el caso de que se utilicen células procarióticas o células que
 60 contenga construcciones sustanciales de pared celular, un método de transfección es, por ejemplo, el tratamiento de
 calcio utilizando cloruro de calcio tal como se describe en Cohen, S.N. *et al.*, *PNAS* 69:2110-2114, 1972.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “expresión” se refiere al procedimiento por el que se transcribe un ácido nucleico en ARNm y/o al procedimiento por el que el ARNm transcrito (también denominado “transcrito”) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente “producto génico”. En el caso de que se derive el polinucleótido de ADN genómico, la expresión en una célula eucariótica puede incluir el procesamiento del ARNm.

Un “vector” es una molécula de ácidos nucleicos, en particular autorreplicativa, que transfiere una molécula de ácidos nucleicos insertada al interior de células huésped o entre las mismas. El término incluye vectores que funcionan principalmente insertando ADN o ARN en una célula (por ejemplo la integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan principalmente replicando ADN o ARN, y los vectores de expresión que funcionan transcribiendo y/o traduciendo ADN o ARN. También se encuentran incluidos los vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriormente descritas.

Un “vector de expresión” es un polinucleótido que, al introducirlo en una célula huésped apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un “sistema de expresión” habitualmente se refiere a un vector de expresión adecuado que pueden funcionar rindiendo un producto de expresión deseado.

Descripción de las secuencias de aminoácidos

- 20 SEC ID nº 1 dominio variable de cadena pesada <ErbB3> HER3 clon 29
- SEC ID nº 2 dominio variable de cadena ligera <ErbB3> HER3 clon 29
- SEC ID nº 3 dominio variable de cadena pesada <c-Met> Mab 5D5
- SEC ID nº 4 dominio variable de cadena ligera <c-Met> Mab 5D5
- SEC ID nº 5 cadena pesada <ErbB3> HER3 clon 29
- 25 SEC ID nº 6 cadena ligera <ErbB3> HER3 clon 29
- SEC ID nº 7 cadena pesada <c-Met> Mab 5D5
- SEC ID nº 8 cadena ligera <c-Met> Mab 5D5
- SEC ID nº 9 cadena pesada <c-Met> Fab 5D5
- SEC ID nº 10 cadena ligera <c-Met> Fab 5D5
- 30 SEC ID nº 11 cadena pesada 1 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_KHSS
- SEC ID nº 12 cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_KHSS
- SEC ID nº 13 cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_KHSS
- SEC ID nº 14 cadena pesada 1 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKH
- SEC ID nº 15 cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKH
- 35 SEC ID nº 16 cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKH
- SEC ID nº 17 cadena pesada 1 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKHSS
- SEC ID nº 18 cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKHSS
- SEC ID nº 19 cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKHSS
- SEC ID nº 20 cadena pesada 1 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_1C
- 40 SEC ID nº 21 cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_1C
- SEC ID nº 22 cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_1C
- SEC ID nº 23 cadena pesada 1 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_6C
- SEC ID nº 24 cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_6C
- SEC ID nº 25 cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_6C
- 45 SEC ID nº 26 región constante de cadena pesada de la IgG1 humana
- SEC ID nº 27 región constante de cadena pesada de la IgG1 humana
- SEC ID nº 28 región constante de cadena ligera kappa humana
- SEC ID nº 29 región constante de cadena ligera lambda humana
- 50 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

- Figura 1 Estructura esquemática de un anticuerpo de longitud completa sin unión específica del dominio CH4 a un primer antígeno 1 con dos parejas de cadena pesada y cadena ligera que comprenden dominios variables y constantes en un orden típico.
- Figura 2 Representación esquemática de un anticuerpo biespecífico trivalente según la invención, que comprende un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno 1 al que: a) fig. 2a, se fusionan dos polipéptidos VH y VL (los dominios VH y VL de ambos formando conjuntamente un sitio de unión de antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno 2,b) fig. 2b, se fusionan dos polipéptidos VH-CH1 y VL-CL (los dominios VH y VL de los cuales forman conjuntamente un sitio de unión de antígeno que se une específicamente a un segundo

- antígeno 2)
- Figura 3 Representación esquemática de un anticuerpo biespecífico trivalente según la invención, que comprende un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno 1 al que se fusionan dos polipéptidos, VH y VL (formando conjuntamente los dominios VH y VL un sitio de unión de antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno 2) en “botón y ojal”.
- Figura 4 Representación esquemática de un anticuerpo biespecífico trivalente según la invención, que comprende un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno 1 al que se fusionan dos polipéptidos VH y VL (formando conjuntamente los dominios VH y VL un sitio de unión de antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno 2, en el que dichos dominios VH y VL comprenden un puente disulfuro entre cadenas, entre las posiciones VH44 y VL100) en “botón y ojal”.
- Figura 5 Unión de anticuerpos biespecíficos a la superficie celular de células de cáncer
- Figura 6 Inhibición de la fosforilación del receptor c-Met inducida por FCH debida a formatos biespecíficos de anticuerpo Her3/c-Met
- Figura 7 Inhibición de la fosforilación del receptor Her3 inducida por HRG debida a formatos biespecíficos de anticuerpo de Her3/c-Met
- Figura 8 Inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por FCH debida a formatos biespecíficos de anticuerpo de Her3/c-Met
- Figura 9 Inhibición de la proliferación de la línea celular cancerosa A431 debida a formatos biespecíficos de anticuerpo Her3/c-Met
- Figura 10 Análisis de la inhibición de la diseminación (dispersión) célula-célula inducida por FCH en la línea celular cancerosa A431 debida a formatos biespecíficos de anticuerpo Her3/c-Met.

Procedimiento experimental

Ejemplos

5

Materiales y métodos

Técnicas de ADN recombinante

10 Se utilizaron métodos estándares para manipular el ADN, tales como los descritos en Sambrook, J. *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

15 Análisis de secuencias de ADN y de proteínas y gestión de los datos de secuencias

Se proporciona información general sobre secuencias de nucleótidos de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas en: Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, publicación del NIH nº 91-3242, 1991. Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos se han numerado según la numeración EU (Edelman G.M. *et al.*, PNAS 63:78-85, 1969; Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, publicación del NIH nº 91-3242, 1991). Se utilizó el paquete informático versión 10.2 del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) y Vector NTI Advance suite versión 8.0 de Infomax para la creación, mapeado, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.

25 Secuenciación de ADN

Se determinaron las secuencias del ADN mediante secuenciación de doble cadena realizada en SequiServe (Vaterstetten, Alemania) y en Geneart AG (Regensburg, Alemania).

30 Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados fueron preparados por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automática. Los segmentos génicos flanqueados por sitios únicos de corte por endonucleasa de restricción se clonaron en plásmidos pGA18 (ampR). El plásmido de ADN se purificó a partir de bacterias transformadas y la concentración se determinó mediante espectroscopía de UV. La secuencia del ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmó mediante secuenciación de ADN. Se sintetizaron con los sitios de restricción 5'-BamHI y 3'-XbaI, segmentos génicos codificantes de la cadena pesada del anticuerpo Her3 (clon 29) de “botón en ojal” que portaban una mutación T366W en el dominio CH3 con una región C-terminal VH de 5D5 unida mediante un conector peptídico (G₄S)_n, así como cadena pesada de anticuerpo Her3 de “botón en ojal” (clon 29) que portaba las mutaciones T366S, L368A e Y407V con una región VL de 5D5 C-terminal unida por un conector peptídico (G₄S)_n. De manera similar, se prepararon mediante síntesis génica con los sitios de restricción flanqueantes BamHI y XbaI, secuencias de ADN

codificantes de Her3 (clon 29) de “botón en ojal” que portaban las mutaciones S354C y T366W en el dominio CH3 con una región VH C-terminal de 5D5 unida por un conector peptídico (G₄S)_n, así como cadena pesada de Her3 (clon 29) de “botón en ojal” que portaba las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V con una región VL C-terminal de 5D5 unida por un conector peptídico (G₄S)_n. Finalmente, se sintetizaron secuencias de ADN codificantes de cadenas pesada y ligera no modificadas de los anticuerpos Her3 (clon 29) y 5D5, con los sitios de restricción flanqueantes BamHI y XbaI. Todos los constructos se diseñaron con una secuencia 5'-terminal de ADN codificante de un péptido líder (MGWSCIIILFLVATATGVHS), que presenta como diana proteínas para la secreción en células eucarióticas.

10 Construcción de los plásmidos de expresión

Se utilizó un vector de expresión de Roche para la construcción de todos los plásmidos de expresión codificantes de proteínas de fusión de cadena pesada VH o cadena ligera VL y de proteína de cadena ligera. El vector estaba compuesto de los elementos siguientes:

- 15 - un gen de resistencia a la higromicina como marcador de selección,
- un origen de replicación, oriP, procedente del virus Epstein-Barr (VEB),
- un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*,
- un gen beta-lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*,
- 20 - el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMVH),
- la secuencia de señal de poliadenilación (“poli A”) de la inmunoglobulina 1 humana, y
- sitios de restricción únicos BamHI y XbaI.

Los genes de fusión de inmunoglobulina que comprendían los constructos de cadena pesada o ligera, así como constructos de “botón en ojal” con dominios VH y VL C-terminales se prepararon mediante síntesis génica y se clonaron en plásmidos pGA18 (ampR) tal como se ha descrito anteriormente. Los plásmidos pG18 (ampR) que portaba los segmentos de ADN sintetizados y el vector de expresión de Roche se digirieron con los enzimas de restricción BamHI y XbaI (Roche Molecular Biochemicals) y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se ligaron segmentos de ADN purificados codificantes de cadenas pesada y ligera en el fragmento BamHI/XbaI aislado del vector de expresión de Roche, resultando en los vectores de expresión finales. Los vectores de expresión finales se transformaron en células de *E. coli*, se aisló el plásmido ADN de expresión (Miniprep) y se sometió a análisis de enzimas de restricción y de secuenciación del ADN. Los clones correctos se cultivaron en 150 ml de medio LB-Amp, se aisló nuevamente el plásmido de ADN (Maxiprep) y se confirmó la integridad de la secuencia mediante secuenciación del ADN.

35 Expresión transitoria de variantes de inmunoglobulina en células HEK293

Se expresaron variantes recombinantes de inmunoglobulina mediante transfección transitoria de células 293-F renales embrionarias humanas utilizando el sistema de expresión FreeStyle™ 293 Expression System siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA). Brevemente, se cultivó una suspensión de células 293-F FreeStyle™ en medio de expresión FreeStyle™ 293 Expression medium, a 37°C/8% de CO₂, y las células se sembraron en medio fresco a una densidad de entre 1x10⁶ y 2x10⁶ células viables/ml el día de la transfección. Se prepararon complejos de ADN-293fectin™ en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, US) utilizando 325 µl de 293fectin™ (Invitrogen, Alemania) y 250 mg de plásmido de ADN de cadena pesada y de cadena ligera en una proporción molar 1:1 para un volumen final de transfección de 250 ml. Se prepararon complejos de ADN-293fectin de “botón en ojal” en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) utilizando 325 µl de 293fectin™ (Invitrogen, Alemania) y 250 mg de plásmido de ADN “botón en ojal” de cadenas pesadas 1 y 2 y de cadena ligera en proporciones molares 1:1:2 para un volumen final de transfección de 250 ml. Se recolectaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos 7 días después de la transfección, mediante centrifugación a 14.000xg durante 30 minutos, y se filtraron a través de un filtro estéril (0,22 µm). Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta la purificación.

50 Purificación de anticuerpos biespecíficos trivalentes y de control

Se purificaron anticuerpos biespecíficos trivalentes y de control a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200. Brevemente, se pasaron sobrenadantes de cultivo celular filtrados a esterilidad por una columna HiTrap HP de proteína A (5 ml) equilibrada con tampón PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no unidas se lavaron con tampón de equilibración. Los anticuerpos y variantes de anticuerpo se eluyeron con tampón citrato 0,1 M, pH 2,8, y las fracciones que contenían proteínas se neutralizaron con 0,1 ml de Tris 1 M, pH 8,5. A continuación, las fracciones de proteínas eluidas se agruparon, se concentraron con un dispositivo de filtración centrífuga de Amicon Ultra (valor de corte de PM: 30 K, Millipore) hasta un volumen de 3 ml y se cargaron en una columna de filtración en gel 16/60 Superdex200 HiLoad de 120 ml (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Las fracciones que contenían anticuerpos biespecíficos y de control purificados con menos de 5% de agregados de alto peso molecular se

agruparon y se almacenaron en forma de alícuotas de 1,0 mg/ml a -80°C . Se generaron fragmentos Fab mediante una digestión con papaína del anticuerpo monoclonal 5D5 purificado y la posterior eliminación de los dominios Fc contaminantes mediante cromatografía de proteína A. Los fragmentos Fab no unidos se purificaron adicionalmente en una columna de filtración en gel 120/60 Superdex200 HiLoad de 120 ml (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, se agruparon y se almacenaron en forma de alícuotas de 1,0 mg/ml a -80°C .

Análisis de las proteínas purificadas

La concentración de proteínas de las muestras de proteínas purificadas se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. Se analizó mediante SDS-PAGE la pureza y el peso molecular de los anticuerpos biespecíficos y de control en presencia y en ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. Se utilizó el sistema de gel premoldeado NuPAGE[®] (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (geles de Tris-glicina al 4-20%). Se analizó el contenido de agregados de muestras de anticuerpos biespecíficos y de control mediante SEC de alto rendimiento utilizando una columna analítica de exclusión por tamaños Superdex200 (GE Healthcare, Suecia) en tampón de desplazamiento de KH_2PO_4 200 mM, KCl 250 mM, pH 7,0 a 25°C . Se inyectaron 25 mg de proteínas en la columna a un caudal de 0,5 ml/minuto y se eluyeron isocráticamente durante 50 minutos. Para el análisis de estabilidad, se incubaron a 4°C y a 40°C durante 7 días concentraciones de 1 mg/ml de proteínas purificadas y después se evaluaron mediante CET de alto rendimiento. La integridad del esqueleto de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de anticuerpo biespecífico reducido se verificó mediante espectrometría de masas Q-TOF de nanoelectropulverización tras la eliminación de los N-glicanos mediante tratamiento enzimático con péptido-N-glicosidasa F (Roche Molecular Biochemicals).

Ensayo de fosforilación de c-Met

Se sembraron 5×10^5 células A549 en cada pocillo de una placa de 6 pocillos el día antes de la estimulación con FCH en RPMI con FCS al 0,5% (suero de feto bovino). Al día siguiente, se sustituyó el medio de crecimiento durante una hora con RPMI que contenía BSA al 0,2% (albúmina de suero bovino). A continuación, se añadieron 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo biespecífico al medio y las células se incubaron durante 10 minutos, añadiendo seguidamente FCH durante 10 minutos adicionales a una concentración final de 50 ng/ml. Las células se lavaron una vez con PBS helado que contenía vanadato sódico 1 mM, colocándolas después sobre hielo y lisándolas en la placa de cultivo celular con 100 μl de tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 al 1%, DOC al 0,5%, aprotinina, PMSF 0,5 mM, vanadato sódico 1 mM). Los lisados celulares se transfirieron a tubos Eppendorf y se dejó que se produjese la lisis durante 30 minutos sobre hielo. Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método BCA (Pierce). Se separaron 30 a 50 μg del lisado en un gel NuPage Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen) y las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante una hora con TBS-T que contenía BSA al 5% y se revelaron con un anticuerpo de c-Met fosfoespecífico dirigido contra Y1230,1234,1235 (44-888, Biosource) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas de transferencia inmunológica se sondearon nuevamente con un anticuerpo que se unía a c-Met no fosforilado (AF276, R&D).

Ensayo de fosforilación de Her3 (ErbB3)

Se sembraron 2×10^5 células MCF7 en cada pocillo de una placa de 12 pocillos en medio de crecimiento completo (RPMI 1640, FCS al 10%). Se dejó que las células crecieran hasta una confluencia de 90% dentro de los dos días posteriores. A continuación, se sustituyó el medio por medio de ayuno que contenía FCS al 0,5%. Al día siguiente, se complementaron los anticuerpos respectivos a las concentraciones indicadas 1 hora antes de la adición de heregulina 500 ng/ml (R&D). Tras la adición de la heregulina, las células se cultivaron durante 10 minutos adicionales antes de recolectar y lisar las células. Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método BCA (Pierce). Se separaron 30 a 50 μg del lisado en un gel NuPage Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen) y las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante una hora con TBS-T que contenía BSA al 5% y se revelaron con un anticuerpo Her3/ErbB3 fosfoespecífico que reconocía específicamente Tyr1289 (4791, Cell Signaling).

Ensayo de dispersión

Se sembraron células A549 (4.000 células en cada pocillo) o A431 (8.000 células en cada pocillo) el día antes del tratamiento con compuesto en un volumen total de 200 μl en placas especiales (E-plates) de 96 pocillos (Roche, 05232368001) en RPMI con FCS al 0,5%. Se realizó un seguimiento de la adhesión y crecimiento celular durante la noche con el aparato analizador de células en tiempo real, que realiza un barrido cada 15 minutos monitorizando la impedancia. Al día siguiente, las células se preincubaron con 5 μl de las diluciones de anticuerpos respectivas en PBS, con barridos cada cinco minutos. Tras 30 minutos, se añadieron 2,5 μl de una solución de FCH, rindiendo una concentración final de 20 ng/ml, y se dejó que transcurriese el experimento durante 72 horas adicionales. Se realizó

un seguimiento de los cambios inmediatos con barridos cada minuto durante 180 minutos, seguido de barridos cada 15 minutos durante el resto del tiempo.

FACS

5

a) Ensayo de unión

10

15

20

Se desengancharon y contaron las células A431. Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en cada pocillo de una placa cónica de 96 pocillos. Las células se peletizaron (1.500 rpm, 4°C, 5 minutos) y se incubaron durante 30 minutos sobre hielo en 50 µl de una serie de dilución del anticuerpo biespecifico respectivo en PBS con FCS al 2% (suero de feto bovino). Las células se peletizaron nuevamente y se lavaron una vez con 200 µl de PBS que contenía FCS al 2% seguido de una segunda incubación de 30 minutos con un anticuerpo acoplado a ficoeritrina dirigido contra Fc humano que se había diluido en PBS que contenía FCS al 2% (Jackson Immunoresearch, 109116098). Las células se peletizaron, se lavaron dos veces con 200 µl de PBS que contenía FCS al 2%, se resuspendieron en solución BD CellFix (BD Biosciences) y se incubaron durante por lo menos 10 minutos sobre hielo. Se determinó la intensidad de fluorescencia media (mfi) de las células mediante citometría de flujo (FACS Canto, BD). Se determinó la imf por lo menos por duplicado en dos tinciones independientes. Se procesaron adicionalmente los espectros de citometría de flujo utilizando el programa informático FlowJo (TreeStar). Se determinó la unión semimáxima utilizando XLFit 4.0 (IDBS) y el modelo 205 de respuesta de dosis en un sitio.

b) Ensayo de internalización

25

30

Se desengancharon y contaron las células. Se introdujeron 5×10^5 células en 50 µl de medio completo en un tubo Eppendorf y se incubaron con 5 µg/ml del anticuerpo biespecifico respectivo a 37°C. Tras los puntos temporales indicados, las células se almacenaron sobre hielo hasta completar el curso temporal. Después, las células se transfirieron a tubos de FACS, se peletizaron (1.500 rpm, 4°C, 5 minutos), se lavaron con PBS + FCS al 2% y se incubaron durante 30 minutos en 50 µl de anticuerpo secundario acoplado a ficoeritrina dirigido contra Fc humano que se diluyó en PBS que contenía FCS al 2% (Jackson Immunoresearch, 109116098). Se peletizaron nuevamente las células, se lavaron con PBS + FCS al 2% y se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo (FACS Canto, BD).

c) Experimento de entrecruzamiento

35

40

Se desengancharon y contaron las células HT29 y se dividieron en dos poblaciones que se tiñeron individualmente con PKH26 y PKH67 (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron de cada una de las poblaciones teñidas, 5×10^5 células, se agruparon y se incubaron durante 30 y 60 minutos con 10 µg/ml del anticuerpo biespecifico respecto en medio completo. Tras los tiempos indicados, las células se almacenaron en hielo hasta completar el curso temporal. Las células se peletizaron (1.500 rpm, 4°C, 5 minutos), se lavaron con PBS + FCS al 2% y se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo (FACS Canto, BD).

Ensayo de luminiscencia del título celular

45

Se cuantificó la viabilidad y proliferación celulares utilizando el ensayo de luminiscencia del título celular (Promega). El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se cultivaron las células en placas de 96 pocillos en un volumen total de 100 µl durante el periodo de tiempo deseado. Para el ensayo de proliferación, se extrajeron las células del incubador y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µl de reactivo de luminiscencia de título celular y las placas multipocillo se introdujeron en un agitador orbital durante 2 minutos. Se cuantificó la luminiscencia tras 15 minutos en un lector de microplacas (Tecan).

50

Ensayo de Wst-1

55

Se llevó a cabo un ensayo de Wst-1 de viabilidad y proliferación celulares a modo de análisis de parámetros de valoración, detectando el número de células metabólicamente activas. Brevemente, se añadieron 20 µl de reactivo Wst-1 (Roche, 11644807001) a 200 µl de medio de cultivo. Se incubaron adicionalmente placas de 96 pocillos durante 30 minutos a 1 hora hasta el desarrollo robusto del pigmento. Se cuantificó la intensidad de tinción en un lector de microplacas (Tecan) a una longitud de onda de 450 nm.

Diseño de anticuerpos <ErbB3-c-Met> biespecíficos trivalentes expresados y purificados

60

En la Tabla 1: se expresaron y purificaron según los métodos generales descritos anteriormente anticuerpos <ErbB3-c-Met> biespecíficos trivalentes basados en un anticuerpo de ErbB-3 de longitud completa (HER3 clon 29) y el dominio VH y VL de un anticuerpo de C-met (5D5 de c-Met) con las características respectivas mostradas en la

Tabla 1: se expresó y purificó el anticuerpo <ErbB3-c-Met> biespecifico trivalente con la nomenclatura VHVL-Ab en la Tabla 1 (ver también en los Ejemplos, posteriormente, y en la fig. 3c)

	Her3/Met_KHSS	Her3/Met_SSKH	Her3/Met_SSKHSS	Her3/Met_1C	Her3/Met_6C
Nombre de molécula					
Nomenclatura VHVL-Ab para anticuerpos biespecificos					
Características:					
Mutaciones de botón-en-ojal	S354C:T366W/Y349'C:T366'S: L368'A:Y407V	T366W/T366'S:L368'A:Y407V	S354C:T366W/Y349'C:T366'S: L368'A:Y407V	S354C:T366W/Y349'C:T366'S: L368'A:Y407V	S354C:T366W/Y349'C:T366'S: L368'A:Y407V
Esqueleto de anticuerpo de longitud completa derivado de:	Her3 clon 29 (quimérico)	Her3 clon 29 (quimérico)	Her3 clon 29 (quimérico)	Her3 clon 29 (quimérico)	Her3 clon 29 (quimérico)
Fragmento VHVL derivado de:	5D5 de cMet (humanizado)	5D5 de cMet (humanizado)	5D5 de cMet	5D5 de cMet (humanizado)	5D5 de cMet (humanizado)
Posición de VH unido al anticuerpo	Cadena pesada botón C-terminal	Cadena pesada botón C-terminal	Cadena de botón C-terminal	Botón C-terminal cadena pesada C-terminal	cadena pesada
Posición de VL unido al anticuerpo	Cadena pesada ojal C-terminal	Cadena pesada ojal C-terminal	Cadena pesada ojal C-terminal	Ojal C-terminal cadena pesada C-terminal	cadena pesada ojal
Conector peptídico	(G 4 S) 3	(G 4 S) 3	(G 4 S) 3	(G 4 S) 1	(G 4 S) 6
VHVL estabilizado por disulfuro	-	+	+	-	-
VH44/VL100					

Ejemplo 1 (figura 5):

Unión de anticuerpos biespecíficos a la superficie celular de las células cancerosas

5 Las propiedades de unión de los anticuerpos biespecíficos a su receptor respectivo sobre la superficie celular se analizaron en células cancerosas A431 en un ensayo basado en citometría de flujo. Se incubaron las células con los anticuerpos primarios mono-específicos o biespecíficos y se detectó la unión de estos anticuerpos a sus receptores afines utilizando un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo que se unía específicamente al Fc del anticuerpo primario. Se graficó la intensidad de fluorescencia media de una serie de dilución de los anticuerpos primarios frente a la concentración del anticuerpo con el fin de obtener una curva sigmoide de la unión. La expresión en superficie celular de c-Met y Her3 se validó mediante la incubación con únicamente el anticuerpo bivalente 5D5 y anticuerpo de Her3 clon 29. El anticuerpo Her3/c-Met_KHSS se une fácilmente a la superficie celular de A431. Bajo estas condiciones experimentales, el anticuerpo puede unirse únicamente mediante su parte Her3 y en consecuencia la intensidad de fluorescencia media no excede la tinción para Her3 clon 29 solo.

Ejemplo 2 (figura 6):

Inhibición de la fosforilación del receptor c-Met inducida por FCH por parte de formatos biespecíficos de anticuerpo Her3/c-Met

20 Para confirmar la funcionalidad de la parte c-Met en los anticuerpos biespecíficos, se llevó a cabo un ensayo de fosforilación de c-Met. En este experimento, se trataron células cancerosas pulmonares A549 o células cancerosas colorrectales HT29 con los anticuerpos biespecíficos o con anticuerpos de control previamente a la exposición a FCH. A continuación, se lisaron las células y se examinó la fosforilación del receptor c-Met. Ambas líneas celulares pueden estimularse con FCH, tal como se observa a partir de la existencia de una banda específica de fosfo-c-Met en la membrana de transferencia inmunológica.

Ejemplo 3 (figura 6):

30 Inhibición de la fosforilación del receptor de Her3 inducida por HRG por parte de formatos biespecíficos de anticuerpo Her3/c-Met

35 Para confirmar la funcionalidad de la parte Her3 en los anticuerpos biespecíficos, se llevó a cabo un ensayo de fosforilación de Her3. En este experimento, se trataron células MCF7 con los anticuerpos biespecíficos o con anticuerpos de control previamente a la exposición a HRG (heregulina). A continuación, se lisaron las células y se examinó la fosforilación del receptor Her3. Her3/c-Met_KHSS inhibió la fosforilación del receptor Her3 en el mismo grado que el Her3 clon 29 parental, indicando que la unión de Her3 y la funcionalidad del anticuerpo no resultan comprometidos por el formato trivalente del anticuerpo.

Ejemplo 4 (figura 8):

45 Inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por FCH por parte de formatos biespecíficos de anticuerpo de Her3/c-Met

50 Se llevaron a cabo ensayos de proliferación de HUVEC para demostrar el efecto mitogénico de FCH. La adición de FCH a HUVEC condujo a un incremento de dos veces de la proliferación. La adición de anticuerpo IgG humano de control en el mismo intervalo de concentraciones que los anticuerpos biespecíficos no presentó ningún impacto sobre la proliferación celular, mientras que el fragmento Fab de 5D5 inhibió la proliferación inducida por FCH. La titulación de Her3/c-Met_KHSS demostró un efecto de inhibición débil del anticuerpo (fig. 8). El efecto fue más pronunciado para el anticuerpo de Her3/Met-6C, indicando que un conector más largo incrementa la eficacia del anticuerpo. Esto demuestra la funcionalidad del componente c-Met en el formato trivalente de anticuerpo.

Ejemplo 5 (figura 9):

55 Inhibición de la proliferación en la línea celular cancerosa A431 por parte de formatos biespecíficos de anticuerpo de Her3/c-Met

60 En el caso de que se sembrase A431 en medio de suero reducido, la adición de FCH indujo, aparte de la dispersión, un efecto mitogénico débil. Esto se explotó para analizar el impacto de Her3/c-Met_KHSS sobre la proliferación de A431 tratadas con FCH. En efecto, los anticuerpos biespecíficos pueden inhibir en gran medida el incremento inducido por FCH de la proliferación (15%). Un anticuerpo IgG1 humano de control no presentó ninguna influencia sobre el crecimiento de las células A431 estimulado por FCH.

Ejemplo 6 (figura 10):

5 Análisis de la inhibición de la diseminación célula a célula (dispersión) inducida por FCH en la línea celular cancerosa A431 por parte de formatos biespecíficos de anticuerpo de Her3/c-Met

10 La dispersión inducida por FCH incluye cambios morfológicos de la célula, resultando en el redondeamiento de las células, protrusiones similares a filopodios, estructuras ahusadas y una cierta motilidad de las células. El analizador celular en tiempo real (Roche) mide la impedancia de un pocillo determinado de cultivo celular y puede, por lo tanto, monitorizar indirectamente los cambios de la morfología y proliferación celulares. La adición de FCH a células A431 y A549 resultó en cambios de la impedancia que se monitorizaron como función del tiempo. Her3/c-Met_KHSS y Her3/Met-6C inhibieron la dispersión inducida por FCH, siendo Her3/Met-6C más eficaz (inhibición de la dispersión de 20,7% y 43,7%) (fig. 10).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Glycart AG

20 <120> Anticuerpos biespecíficos trivalentes

<130> 26063 WO

<150> EP 09005108.7

25 <151> 2009-04-07

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.2

30 <210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> dominio variable de cadena pesada <ErbB3> HER3 clon 29

<400> 1

ES 2 537 100 T3

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera <ErbB3> HER3 clon 29

10

<400> 2

ES 2 537 100 T3

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 119
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> dominio variable de cadena pesada <c-Met> Mab 5D5
 <400> 3

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

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

ES 2 537 100 T3

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
 50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> dominio variable de cadena ligera <c-Met> Mab 5D5

10

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

15

ES 2 537 100 T3

<210> 5
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada Her3-clon 29

10

<400> 5

```

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
20           25           30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35           40           45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
50           55           60

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

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

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100          105

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
    
```


ES 2 537 100 T3

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 6
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera Her3-clon 29_KO1_LC

10 <400> 6

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

ES 2 537 100 T3

115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

<210> 7
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada <c-Met> Mab 5D5

<400> 7

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

ES 2 537 100 T3

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

ES 2 537 100 T3

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

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

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

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

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 9
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada <c-Met> Mab 5D5

10

<400> 9

ES 2 537 100 T3

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
 50 55 60

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

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

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His
 225

ES 2 537 100 T3

<210> 10
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena ligera <c-Met> Fab 5D5

10

<400> 10

```

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100          105          110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          115          120          125

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

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

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

ES 2 537 100 T3

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 11
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada 1 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_KHSS

10

<400> 11

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

ES 2 537 100 T3

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

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

ES 2 537 100 T3

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 450 455 460

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 465 470 475 480

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 485 490 495

Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 500 505 510

Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys
 515 520 525

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 530 535 540

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 545 550 555 560

Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 565 570 575

Leu Val Thr Val Ser Ser
 580

<210> 12
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

ES 2 537 100 T3

<220>

<223> cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_KHSS

<400> 12

5

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

ES 2 537 100 T3

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

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

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

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

ES 2 537 100 T3

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 450 455 460

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 465 470 475 480

Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser
 485 490 495

Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 500 505 510

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro
 515 520 525

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 530 535 540

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 545 550 555 560

Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 565 570 575

Arg

<210> 13
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_KHSS

10 <400> 13

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

ES 2 537 100 T3

<211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cadena pesada 1 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKH

<400> 14

```

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
          20           25           30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
          35           40           45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
          50           55           60

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

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

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

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

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

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

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

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

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

10

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

ES 2 537 100 T3

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 450 455 460

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 465 470 475 480

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 485 490 495

Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly
 500 505 510

Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys
 515 520 525

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 530 535 540

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 545 550 555 560

Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 565 570 575

Leu Val Thr Val Ser Ser
 580

<210> 15
 <211> 577
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKH

10 <400> 15

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

ES 2 537 100 T3

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

ES 2 537 100 T3

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

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

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 450 455 460

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 465 470 475 480

Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser

485

490

495

Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
500 505 510

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro
515 520 525

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
530 535 540

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
545 550 555 560

Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
565 570 575

Arg

<210> 16
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKH

10

<400> 16

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

ES 2 537 100 T3

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 17
 <211> 582
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada 1 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKHSS

10 <400> 17

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

ES 2 537 100 T3

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

ES 2 537 100 T3

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
 450 455 460

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 465 470 475 480

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 485 490 495

Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly

ES 2 537 100 T3

500	505	510
Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys		
515	520	525
Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu		
530	535	540
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
545	550	555
Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
565	570	575
Leu Val Thr Val Ser Ser		
580		

<210> 18
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKHSS

10

<400> 18

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

ES 2 537 100 T3

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

ES 2 537 100 T3

				325						330						335
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	
			340					345					350			
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	
		355					360					365				
Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370					375					380					
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				405					410					415		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
			420					425					430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		435					440					445				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	
	450					455						460				
Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	
465					470					475					480	
Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	
				485					490						495	
Ser	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	
			500					505					510			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	
		515					520					525				
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
	530					535					540					
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	
545					550					555					560	

Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 565 570 575

Arg

<210> 19
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_SSKHSS

10

<400> 19

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

ES 2 537 100 T3

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

ES 2 537 100 T3

<210> 21
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_1C

10

<400> 21

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

ES 2 537 100 T3

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 450 455 460

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln
 465 470 475 480

Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
 485 490 495

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
 500 505 510

Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 515 520 525

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 530 535 540

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
 545 550 555 560

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 565

<210> 22
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_1C

10 <400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

<400> 23

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

ES 2 537 100 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 465 470 475 480

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 485 490 495

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu
 500 505 510

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Met
 515 520 525

Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys Asp
 530 535 540

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 545 550 555 560

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 565 570 575

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 580 585 590

Val Thr Val Ser Ser
 595

<210> 24
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada 2 <ErbB3-c-Met> Her3/Met_6C

10

<400> 24

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala

ES 2 537 100 T3

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

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

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

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 465 470 475 480

ES 2 537 100 T3

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 485 490 495

Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser
 500 505 510

Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 515 520 525

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser
 530 535 540

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 545 550 555 560

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 565 570 575

Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 580 585 590

- 5 <210> 25
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cadena ligera <ErbB3-c-Met> Her3/Met_6C

<400> 25

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

ES 2 537 100 T3

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

- <210> 26
- <211> 330
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

5

<400> 26

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

10

ES 2 537 100 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

ES 2 537 100 T3

275

280

285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 27
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

10

ES 2 537 100 T3

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 28
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

10 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo biespecífico trivalente, que comprende
- 5 a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste de dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo,
 b) un polipéptido que consiste de:
 ba) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, o
 bb) un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, en el
 10 que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VH mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,
 c) un polipéptido que consiste de:
 ca) un dominio variable de cadena ligera (VL), o
 cb) un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de cadena ligera (CL) de
 15 anticuerpo, en el que dicho polipéptido se encuentra fusionado con el extremo N-terminal del dominio VL mediante un conector peptídico al extremo C-terminal de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,
 y en el que el dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH) del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) del polipéptido de c) forman conjuntamente un sitio de unión de antígeno que se
 20 une específicamente al segundo antígeno.
2. Anticuerpo biespecífico trivalente según la reivindicación 1, caracterizado por que el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cada pesada se reúnen, cada uno, en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo, en el que dicha interfaz se altera para estimular la formación
 25 del anticuerpo biespecífico trivalente, en el que la alteración se caracteriza por que:
 i) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada de manera que, dentro de la interfaz original, el dominio CH3 de una cadena pesada que se reúne con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada en el anticuerpo biespecífico trivalente, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral mayor, generando de esta manera una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una
 30 cadena pesada que es posicionable en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada,
 y
 ii) el dominio CH3 de la otra cadena pesada ha sido alterado,
 de manera que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico trivalente,
 35 se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más pequeño, generando de esta manera una cavidad en el interior de la interfaz del segundo dominio CH3, en el interior de la cual puede situarse una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.
3. Anticuerpo biespecífico trivalente según la reivindicación 2, caracterizado por que:
 40 i) dicho residuo aminoácido que presenta un volumen más grande de cadena lateral se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), y
 ii) dicho residuo aminoácido que presenta un volumen más pequeño de cadena lateral se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).
4. Anticuerpo biespecífico trivalente según la reivindicación 2 o 3, caracterizado por que:
 45 ambos dominios CH3 se han alterado adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de manera que puede formarse un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.
5. Anticuerpo biespecífico trivalente según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado por que: el dominio CH3 en i) comprende una mutación T366W, y el dominio CH3 en ii) comprende las mutaciones T366S,
 50 L368A e Y407V.
6. Anticuerpo biespecífico trivalente según la reivindicación 4, caracterizado por que el dominio CH3 en i)
 55 comprende las mutaciones Y349C y T366W, y
 el dominio CH3 en ii) comprende las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V.
7. Anticuerpo biespecífico trivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera
 60 (VL) de anticuerpo del polipéptido de c) se unen y estabilizan mediante un puente disulfuro entre cadenas mediante la introducción de un enlace disulfuro entre las posiciones siguientes:
 i) posición 44 del dominio variable de cadena pesada a posición 100 del dominio variable de cadena ligera,
 ii) posición 105 del dominio variable de cadena pesada a la posición 43 del dominio variable de cadena ligera, o

iii) entre la posición 101 del dominio variable de cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera.

- 5 8. Anticuerpo biespecífico trivalente según la reivindicación 7, caracterizado por que el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo del polipéptido de b) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo del polipéptido de c) se unen y estabilizan mediante un puente disulfuro entre cadenas mediante la introducción de un enlace disulfuro entre las posiciones siguientes:
i) la posición 44 del dominio variable de cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera.
- 10 9. Anticuerpo biespecífico trivalente según la reivindicación 6, caracterizado por que los conectores peptídicos de b) y c) son péptidos idénticos que presentan una longitud comprendida entre 25 y 50 aminoácidos.
10. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico trivalente según las reivindicaciones 1 a 9.
- 15 11. Ácido nucleico codificante de un anticuerpo biespecífico trivalente según las reivindicaciones 1 a 9.

Fig. 1

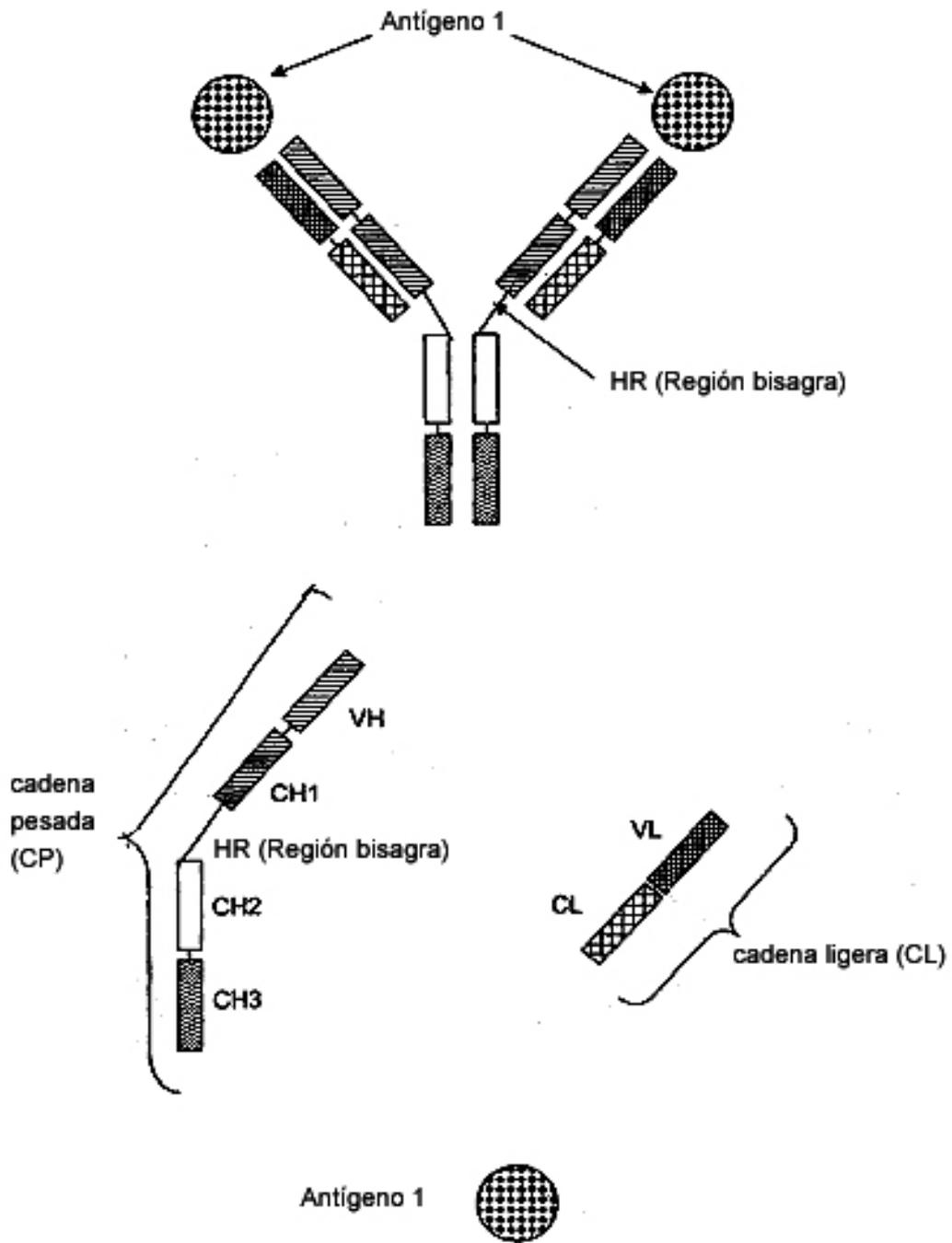


Figura 2a

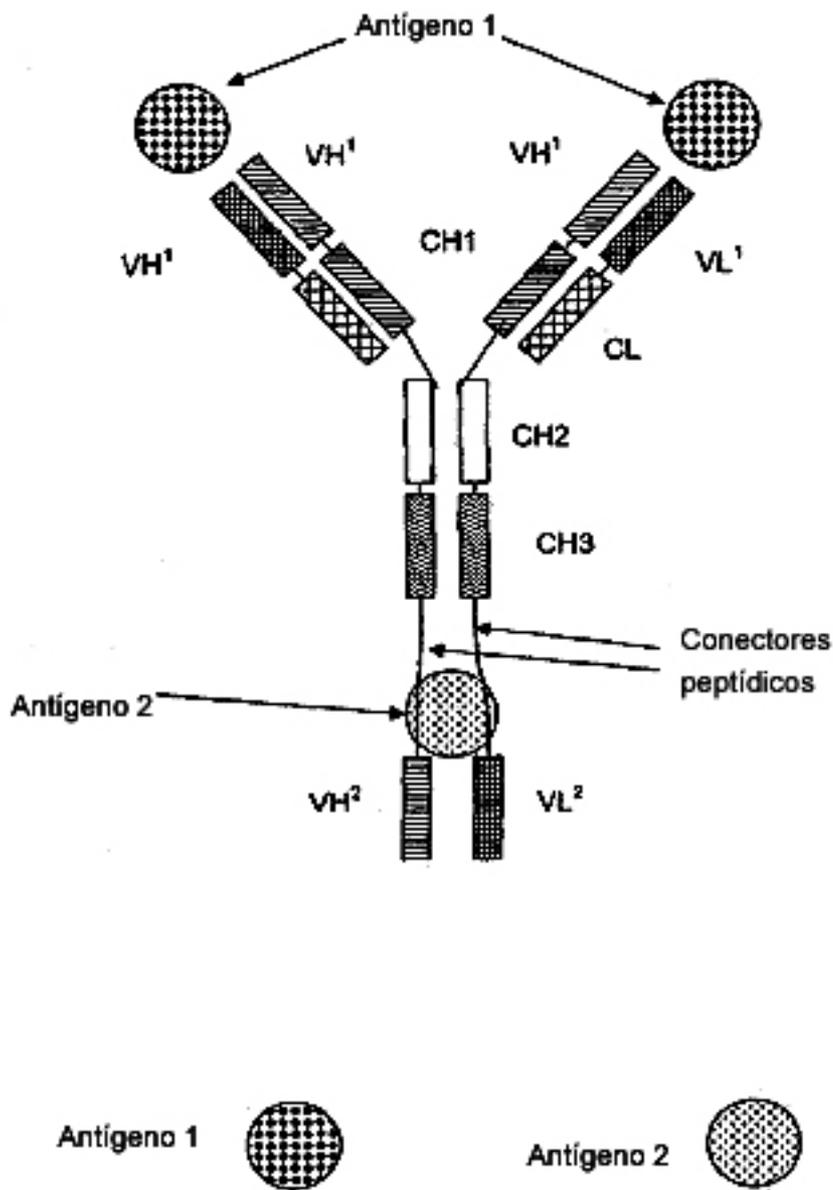


Figura 3

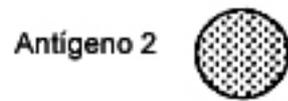
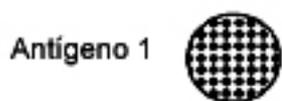
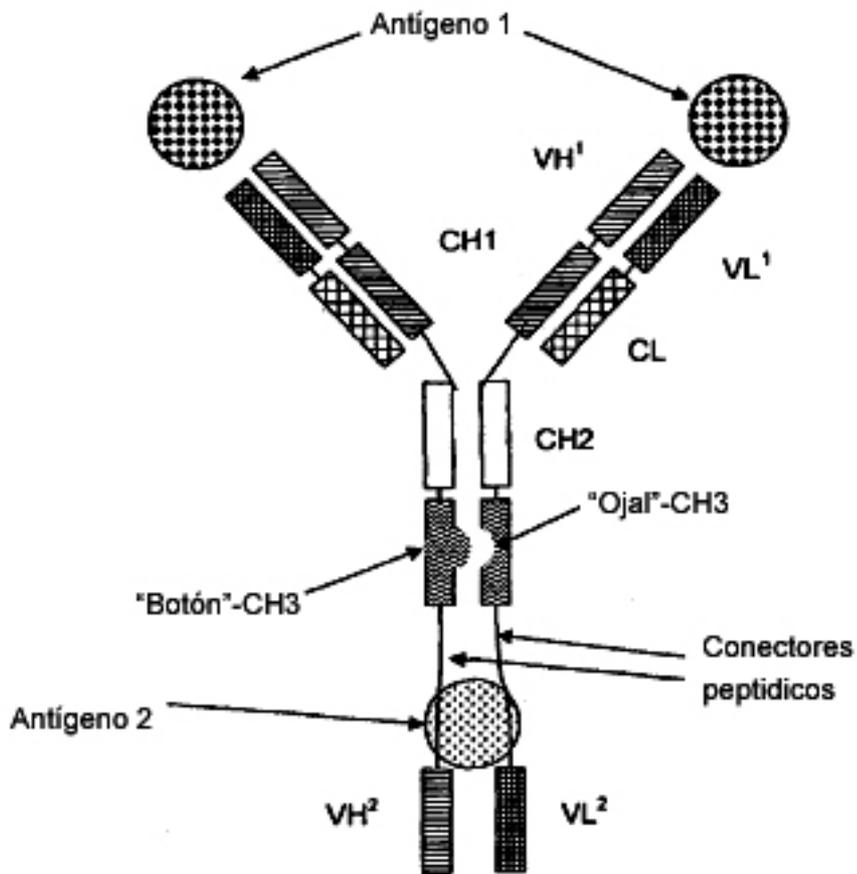


Figura 4

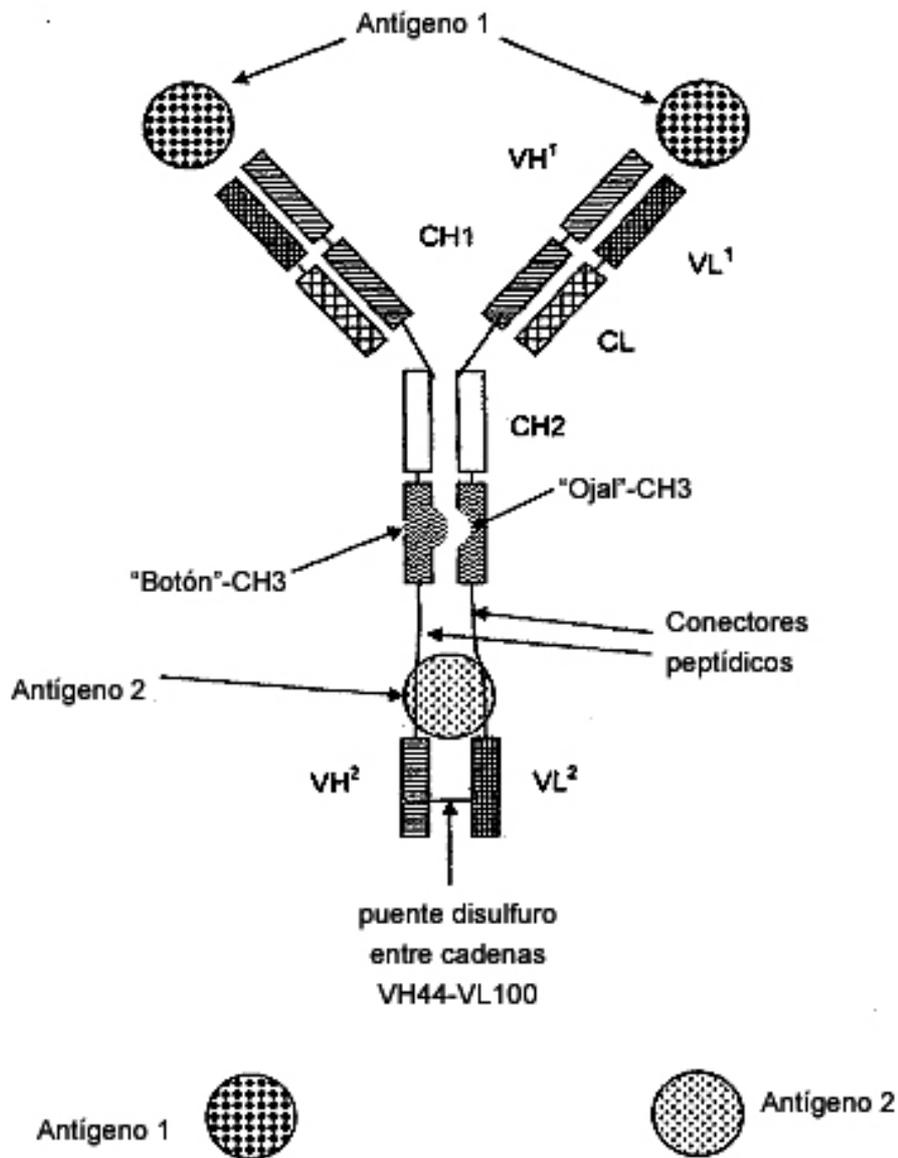


Fig. 5

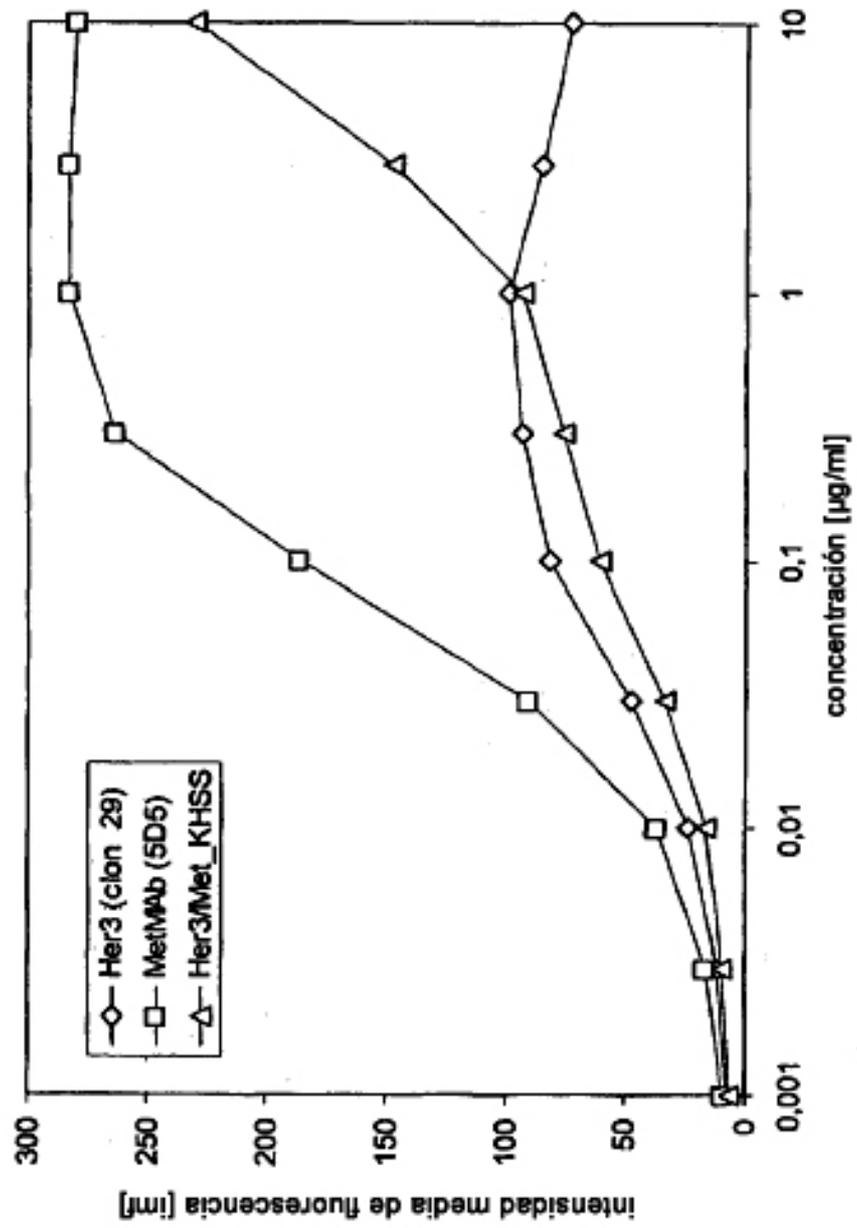


Fig. 6a

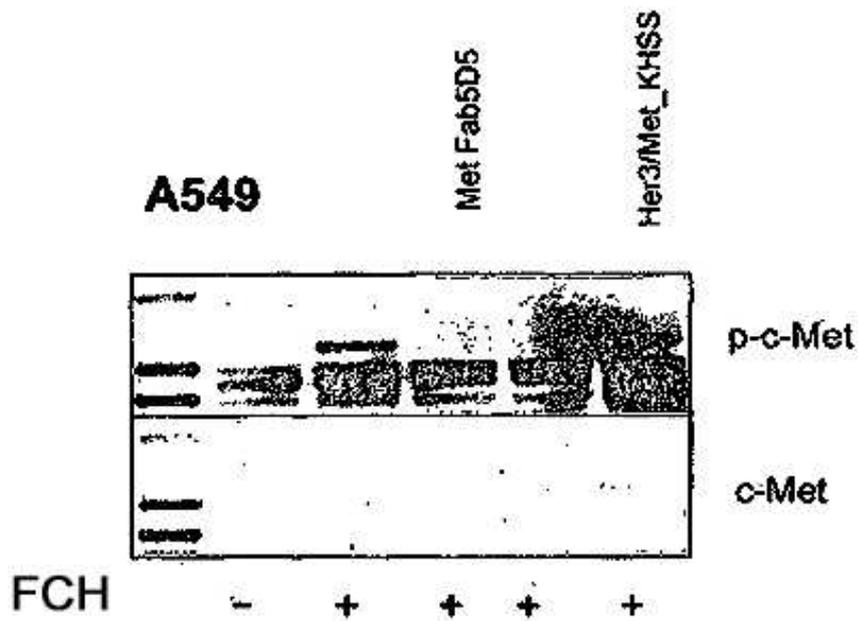


Fig. 6b

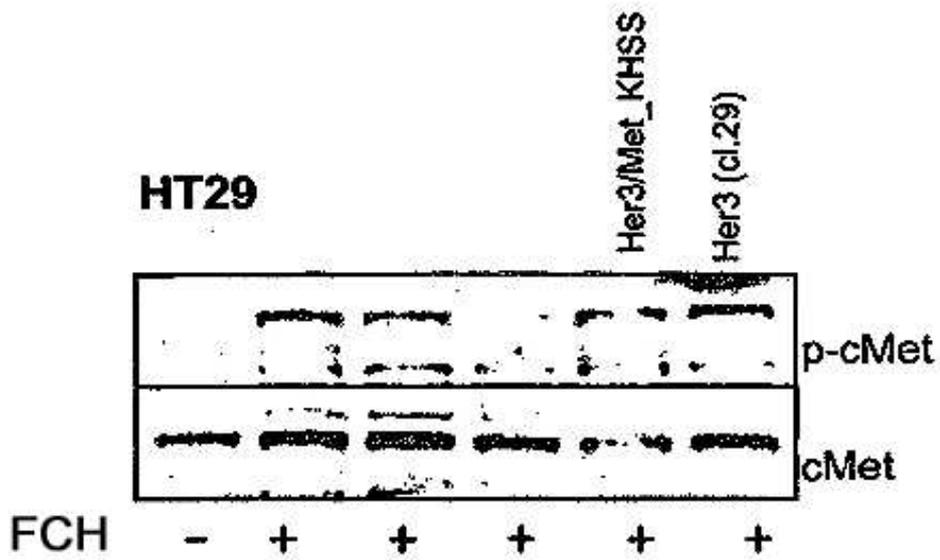
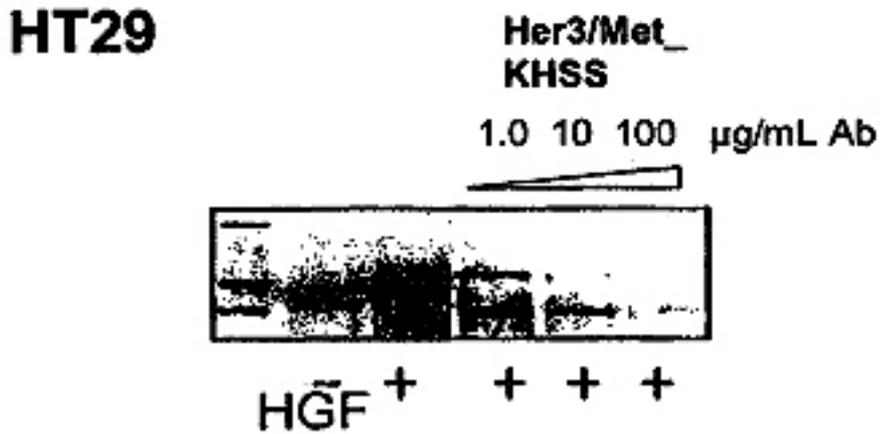


Fig. 6c



100 ng/ml FCH, células desenganchadas

Fig. 7a

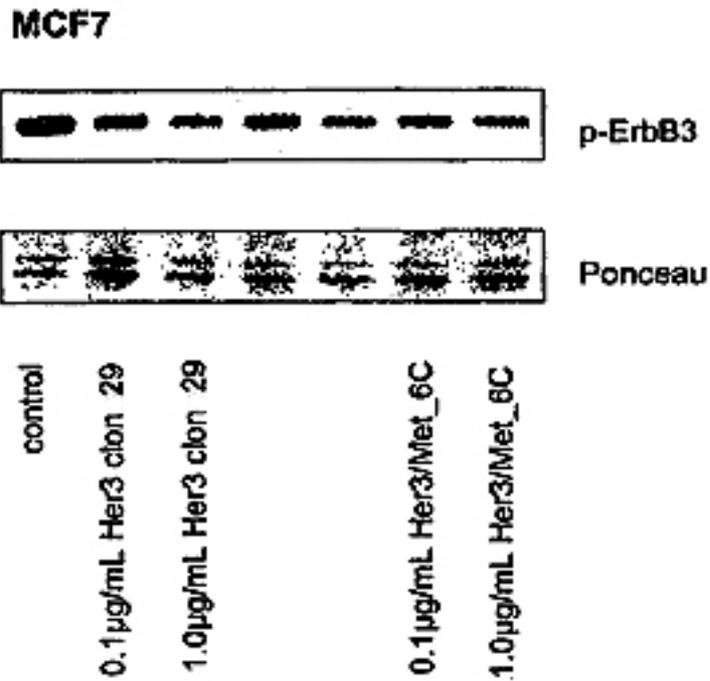


Fig. 7b

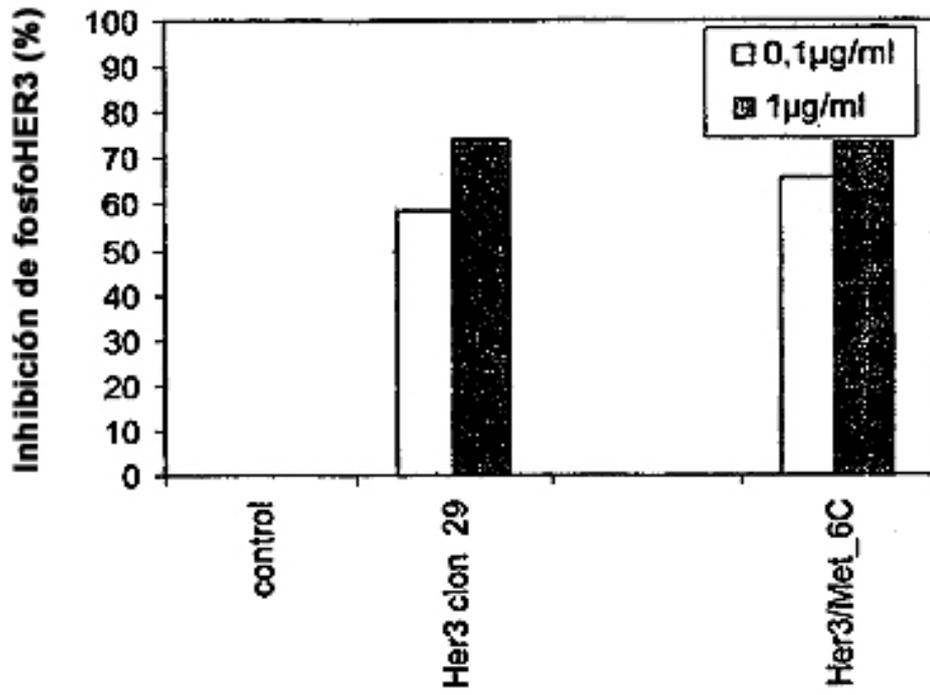


Fig. 9

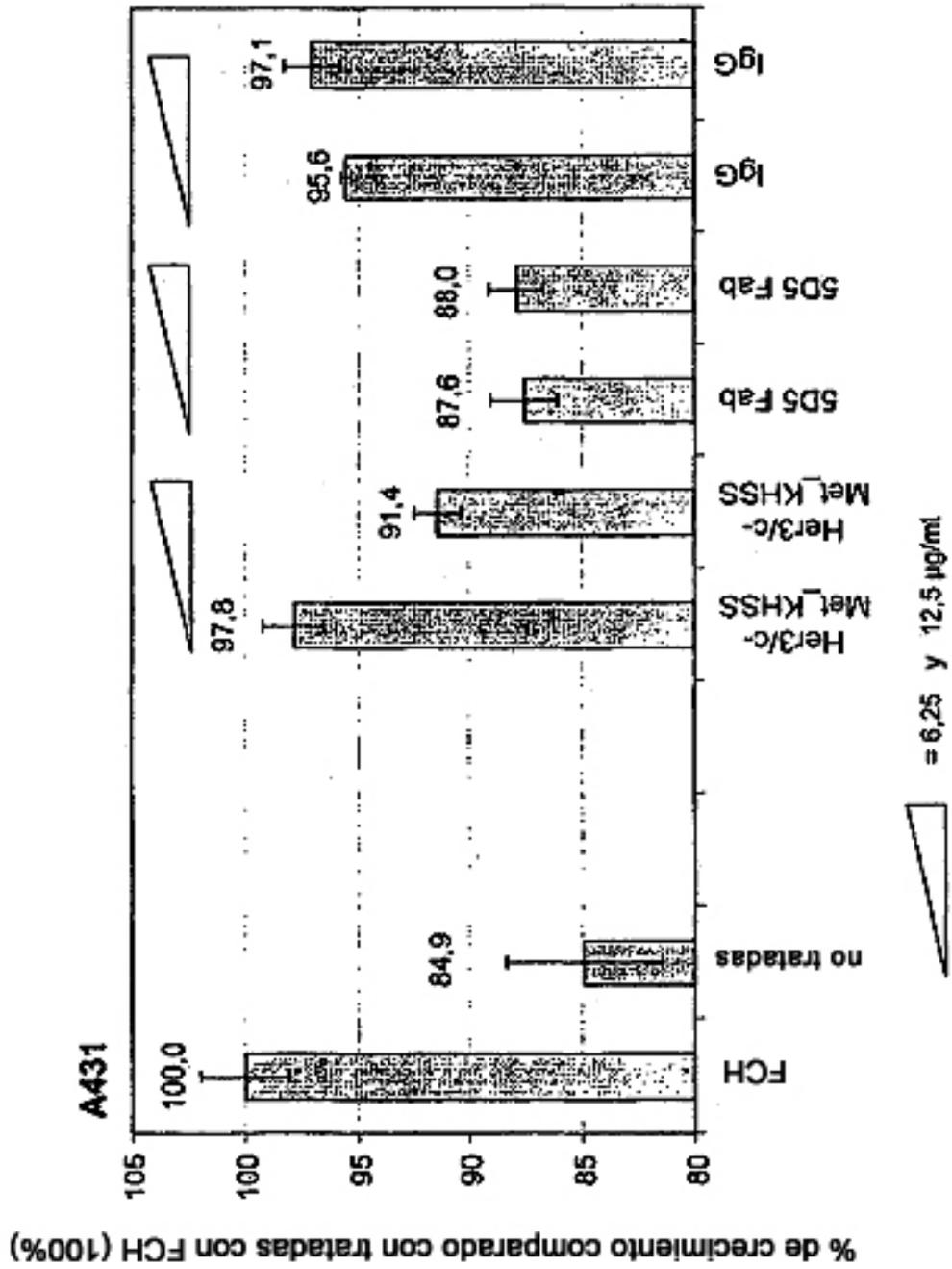


Fig. 10

