

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 491**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2014 PCT/IB2014/058098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14108829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2014 E 14701430 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2943510**

54 Título: **Nuevos fragmentos de anticuerpos, composiciones y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**09.01.2013 IT TO20130012**

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

**02.07.2018**

73 Titular/es:

**METIS PRECISION MEDICINE SB S.R.L. (100.0%)  
Via Magenta 35  
10128 Torino (TO), IT**

72 Inventor/es:

**VIGNA, ELISA;  
MICHIELI, PAOLO y  
COMOGLIO, PAOLO MARIA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 674 491 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

Nuevos fragmentos de anticuerpos, composiciones y usos de los mismos

**Campo de la invención**

La presente descripción se refiere a nuevos fragmentos de anticuerpos con estabilidad *in vivo* mejorada.

**5 Antecedentes**

La terapia dirigida, la nueva frontera del tratamiento del cáncer, emplea herramientas farmacológicas (fármacos o anticuerpos) que bloquean específicamente productos génicos cruciales que sostienen el fenotipo transformado. En la actualidad, la terapia dirigida contra el cáncer se emplea en la clínica para el tratamiento de leucemias mielógenas crónicas (CML), adictas a la molécula de tirosina quinasa ABL, para el tratamiento de un subconjunto de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) y carcinomas de colon y recto (CRC) que dependen de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/HER-1) y para el tratamiento de los melanomas dependientes de BRAF.

Los receptores con actividad de tirosina quinasa (RTKs) son candidatos interesantes para la terapia dirigida ya que a menudo se hiper-activan en varios tipos de tumores. Pueden ser inhibidos por diferentes tipos de moléculas objetivo, tales como anticuerpos, que tras la interacción con la parte extracelular del receptor son capaces de perturbar la señalización intracelular inducida por el receptor, y moléculas pequeñas sintetizadas químicamente que interfieren con la actividad catalítica del receptor.

Entre los diferentes RTKs, el producto proto-oncogénico de *c-met*, el receptor del factor de crecimiento de hepatocito (HGFR/Met), está emergiendo como uno de los oncógenos activados más importantes en el cáncer. Met controla un programa genético conocido como "crecimiento invasivo" que incluye señales pro-mitogénicas, pro-invasivas y anti-apotóticas. Mediante estas señales fisiológicas, Met proporciona una mejor aptitud del tumor, ayudándolo a superar barreras selectivas en la progresión del cáncer. Además, Met mantiene el crecimiento tumoral debido a su capacidad para promover la angiogénesis tumoral. En los últimos años, Met también fue responsable de la agresividad desarrollada por los tumores tratados con agentes anti-angiogénicos y de la resistencia a la radioterapia convencional. Además, la alteración del gen *MET* puede ser la causa principal de la transformación, en todos aquellos casos en los que se ha seleccionado genéticamente para el mantenimiento a largo plazo del fenotipo primario transformado.

Todos los hallazgos enunciados anteriormente han impulsado el desarrollo de varias moléculas adecuadas para inhibir la señalización de Met, incluyendo inhibidores competitivos de HGF, inhibidores químicos de quinasa Met, anticuerpos anti-HGF y anti-Met. Algunas de estas moléculas, hasta ahora, han sido probadas solo con fines de investigación. Ensayos clínicos se están llevando a cabo, en la actualidad, con anticuerpos neutralizantes anti-HGF, anticuerpos anti-Met y varias moléculas pequeñas.

Desde varios puntos de vista, sería preferible un anticuerpo anti-Met capaz de inhibir la señalización de Met. Los anticuerpos son altamente específicos, estables y, gracias a su diseño natural, en general son bien tolerados por el huésped. En los últimos años, se han realizado varios esfuerzos para generar anticuerpos terapéuticos anti-Met. Sin embargo, se han registrado muchos fallos, ya que la mayoría de los anticuerpos anti-Met se comportan como agonistas, imitando la acción de HGF. Esto se debe principalmente al hecho de que, gracias a su estructura bivalente, los anticuerpos pueden estabilizar los dímeros del receptor, permitiendo la trans-fosforilación de Met, con su consecuente activación. En un caso, un anticuerpo anti-Met agonista (5D5) se ha diseñado y convertido en una forma monovalente (5D5 de un solo brazo) que, compitiendo con la unión a HGF, está dotado de potencial terapéutico (1,2). Esta molécula ha entrado recientemente en un ensayo clínico de fase III para el tratamiento de un subgrupo de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, caracterizado por un alto nivel de expresión de Met en los tumores, en combinación con erlotinib (3).

El anticuerpo monoclonal DN30 es una IgG2A de ratón dirigida contra el resto extracelular del receptor Met humano (4). Se une con afinidad sub-nanomolar al cuarto dominio IPT de la región extracelular del receptor Met. Al principio, se caracterizó como un agonista parcial de Met, capaz de promover algunas, pero no todas, las respuestas celulares biológicas mediadas por Met. Más tarde se ha demostrado que puede actuar como un inhibidor del crecimiento tumoral y la metástasis a través de un mecanismo de "desprendimiento" del receptor (5). El desprendimiento de receptores es un mecanismo celular fisiológico de degradación de proteínas que actúa sobre varios factores de crecimiento, citoquinas, receptores y moléculas de adhesión. El desprendimiento de Met se realiza en dos etapas: primero una metaloproteasa, la ADAM-10, escinde el dominio celular de Met que reconoce una secuencia específica localizada inmediatamente antes de la región transmembrana; luego el fragmento transmembrana restante se convierte en el sustrato de una segunda proteasa ( $\gamma$ -secretasa) que separa la porción que contiene quinasa de la membrana y la dirige rápidamente hacia la vía de degradación del proteosoma (6,7). La mejora de este mecanismo ejercido por DN30 conduce a una reducción en el número de receptores de Met expuestos en la superficie celular. Al mismo tiempo, libera un ecto-dominio soluble, "señuelo", en el espacio extracelular. Este último compite con el receptor transmembrana intacto para la unión del ligando e inhibe la homo-dimerización del receptor mediante la

formación de complejos heterodiméricos con *bona fide Met*. Todas estas acciones perjudican fuertemente la señalización mediada por Met y dan como resultado la prevención de los efectos biológicos posteriores.

Recientemente los presentes inventores demostraron que el fragmento Fab monovalente del anticuerpo monoclonal anti-Met DN30 (Fab DN30) se libera de cualquier actividad agonista y mantiene la capacidad de inducir el desprendimiento, dando como resultado un potente inhibidor de Met (8). La inducción del desprendimiento de Met por Fab DN30 depende de la interacción selectiva anticuerpo-antígeno pero es independiente de la activación del receptor. Este mecanismo de acción, basado en la eliminación simple de Met de la superficie celular, proporciona al Fab DN30 una gran ventaja sobre otros inhibidores, ya que puede ser efectivo contra todas las formas de activación de Met, sea o no dependiente de HGF, inducido por sobreexpresión, mutación o amplificación génica.

Si bien el Fab DN30 recombinante es muy atractivo para aplicaciones clínicas, la corta semivida en plasma de Fab, principalmente debido a la eliminación renal, limita severamente su uso para el tratamiento del paciente.

Actualmente, la técnica más consolidada para mejorar las propiedades farmacológicas de un fragmento Fab es aumentar su peso molecular mediante conjugación con polietilenglicol (PEG). La PEGilación del Fab es una ruta seguida en la mayoría de los casos que emplean Fab en la clínica. La unión covalente de las cadenas poliméricas al fragmento de anticuerpo, obtenido eficientemente y sin pérdida de las propiedades de unión al antígeno, no es un proceso obvio y requiere un gran esfuerzo de construcción.

Otra técnica utilizada para mejorar las propiedades farmacológicas de un fragmento Fab es la descrita en el documento de Patente EP-A-1 718 677. Dicho procedimiento, utilizado para generar la forma de un solo brazo del anticuerpo monoclonal 5D5 comentada anteriormente, es la producción, sobre la base recombinante, de tres cadenas de anticuerpos diferentes en la misma célula, la cadena ligera (VL-CL), la cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3) y la porción Fc de la cadena pesada (CH2-CH3). Los dominios CH2-CH3 no son de tipo nativo: están incluidas las mutaciones, que dan lugar a estructuras tridimensionales específicas. En un polipéptido, la región CH2-CH3 incorpora una secuencia que forma una protuberancia, mientras que en el otro polipéptido la región CH2-CH3 contiene una secuencia que forma una cavidad, en la que la protuberancia se puede insertar (protuberancia en estructura de hueco). La presencia de estas estructuras tridimensionales permite la formación preferible de heterodímeros en los que la cadena pesada forma enlaces disulfuro con el fragmento Fc, pero no excluye en absoluto la formación de homodímeros (es decir, dos cadenas pesadas unidas entre sí y dos Fc unidos entre sí). La purificación que permite la separación de los homodímeros no deseados de los heterodímeros deseados es obligatoria. Por lo tanto, el "procedimiento de un solo brazo", aunque muy elegante, es engorroso ya que requiere etapas adicionales en el proceso global que complican la fabricación y reducen el rendimiento del anticuerpo recombinante. Varias estrategias para aumentar la semivida de los fragmentos de anticuerpo se describen en Constantinou y colaboradores, *Biotechnology Letters* 2010; 32 (5): 609-622, y Wier y colaboradores, *Biochemical Society Transactions* (2002); 30 (4): 512-516.

Por lo tanto, se siente la necesidad de una solución diferente que aumente la semivida en plasma de Fab para uso terapéutico *in vivo*.

### Compendio de la invención

El objetivo de esta descripción es proporcionar un fragmento de anticuerpo con estabilidad mejorada *in vivo*.

De acuerdo con la invención, el objetivo anterior se logra gracias al tema recogido específicamente en las reclamaciones adjuntas, que se entiende que forman parte integrante de esta descripción.

Una realización de la presente descripción proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera y dos dominios constantes y un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada y dos dominios constantes, en donde dos dominios constantes de cadena son dominios constantes de cadena ligera y dos dominios constantes son dominios constantes de cadena pesada CH1, fusionados en diferentes combinaciones a los dominios variables.

Una realización adicional de la presente descripción se refiere a un fragmento de anticuerpo como se definió anteriormente que es más estable *in vivo* que la molécula Fab que comprende los dominios variables de cadena ligera y pesada.

Otra realización más se refiere a un fragmento de anticuerpo como se definió anteriormente que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR/Met).

### Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora en detalle, puramente a modo de ejemplo ilustrativo y no limitante y, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1: desprendimiento de Met y regulación posterior en las células adictas a Met tratadas por MvDN30 quimérico o Fab DN30 murino. A: una línea celular humana de carcinoma gástrico SNU-5; B: una línea celular de carcinoma de

pulmón no microcítico H1993-NCI. Las células se incubaron durante 48 horas en medio libre de suero con las concentraciones indicadas de los dos fragmentos de anticuerpo derivados de mAb DN30. Los niveles totales de Met se determinaron mediante el análisis de transferencia de Western de extractos celulares utilizando anticuerpos anti-Met. Las dos bandas Met corresponden a las formas no procesadas (Met p190) y maduras (Met p145) del receptor. El desprendimiento de Met se determinó mediante el análisis de transferencia de Western del medio acondicionado utilizando anticuerpos anti-Met. Ambas moléculas inducen eficientemente el desprendimiento de Met/posterior regulación.

Figura 2: Ensayo de crecimiento de las células adictas a Met tratadas con MvDN30 quimérico o Fab DN30 murino. A: una línea celular de carcinoma de pulmón no microcítico EBC-1; B: una línea celular humana de carcinoma gástrico Hs746T. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (1.000/pocillo) en medio FCS al 10%. Después de 24 horas las células se trataron con concentraciones crecientes de anticuerpos durante 72 horas más. El número de células se evaluó mediante CellTiter-glo (Perkin Elmer). Cada punto es la media de los valores por triplicado; las barras representan la desviación estándar. Ambas moléculas inhiben eficientemente el crecimiento celular de las células adictas a Met.

Figura 3: Representación esquemática de las nuevas moléculas derivadas de DN30. Parte superior: Fab DN30 quimerizado (MvDN30); centro: Doble Fab de dominio constante con los dominios constantes duplicados en tándem (DCD-MvDN30.1); Parte inferior: Doble Fab de dominio constante con los dominios constantes duplicados intercambiados recíprocamente (DCD-MvDN30.2). VH: dominio variable de la cadena pesada de DN30. VL: dominio variable de la cadena ligera de DN30. CH1: dominio constante 1 derivado de la cadena pesada de IgG1 humana. CL: dominio constante derivado de la cadena ligera kappa humana. Etiquetas Strep e His: secuencias incluidas para permitir la purificación de proteínas y la inmuno detección.

Figura 4: Análisis de las nuevas moléculas derivadas de DN-30. Las proteínas purificadas indicadas se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. El gel se tiñó con Gel Code Blue (Pierce). Todas las moléculas muestran dos bandas con el peso molecular esperado.

Figura 5: Unión a Met de moléculas DCD-MvDN30. Análisis de unión ELISA de MvDN30, DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 (fase líquida) a una quimera Met-Fc (fase sólida). La unión se reveló utilizando anticuerpos anti-strepTAG. O.D.: Densidad óptica; A.U.: Unidades arbitrarias. Cada punto es la media de los valores por triplicado; las barras representan la desviación estándar. Las nuevas moléculas se unen a Fc-Met con la misma alta afinidad.

Figura 6: Actividad agonista de moléculas DCD-MvDN30. Las células A549 se privaron de alimento durante 24 horas y después se estimularon durante 10 minutos a 37°C con las diferentes moléculas en las concentraciones indicadas. La activación de Met se determinó mediante inmuno precipitación con anticuerpos anti-Met seguido de la transferencia de Western con anticuerpos anti-Met específicos para los restos de Met de Tyr 1234/1235 fosforilados, el principal sitio de fosforilación (parte superior). La misma transferencia se probó nuevamente con anticuerpos anti-Met (parte inferior). Las nuevas moléculas no activan significativamente el receptor Met.

Figura 7: Actividad agonista de moléculas DCD-MvDN30. Las células A549 se privaron de alimento durante 24 horas y después se estimularon durante 10 minutos a 37°C con las diferentes moléculas en las concentraciones indicadas. La activación de AKT y ERK-1,2 se determinó mediante la transferencia de Western con anticuerpos anti-AKT y anti-ERK específicos para la forma fosforilada. La misma transferencia se probó nuevamente con anticuerpos anti-Vinculina (parte inferior) para controlar la carga de proteína. Las nuevas moléculas no activan significativamente la señalización dependiente de Met.

Figura 8: Desprendimiento de Met y regulación posterior en células tratadas con moléculas DCD-MvDN30. Las células A549 se incubaron durante 72 horas en medio libre de suero con las moléculas indicadas (500 nM). Los niveles totales de Met se determinaron mediante el análisis de transferencia de Western de extractos celulares utilizando anticuerpos anti-Met. Las dos bandas de Met corresponden a las formas no procesadas (Met p190) y maduras (Met p145) del receptor. Como un control de carga, se probó el filtro con una proteína no relacionada (actina). El desprendimiento de Met se determinó mediante el análisis de transferencia de Western del medio acondicionado utilizando anticuerpos anti-Met. Las nuevas moléculas inducen eficientemente el desprendimiento de Met.

Figura 9: Inhibición de la activación de Met inducida por HGF por moléculas DCD-MvDN30. Las células A549 se incubaron durante 24 horas en medio libre de suero más las moléculas indicadas (1.000 nM) y se estimularon después durante 10 minutos con HGF (100 ng/ml). La activación de Met se determinó en lisados celulares totales mediante la transferencia de Western con anticuerpos anti-Met específicos para los restos de Met de Tyr 1234/1235 fosforilados, el principal sitio de fosforilación. La misma transferencia se probó nuevamente con anticuerpos anti-Met. La activación de AKT y ERK-1,2 se determinó mediante la transferencia de Western con anticuerpos anti-fosfoAKT o anti-fosfoERK. La misma transferencia se probó nuevamente con anticuerpos anti-AKT o ERK-1,2. Para controlar la carga de proteínas el filtro se probó también con anticuerpos anti-Vinculina. Las nuevas moléculas inhiben fuertemente la activación de Met inducida por HGF y la señalización dependiente de Met.

Figura 10: Crecimiento dependiente del anclaje de las células adictas a Met tratadas con DCD-MvDN30.1 o DCDMvDN30.2 o MvDN30. A, B, C, D: líneas celulares humanas de carcinoma gástrico; E, F: líneas celulares de carcinoma de pulmón no microcítico. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (1.000/pocillo) en medio FCS al 5%. Después de 24 horas las células se trataron con concentraciones crecientes de las diferentes moléculas durante 72 horas más. El número de células se evaluó mediante CellTiter-glo (Promega). Los gráficos representan el porcentaje de células vivas respecto del control no tratado. Cada punto es la media de los valores por triplicado. Las nuevas moléculas inhiben eficientemente el crecimiento celular de las células adictas a Met.

Figura 11: Crecimiento independiente del anclaje de las células tratadas con DCD-MvDN30.1 o DCD-MvDN30.2 o MvDN30. Las células A549 se sembraron en medio semisólido (agarosa al 5%) con o sin HGF (50 ng/ml) en presencia de 1,5 mM de DCD-MvDN30.1 o DCD-MvDN30.2 o MvDN30. Después de 21 días las colonias se tiñeron con sal de tetrazolio. Las colonias se cuantificaron contando los píxeles en cada área del pocillo con el software MetaMorphOffline. Cada punto es la media de los valores por triplicado. Las nuevas moléculas inhiben eficientemente el crecimiento celular independiente del anclaje dependiente de HGF.

Figura 12: Perfil farmacocinético *in vivo* de DCD-MvDN30.1, DCD-MvDN30.2 o MvDN30. Los ratones inmunodeficientes se inyectaron por vía intraperitoneal con una única dosis (100 µg) de DCD-MvDN30.1 o DCD-MvDN30.2 o MvDN30. La sangre periférica se recogió a diferentes puntos de tiempo. Las concentraciones de suero de las moléculas terapéuticas se midieron mediante ELISA. El gráfico representa la cantidad de moléculas circulantes en función del tiempo. Las muestras son por triplicado, las barras representan las desviaciones estándar.

Figura 13: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de una primera realización de un primer polipéptido de un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente descripción. Las secuencias corresponden al polipéptido derivado de la cadena ligera, VL-CL-CL. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como en las de aminoácidos.

Figura 14: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de una primera realización de un segundo polipéptido de un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente descripción. Las secuencias corresponden al polipéptido derivado de la cadena pesada, VH-CH1-CH1-TAGs. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como en las de aminoácidos. Las etiquetas de Estreptocina e Histidina en letras mayúsculas y cursivas.

Figura 15: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de una segunda realización de un primer polipéptido de un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente descripción. Las secuencias corresponden al polipéptido derivado de la cadena ligera, VL-CL-CH1-TAGs. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como en las de aminoácidos. Las etiquetas de Estreptocina e Histidina en letras mayúsculas y cursivas.

Figura 16: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de una segunda realización de un segundo polipéptido de un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente descripción. Las secuencias corresponden al polipéptido derivado de la cadena pesada, VH-CH1-CL. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como en las de aminoácidos.

Figura 17: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de DN30. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como en las de aminoácidos.

Figura 18: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de DN30. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como en las de aminoácidos.

#### Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora en detalle, a modo de ejemplo no limitante, con referencia a fragmentos de anticuerpos capaces de unirse específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.

Está claro que el alcance de esta descripción no está de ninguna manera limitado a dicho antígeno diana, ya que los fragmentos de anticuerpos descritos aquí se pueden caracterizar por unirse específicamente a otros antígenos diana.

En la siguiente descripción, se dan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones. Las realizaciones se pueden practicar sin uno o más de los detalles específicos, o con otros métodos, componentes, materiales, etc. En otros casos, estructuras, materiales, u operaciones bien conocidas no se muestran o describen en detalle para evitar aspectos oscuros de las realizaciones.

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a “una realización” o “una realización” significa que un rasgo, estructura, o característica particular descrita en relación con una realización están incluidas en al menos una realización. De este modo, las apariencias de las frases “en una realización” o “en una realización” en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no necesariamente se refieren todas a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras, o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Los títulos proporcionados aquí son solo por conveniencia y no interpretan el alcance o significado de las realizaciones.

5 Los anticuerpos son tetrámeros complejos en los que tanto las cadenas pesadas como las ligeras están compuestas por múltiples dominios de Ig, cada uno de los cuales se pliega independientemente. Al comienzo de la era de los anticuerpos se ha demostrado que, a través del tratamiento enzimático, un anticuerpo puede originar fragmentos que mantienen la estructura original y las propiedades de unión al antígeno.

10 Posteriormente, aplicando técnicas de modificación de proteínas, se ha generado una cantidad de diferentes fragmentos de anticuerpos modificados. De acuerdo con el diseño molecular, cada nuevo fragmento de anticuerpo se caracteriza por rasgos particulares (es decir, mayor avidéz, multivalencia, multiespecificidad, deficiencia de ADCC, quimerizado, etc.).

Sin embargo, ninguno de los estudios previos ha abordado la cuestión de la eliminación renal para prolongar la semivida *in vivo* de los fragmentos de anticuerpo.

15 Para este fin, los presentes inventores desarrollaron un fragmento de anticuerpo recombinante que comprende un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera y dos dominios constantes y un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada y dos dominios constantes, en donde dos dominios constantes de cadena son dominios constantes de cadena ligera y dos dominios constantes son dominios constantes de cadena pesada CH1, fusionados en diferentes combinaciones a los dominios variables.

En una realización, el fragmento de anticuerpo descrito aquí es más estable *in vivo* que la molécula Fab que comprende dichos dominios variables de cadena ligera y pesada.

20 En una realización, el fragmento de anticuerpo tiene una semivida prolongada *in vivo* cuando se administra a un paciente humano que la molécula Fab que comprende dichos dominios variables de cadena ligera o pesada debido a una eliminación renal reducida.

Estos fragmentos de anticuerpos se denominaron "Fabs de doble dominio constante" (DCD-Fabs).

25 En una realización preferida, la presente descripción se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera y dos dominios constantes y un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada y dos dominios constantes, en donde dos dominios constantes son dominios constantes de cadena ligera humana y dos dominios constantes son dominios constantes de cadena pesada humana CH1, fusionados en diferentes combinaciones a los dominios variables, en donde el fragmento de anticuerpo es más estable *in vivo* que la molécula Fab que comprende dichos dominios variables de cadena ligera y pesada, y en donde el fragmento de anticuerpo se une específicamente al receptor del factor de crecimiento del hepatocito (HGFR/Met).

En una realización, el dominio variable de cadena ligera se une en su C terminal a un dominio constante de cadena ligera, que se une en su C terminal a un dominio constante de cadena ligera.

35 En otra realización, el dominio variable de cadena ligera se une en su C terminal a un dominio constante de cadena ligera, que se une en su C terminal a un dominio constante de cadena pesada CH1.

En una realización, el dominio variable de cadena pesada se une en su C terminal a un dominio constante de cadena pesada CH1, que se une en su C terminal a un dominio constante de cadena pesada CH1.

En otra realización, el dominio variable de cadena pesada se une en su C terminal a un dominio constante de cadena pesada CH1, que se une en su C terminal a un dominio constante de cadena ligera.

40 En una realización, los dominios constantes contenidos en el primer y segundo polipéptido, cuando se acoplan juntos en el fragmento de anticuerpo, son capaces de generar puentes disulfuro.

45 En una realización preferida adicional, la presente descripción se refiere a fragmentos de anticuerpos como se definieron anteriormente en donde la especificidad del antígeno se proporciona empleando como dominios variables de cadena ligera y pesada los dominios variables de cadena ligera y pesada de DN30 o dominios variables de cadena ligera y pesada humanizados que comprenden las regiones que determinan la complementariedad (CDRs) del anticuerpo monoclonal DN30. El anticuerpo monoclonal DN30 se describió en la solicitud de Patente internacional WO-A-2007/090807.

Un fragmento de anticuerpo de la invención es generalmente un anticuerpo terapéutico. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo antagonista, un anticuerpo bloqueante o un anticuerpo neutralizante.

50 En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o retrasar el progreso de una enfermedad administrando a un sujeto que tiene la enfermedad una cantidad efectiva de un fragmento de anticuerpo de la invención, eficaz para tratar o retrasar el progreso de la enfermedad.

En una realización, la enfermedad es un tumor o metástasis tumoral.

En otra realización, la enfermedad está asociada con la desregulación de la señalización y/o activación del receptor del factor de crecimiento del hepatocito.

5 Un fragmento de anticuerpo de la invención es adecuado para tratar o prevenir afecciones patológicas asociadas con anomalías dentro de la vía de señalización de HGF/HGFR.

En una realización, un anticuerpo de la invención es un antagonista de HGFR.

En una realización, el fragmento de anticuerpo comprende secuencias de unión a antígenos de un donante no humano injertado en una secuencia heteróloga no humana, humana o humanizada (por ejemplo, secuencias de estructura y/o dominio constante). En una realización, el donante no humano es un ratón.

10 En una realización, las secuencias de unión a antígenos comprenden todas las CDRs y/o secuencias de dominio variable de un anticuerpo anti-HGFR murino.

En una realización preferida, el dominio variable de cadena ligera murino se une en su C terminal a un dominio constante de cadena ligera kappa humana, que se une en su C terminal a un dominio constante de cadena ligera kappa humana. En otra realización, el dominio variable de cadena ligera murina se une en su C terminal a un dominio constante de cadena ligera kappa humana que se une en su C terminal a un dominio constante de cadena pesada CH1 de IgG1 humana. En una realización, el dominio variable de cadena pesada murino se une en su C terminal a un dominio constante de cadena pesada CH1 de IgG1 humana, que se une en su C terminal a un dominio constante de cadena pesada CH1 de IgG1 humana. En otra realización, el dominio variable de cadena pesada murino se une en su C terminal a un dominio constante de cadena pesada CH1 de IgG1 humana, que se une en su C terminal a un dominio constante de cadena ligera kappa humana.

15

20

En una realización preferida, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR de un anticuerpo anti-HGFR murino, más preferiblemente las CDRs de DN30, y dos dominios constantes, en donde los dos dominios constantes son: dos dominios constantes de cadena ligera o un dominio constante de cadena ligera y un dominio constante de cadena pesada CH1. En una realización los dos dominios constantes son dominios constantes humanos.

25

En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR de un anticuerpo anti-HGFR murino, más preferiblemente las CDRs de DN30, y dos dominios constantes, en donde los dos dominios constantes son: dos dominios constantes de cadena pesada CH1 o un dominio constante de cadena pesada CH1 y un dominio constante de cadena ligera. En una realización los dos dominios constantes son dominios constantes humanos.

30

La invención proporciona, en una realización más preferida, un fragmento de anticuerpo humanizado que se une a HGFR humano, en donde el anticuerpo es efectivo para inhibir la actividad de HGF/HGFR *in vivo*, comprendiendo el anticuerpo i) en el dominio variable de cadena pesada (VH) las tres secuencias CDRs del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal DN30 (SEQ ID No.:19, 21, 23) y sustancialmente una secuencia de consenso humana, por ejemplo, sustancialmente los restos de la estructura de consenso humano (FR) del subgrupo de cadena pesada humana y ii) en el dominio variable de cadena ligera (VL) las tres secuencias CDRs del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal DN30 (SEQ ID No.: 25, 27, 29) y sustancialmente los restos de la estructura de consenso humano (FR) del subgrupo I de cadena ligera humana K (VKI).

35

En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende un primer polipéptido que comprende como dominio variable de cadena ligera la secuencia del dominio variable de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 12 (dominio variable de cadena ligera DN30) y un segundo polipéptido que comprende como dominio variable de cadena pesada la secuencia de dominio variable de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 4 (dominio variable de cadena pesada DN30).

40

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un fragmento de anticuerpo de la invención (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo antagonista de HGFR de la invención) en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como el cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular.

45

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar una afección patológica asociada con la desregulación de la activación de HGFR en un sujeto, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un fragmento de anticuerpo antagonista de HGFR de la invención, por lo que se trata dicha afección.

50

En un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa HGFR, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un fragmento de anticuerpo antagonista de HGFR de la invención provocando así una inhibición del crecimiento de dicha célula.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa HGFR, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad efectiva de un fragmento de anticuerpo antagonista de HGFR de la invención, tratando por lo tanto, eficazmente, dicho mamífero.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular asociado con la mayor expresión o actividad de HGFR, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un fragmento de anticuerpo antagonista de HGFR de la invención, tratando o previniendo de este modo eficazmente dicho trastorno proliferativo celular.

10 En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en donde el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de HGFR, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula tumoral con una cantidad efectiva de un fragmento de anticuerpo antagonista de HGFR de la invención, tratando de este modo eficazmente dicho tumor. El tumor celular puede ser uno seleccionado de cáncer de mama, colorectal, pulmón, colon, páncreas, próstata, ovario, cervical, sistema nervioso central, renal, hepatocelular, de vejiga, gástrico, de cabeza y cuello, carcinoma papilar (por ejemplo la glándula tiroides), melanoma, linfoma, mieloma, glioma/glioblastoma (por ejemplo, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma anaplásico, oligodendroastrocitoma anaplásico), células de leucemia. En una realización, una célula que es objetivo en un método de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula que es objetivo en un método de la invención es una célula displásica. En otra realización más, una célula que es objetivo en un método de la invención es una célula metastásica. En una realización adicional, una célula que es objetivo en un método de la invención es una célula que expresa HGFR que pertenece al microambiente que mantiene el tumor y/o la metástasis.

15 Los métodos de la invención pueden comprender además etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una realización, un método comprende además una etapa en donde una célula y/o tejido tumoral diana se expone a un tratamiento por radiación o un agente quimioterapéutico. En otra realización, una célula y/o tejido tumoral diana se trata, además de con el fragmento de anticuerpo antagonista de la invención, con inhibidores de HGF (es decir, anticuerpos anti-HGF) u otros compuestos anti-HGFR (es decir, inhibidores de quinasa microcíticos). En una realización adicional, una célula y/o tejido tumoral diana se trata, además de con el fragmento de anticuerpo antagonista de la invención, con moléculas que golpean específicamente otras dianas relevantes en el mantenimiento del fenotipo transformado (es decir, moléculas anti-EGFR).

20 La activación de HGFR es un importante proceso biológico; su desregulación conduce a numerosas afecciones patológicas. Por consiguiente, en una realización de métodos de la invención, una célula que es diana (por ejemplo, una célula cancerígena) es una en la que la activación de HGFR se mejora en comparación con una célula normal del mismo origen de tejido. En una realización, un método de la invención provoca la muerte o la detención del crecimiento de una célula diana. Por ejemplo, el contacto con un fragmento de anticuerpo antagonista de la invención puede dar como resultado la incapacidad de la célula para señalar a través de la vía de HGFR, lo que da como resultado la muerte celular o la detención del crecimiento celular.

25 La invención también se refiere a inmunocombinados, o combinados anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un fragmento de anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente de inhibición del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de bacterias, origen fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

30 El uso de combinados anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para matar o inhibir el crecimiento de células tumorales en el tratamiento del cáncer, permite la administración dirigida del resto del fármaco a los tumores, y la acumulación intracelular en el mismo, donde la administración sistemática de estos agentes farmacológicos no combinados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales así como para las células tumorales que se pretende eliminar.

35 Las formulaciones terapéuticas que comprenden un fragmento de anticuerpo de la invención se preparan para el almacenamiento mezclando el fragmento de anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones; antioxidantes; conservantes; polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas; tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos; agentes quelantes; azúcares; contraiones que forman sales; complejos metálicos y/o tensioactivos no iónicos.

40 La formulación aquí puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se va a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.



Los ingredientes activos pueden también quedar atrapados en microcápsulas preparadas por medio de técnicas descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se van a utilizar para administración *in vivo* deben ser estériles.

5 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el fragmento de anticuerpo de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas.

10 Un fragmento de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. La invención proporciona varios métodos basados en el uso de fragmentos de anticuerpo que tienen propiedades superiores en comparación con anticuerpos monovalentes convencionales.

La presente invención proporciona fragmentos de anticuerpo, que se pueden utilizar para una variedad de fines, por ejemplo como fines terapéuticos, profilácticos y diagnósticos.

15 Los fragmentos de anticuerpo de la invención se pueden utilizar solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de la invención se puede co-administrar con otro anticuerpo, agente (s) quimioterapéutico (s) (incluyendo mezclas de agentes quimioterapéuticos), otro (s) agente (s) citotóxico (s), agente (s) anti-angiogénico (s), citoquinas, y/o agente (s) inhibidor (es) del crecimiento. Tales terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes de, y/o después, de la administración de la terapia o terapias adjuntas.

20 El fragmento de anticuerpo de la invención (y agente terapéutico adjunto) se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. El fragmento de anticuerpo se administra adecuadamente por infusión de pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte si la administración es breve o crónica. El fragmento de anticuerpo de la invención se puede administrar también mediante transferencia génica por medio de vectores virales (por ejemplo, vectores lentivirales) administrados localmente o sistemáticamente.

25 El fragmento de anticuerpo de la invención se formulará, dosificará, y administrará de una manera consistente con una buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no necesita ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con las vías de administración que se utilizaron anteriormente o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis empleadas hasta ahora.

30 Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un fragmento de anticuerpo de la invención (cuando se utiliza solo o en combinación con otros agentes tales como agentes quimioterapéuticos) dependerán del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y curso de la enfermedad, si el fragmento de anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historial clínico del paciente y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El fragmento de anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 mg/kg a 15 mg/kg de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica puede variar de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del fragmento de anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) se pueden administrar al paciente. Tales dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente reciba aproximadamente de dos a aproximadamente veinte, por ejemplo 35 aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis inicial de mayor carga, seguida de una o más dosis más bajas. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

## Resultados

Generación del Fab DN30 quimérico y caracterización de sus propiedades bioquímicas y biológicas.

Como otros anticuerpos monoclonales con potencial terapéutico, se ha generado DN30 en ratones. Por lo tanto, su empleo directo en humanos para fines terapéuticos no es aplicable, ya que la molécula murina sería reconocida por anticuerpos humanos antimurinos (HAMA) que conducen a la eliminación inmuno-mediada de la actividad del anticuerpo. La sustitución de las regiones constantes murinas del anticuerpo con secuencias derivadas de inmunoglobulinas humanas (quimerización de anticuerpos) es suficiente para reducir fuertemente la respuesta HAMA. Los mAbs y Fabs quimerizados se utilizan actualmente en clínica. Mediante técnicas de biología molecular clásicas, los presentes inventores han sustituido los dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras de Fab DN30 con dominios constantes derivados de inmunoglobulinas humanas: el dominio constante de cadena ligera se ha sustituido con el dominio de tipo kappa humano, el más representado en los anticuerpos humanos naturales, mientras que el dominio constante de cadena pesada CH1 se ha sustituido con el dominio homólogo derivado de IgG1 humana. Esta combinación es efectiva: el Fab DN30 quimérico (MvDN30) se une a Met con alta afinidad, induce el desprendimiento de Met e inhibe la proliferación de células adictas a Met, solapando las propiedades de la molécula murina correspondiente (Fig. 1 y Fig. 2).

Diseño molecular de Fab de doble dominio constante.

Utilizando la secuencia de MvDN30 como plantilla, los presentes inventores duplicaron los dominios constantes en cada cadena ligera y pesada (Fab de doble dominio constante). La nueva molécula modificada tiene un peso molecular predicho de 75 KD. Los presentes inventores generaron dos diferentes DCD-Fabs. En la primera molécula los dominios constantes humanos se duplicaron en tándem, generando así una cadena pesada quimérica VH-CH1-CH1 y una cadena ligera quimérica VL-CL-CL. En la segunda molécula el dominio terminal se intercambió recíprocamente, generando así una cadena pesada quimérica VH-CH1-CL y una cadena ligera quimérica VL-CL-CH1 (Fig. 3). Las moléculas recombinantes dimericas correspondientes se nombraron como DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2. Los cDNAs que codifican estas nuevas moléculas se clonaron en un plásmido de expresión y después se expresaron en células eucarióticas. Las proteínas se purificaron del sobrenadante del cultivo celular gracias a la etiqueta de Estreptomicina que se insertó en el C terminal de la secuencia. La Figura 4 muestra la separación de SDS-Page bajo condiciones reductoras de las moléculas recombinantes purificadas que tienen el tamaño de peso molecular correcto.

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 unidos a Met con alta afinidad.

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 purificados se caracterizaron por su capacidad para unirse al receptor Met. Para este fin, los presentes inventores llevaron a cabo ensayos ELISA utilizando un ectodominio de Met en fase sólida y MvDN30, DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 en fase líquida. La unión se reveló utilizando anticuerpos anti-strepTAG (Fig. 5). Este análisis mostró que las tres moléculas monovalentes derivadas de DN30 se unen a Met con una afinidad similar (MvDN30,  $K_d = 0,141 \pm 0,03$  nM; DCD-MvDN30.1,  $K_d = 0,133 \pm 0,02$  nM, DCD-MvDN30.2,  $K_d = 0,130 \pm 0,03$  nM).

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 no inducen la fosforilación de Met.

Los presentes inventores probaron si las nuevas moléculas derivadas de DN30 podían mostrar una actividad agonista de Met en el ensayo de fosforilación de Met. Esto se analizó utilizando células de carcinoma de pulmón humano A459, que representan un sistema estándar para determinar la activación de Met en respuesta a la estimulación del ligando aguda. De hecho, las células A549 expresan los niveles fisiológicos de Met, inactivos en condiciones basales, pero propensos a ser activados por HGF o una molécula mimética del ligando (4, 10). Las células se estimularon durante 15 minutos con cantidades crecientes de MvDN30, DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2. Las células se estimularon también con HGF y mAb DN-30 como controles positivos. La activación de Met se determinó mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfoMet. Como se muestra en la Fig. 6, las nuevas moléculas no muestran cualquier actividad agonista significativa. DCD-MvDN30.1 era indistinguible de MvDN30, estando desprovisto de cualquier actividad agonista. DCD-MvDN30.2 retuvo una actividad agonista residual mínima, que en cualquier caso era despreciable en comparación con mAb DN30 o HGF. Los presentes inventores también verificaron la activación de moléculas que actúan como efectores posteriores de Met. Mientras que la estimulación con HGF indujo la activación de quinasas reguladas por la señal extracelular 1 y 2 (ERK-1 y ERK-2) y AKT/Proteína quinasa B (AKT), DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2, como MvDN30, no afectó al estado de fosforilación de estos traductores de señal (Fig. 7).

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 inducen el desprendimiento de Met.

Los presentes inventores investigaron también si las nuevas moléculas derivadas de MvDN30 mantienen la capacidad para promover el desprendimiento y la posterior regulación del receptor. Las células A549 se incubaron con DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 y MvDN30. Después de 48 horas, la presencia de ectodominio de Met en el medio acondicionado se analizó mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la porción extracelular de Met. Los niveles celulares totales de Met se determinaron también en lisados celulares

utilizando el mismo anticuerpo. Este análisis reveló que tanto DCD-MvDN30.1 como DCD-MvDN30.2 inducían eficientemente el desprendimiento de Met y promovían la posterior regulación de Met, dando como resultado la liberación del ectodominio de Met soluble en el espacio extracelular y disminuyeron los niveles de Met en la célula (Fig. 8). Por lo tanto, las nuevas moléculas derivadas de MvDN30, como MvDN30, lograron una disociación completa entre las propiedades antagonistas y agonistas del mAb DN-30 parental.

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 inhiben la fosforilación de Met inducida por HGF y la posterior señalización.

Los presentes inventores investigaron si DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 podían inhibir la fosforilación de Met inducida por HGF y la posterior señalización. Las células A549 se incubaron con DCD-MvDN30.1, DCD-MvDN30.2 y MvDN30 durante 24 horas y se estimularon después durante 15 minutos con HGF. La activación de Met se determinó mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfoMet. Como se muestra en la Fig. 9, las dos moléculas modificadas, como MvDN30, regulan posteriormente de manera eficaz el receptor Met y deterioran fuertemente el nivel de su fosforilación. Esto dio como resultado una inhibición de la activación de AKT y ERK-1,2 (Fig. 9).

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 inhiben el crecimiento celular dependiente del anclaje adictos a MET.

El crecimiento dependiente del anclaje puede verse afectado por un inhibidor de Met solo en las células que dependen de la señalización de Met para la proliferación/supervivencia, las llamadas células adictas a MET. Los presentes inventores analizaron el panel completo de células tumorales adictas a MET (GTL-16, SNU-5, Hs746T, MKN-45, células de carcinoma gástrico humano, y H1993, EBC-1, células de carcinoma de pulmón humano). Se incubaron células que crecían exponencialmente con concentraciones crecientes de DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2. MvDN30 se incluyó en el ensayo como control positivo. Después de 72 horas se determinó el crecimiento celular utilizando un ensayo ATP basado en luminiscencia. Ambas moléculas derivadas de MvDN30 inhibieron todo el crecimiento de las células adictas a MET de una manera dependiente de la dosis (Fig. 10). Las propiedades inhibitorias de las dos moléculas DCD fueron comparables a las de MvDN30 en todas las células probadas.

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 inhiben el crecimiento celular independiente del anclaje.

Los presentes inventores probaron la capacidad de DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 para inhibir el crecimiento independiente del anclaje de las células A549. Las células se sembraron en medio semisólido incubadas o no con HGF y se trataron con una única dosis de DCD-MvDN30.1, DCD-MvDN30.2 y MvDN30. Después de dos semanas, las colonias de células se tiñeron y se cuantificaron. También en este ensayo, DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 redujeron la formación de colonias dependientes de HGF de una manera similar a la de MvDN30 (Fig. 11).

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 muestran un perfil farmacocinético mejorado *in vivo* en comparación con MvDN30.

Los presentes inventores estudiaron las propiedades farmacocinéticas de DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2, en comparación con MvDN30. Una única dosis de las moléculas mencionadas anteriormente se suministró mediante inyección intraperitoneal a ratones inmunodeficientes. La sangre periférica de los ratones tratados se recogió en diferentes puntos de tiempo después de la administración. Las concentraciones circulantes de las moléculas estudiadas se determinaron mediante ELISA realizado en muestras de suero. DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 alcanzaron niveles de circulación más altos en comparación con MvDN30. Además, ambas moléculas mostraron una semivida aumentada y son más duraderas en la circulación, estando biológicamente disponibles durante más tiempo. La eliminación de DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 está fuertemente mejorada en comparación con MvDN30 (reducción de la eliminación en comparación con MvDN30: 9,6 y 13,7 veces respectivamente para DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2) (Fig. 12 y Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de las diferentes moléculas derivadas de DN30

	t1/2	CL (ml/h)	Vss (ml)	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)	AUCtot (ng/ml) h	Kel (1/h)
MVDN30	8,41	4,36	11,96	7.595	0,5	22.933	0,082
DCD-MvDN30.1	10,53	0,45	5,77	24.130	4	220.188	0,066
DCD-MvDN30.2	10,27	0,32	4,36	24.952	4	314.667	0,068

t1/2: semivida; CL: eliminación; Vss: Volumen de distribución; Cmax: concentración molecular máxima; Tmax: tiempo para alcanzar Cmax; AUCtot: área bajo la curva; Kel: constante de eliminación.

**Material y métodos**

## Cultivo celular

5 La línea celular humana de carcinoma de pulmón EBC-1 y la línea celular de carcinoma gástrico MKN-45 se obtuvieron de Japanese Collection of Research Bioresources (Osaka, Japan). Las células de carcinoma gástrico humano GTL-16 se derivaron de las células MKN-45 como se describe (11). Todas las demás líneas celulares se obtuvieron de la asociación de estándares ATCC-LGC (Sesto San Giovanni, Italia). Todas las líneas celulares se mantuvieron en RPMI excepto Hs746T, en DMEM, y SNU-5, en IMDM. El medio celular se suplementó con Suero Bobino Fetal al 10% (20% para SNU-5) y glutamina 2 mM (Medio, el suero y la glutamina fueron de Sigma Life Science, St. Louis, Missouri).

## 10 Modificación de las proteínas

DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 están compuestas de una cadena pesada y una cadena ligera.

15 La cadena pesada de DCD-MvDN30.1 (SEQ ID NO.: 1 y 2) corresponde al dominio VH del Fab DN30 de tipo nativo (2; SEQ ID NO.: 3 y 4) fusionado al dominio CH1 de inmunoglobulina humana G1 repetido en tándem (SEQ ID NO.: 5 y 6). En el C terminal se añaden una etiqueta de STREP (ST, SEQ ID NO.: 7) y una etiqueta de poli-histidina (HT, SEQ ID NO.: 8) para los fines de purificación y detección. La estructura general corresponde a (del extremo N- al C-): VH-CH1-CH1-ST-HT. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada de DCD-MvDN30.1 se presentan en la Figura 14A y B, respectivamente.

20 La cadena ligera de DCD-MvDN30.1 (SEQ ID NO.: 9 y 10) corresponde al dominio VL del Fab DN30 de tipo nativo (SEQ ID NO.: 11 y 12) fusionado al dominio CL de la inmunoglobulina kappa humana (SEQ ID NO.: 13 y 14) repetido en tándem. La estructura general corresponde a (del extremo N- al C-): VL-CL-CL. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera de DCD-MvDN30.1 se presentan en las Figuras 13A y B, respectivamente.

25 La cadena pesada de DCD-MvDN30.2 (SEQ ID NO.: 15 y 16) corresponde al dominio VH del Fab DN30 de tipo nativo (SEQ ID NO.: 3 y 4) fusionado al dominio CH1 de la inmunoglobulina G1 humana (SEQ ID NO.: 5 y 6) más la región CL de la inmunoglobulina kappa humana (SEQ ID NO.: 13 y 14). La estructura general corresponde a (del extremo N- al C-): VH-CH1-CL. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada de DCD-MvDN30.2 se presentan en las Figuras 16A y B, respectivamente.

30 La cadena ligera de DCD-MvDN30.2 (SEQ ID NO.: 17 y 18) corresponde al dominio VL del Fab DN30 de tipo nativo (SEQ ID NO.: 11 y 12) fusionado al dominio CL de la inmunoglobulina kappa humana (SEQ ID NO.: 13 y 14) más la CH1 de la inmunoglobulina G1 humana (SEQ ID NO.: 5 y 6) más la etiqueta de STREP (ST, SEQ ID NO.:7) y la etiqueta de poli histidina (HT, SEQ ID NO.: 8). La estructura general corresponde a (del extremo N- al C-): VL-CL-CH1-ST-HT. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos son de la cadena ligera de DCD-MvDN30.2 presentada en la Figura 15A y B, respectivamente.

35 Los cDNAs que codifican DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 se sintetizaron químicamente por GeneArt® service (Life Technologies, Paisley, United Kingdom). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los dominios variables de cadena ligera y pesada de Fab DN30 se presentan en las Figuras 17 y 18, respectivamente. Las regiones CDR están subrayadas tanto en las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos, en donde las CDRs del dominio variable de cadena pesada tienen las secuencias de aminoácidos y nucleótidos expuestas en SEQ ID NO.:19 a 24, y las CDRs del dominio variable de cadena ligera tienen las secuencias de aminoácidos y nucleótidos expuestas en SEQ ID NO.: 25 a 30.

45 Todos los constructos se modificaron para contener un sitio BamHI en la terminación 5' y sitio NotI en la terminación 3'. Los fragmentos BamHI-NotI se subclonaron en el vector de expresión pUPEX (U-Protein Express, Utrecht, The Netherlands). La producción a media escala de DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 se subcontrató a U-Protein Express que lo logró mediante transfecciones transitorias en células HEK (riñón epitelial humano). Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando las etiquetas de STREP y las etiquetas de poli-histidina. Las proteínas purificadas se conservaron en PBS más Tween-80 al 0,02% (Sigma-Aldrich) y se almacenaron a 4°C. La pureza se determinó por SDS-PAGE tanto en condiciones reductoras como no reductoras seguido de tinción con Coomassie.

## Inmunoprecipitación y transferencia de Western

50 La inmunoprecipitación se llevó a cabo como se describe en (12) utilizando el mAb anti-Met DO-24 (4). La transferencia de Western se realizó utilizando los siguientes anticuerpos: el clon DL-21 del mAb anti Met humano que reconoce un dominio localizado en la porción extracelular de Met (4); el clon mAb 4G10 del mAb anti-fosfotirosina (Millipore, Temecula, California); anti-fosfo-Met (Tyr 1234/1235), anti-fosfo-Met (Tyr 1349), anti-fosfo-Akt (Ser 473), anti-Akt, anti-fosfo-ERK (Thr 202/Tyr 204) y Abs policlonal anti-ERK (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts).

## Ensayos de unión ELISA

5 La unión de MvDN30, DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 se determinó mediante ELISA utilizando una quimera Met-Fc en fase sólida (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) y concentraciones crecientes del anticuerpo recombinante etiquetado con FLAG en fase líquida. La unión se reveló utilizando un anticuerpo anti-strepTAG II conjugado peroxidasa de rábano (IBA, Olivette, Missouri). Los datos se analizaron y se ajustaron utilizando el software Prism (Graph Pad Software, San Diego, California). La quimera Met-Fc es una proteína de fusión en donde el dominio Fc derivado de una IgG humana se fusiona en la estructura con la porción extracelular de Met.

## Análisis de la activación de Met

10 Las células de carcinoma de pulmón humano A549 subconfluentes se incubaron en medio libre de suero durante 48 horas y después se estimularon durante 10 minutos con las concentraciones indicadas de HGF recombinante (R&D System) o mAb DN-30 purificado, MvDN30, DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 como se describe en (13). Después de la estimulación, las células se lisaron y procesaron inmediatamente como se describe en (12). Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Met (DO-24), se resolvieron por SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos anti-fosfotirosina (Millipore). Las mismas transferencias se volvieron a probar con anticuerpos anti-Met (DL-21) para normalizar la cantidad de Met inmunoprecipitado.

15 Para la inhibición de la fosforilación de Met inducida por HGF las células A549 se trataron durante 24 horas en medio libre de suero con MvDN30, DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2 y se estimularon después con HGF como se describió anteriormente. Las monocapas celulares se lisaron con tampón Laemmli e iguales cantidades de proteínas totales, se separaron en gel de acrilamida mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfo-Met (Tyr 1234/1235).

## Análisis del desprendimiento de Met

20 Las monocapas de A549 subconfluentes se lavaron dos veces con PBS y después se incubaron en medio libre de suero con las concentraciones indicadas de Fab o mAb DN-30. Después de 48 horas, el medio acondicionado se recogió y las células se lisaron con tampón Laemmli. Los niveles de proteína Met se determinaron en 50 µg de lisados celulares totales y en 50 µl de sobrenadante de cultivo celular mediante transferencia de Western utilizando mAb anti-Met DL-21.

## Ensayos biológicos in vitro

30 Para el análisis del crecimiento celular, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (1.000 células/pocillo) en un medio que contiene FBS al 10%. Después de 24 horas, el medio se reemplazó por un nuevo que contenía las moléculas derivadas del DN30 más 5% de anticuerpos FCS en las concentraciones indicadas. El número de células se evaluó después de 72 horas utilizando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La quimioluminiscencia se detectó con un aparato Multilabel Reader Perkin Elmer 2030 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finland).

35 Para los ensayos del crecimiento independiente del anclaje, las células se sembraron en placas de 48 pocillos (500 células/pocillo) en un medio que contiene FBS al 2% y 0,5% de agarosa SeaPlaque (BMA, Rockland, Maine). Se añadieron anticuerpos (1,5 µM) y HGF (50 ng/ml) en el medio de cultivo cada 3 días. Después de 21 días de cultivo, las colonias se tiñeron mediante sales de tetrazolio (Sigma Life Science) y se calificaron mediante el Software MetaMorphOffline (Molecular Device LLC, Sunnyvale, California).

## Análisis farmacocinético

40 Ratones inmunodeficientes NOD-SCID adultos (peso corporal entre 18 y 22 g, un promedio de 20 g) se inyectaron IP con 100 µg de DCD-MvDN30.1 o DCD-MvDN30.2 o MvDN30. La sangre periférica se recogió a diferentes tiempos (para MvDN30: 10, 20 y 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 24, 48 horas; para DCD-MvDN30.1 y DCD-MvDN30.2: 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 24, 48, 72, 96, 144 horas después de la administración). Las concentraciones de moléculas terapéuticas se evaluaron mediante ELISA como se describió anteriormente en la sección de ensayos de unión, interpolando los valores de absorbancia de las muestras en la parte lineal de la curva patrón obtenida mediante diluciones en serie de diferentes moléculas purificadas. Cada punto de tiempo fue el valor promedio de al menos tres ratones.

## Referencias

1) Martens, T., et al. A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin Cancer Res.* (2006); 12: 6144-52.

2) Jin, H., et al. MetMab, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. *Cancer Res.* (2008); 68: 4360-8.

3) [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); Identifier: NCT01456325. "A study of Onartuzumab (MetMab) in combination with Tarceva (Erlotinib) in patients with Met diagnostic-positive Non-Small Cell Lung cancer who have received chemotherapy for advanced or metastatic disease (MetLung)".

4) Prat, M., et al. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci.* (1998); 111: 237-47.

5) Petrelli, A., et al. Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006); 103: 5090-5.

6) Foveau, B., et al. Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell.* (2009); 20: 2495-507.

7) Schelter, F, et al. A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem.* (2010); 285: 26335-40.

8) Pacchiana G, et al. Monovalency unleashes the full therapeutic potential of the DN-30 anti-Met antibody. *J Biol Chem.* (2010); 285: 36149-57.

9) Reichert JM. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs*. (2011); 3: 76-99.

10) Michieli P, et al. An HGF-MSP chimera disassociates the trophic properties of scatter factors from their pro-invasive activity. *Nat Biotechnol* (2002); 20:488-495.

11) Giordano S, et al. p145, A protein with associated tyrosine kinase activity in a human gastric carcinoma cell line. *Mol Cell Biol* 1988 8:3510-3517.

12) Longati P, et al. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 1994 9:49-57.

13) Vigna E, et al. "Active" cancer immunotherapy by anti-Met antibody gene transfer. *Cancer Res* 2008 68:9176-9183

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Metheresis Translational Research S.A.

<120> Nuevos fragmentos de anticuerpos, composiciones y usos de los mismos

5

<130> BWO15799-CF

<160> 30

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1155

<212> DNA

15 <213> artificial

<220>

<223> cadena pesada de DCD-MvDN30.1

20 <400> 1

```

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg cactcccag      60
gtccaactgc aacagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac      240
gagaaattca agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat cttccaccac agcctacatg      300
caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac      360
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagctagca cgaagggcc atcggtcttc      420
cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc      480
aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc      540
gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg      600
accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc      660
agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgcaagcac gaagggccca      720
tcggtcttcc ccctggcacc ctccctcaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc      780
tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg      840
accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtctt caggactcta ctccctcagc      900
agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat      960
cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact     1020
cacacaggtg ccgcatggag ccacccccag ttcgaaaaag gggccgcatg gagccacccc     1080
cagttcgaaa aaggggccgc atggagccac ccccagttcg aaaaaggggc cgcacaccat     1140
caccatcacc attag                                           1155
    
```

<210> 2

<211> 384

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>



ES 2 674 491 T3

<223> cadena pesada aa de DCD-MvDN30.1

<400> 2

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp  
 1 5 10 15

Gly His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

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

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Lys Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr  
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 115 120 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 145 150 155 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 165 170 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 210 215 220

5

ES 2 674 491 T3

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
225 230 235 240

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
260 265 270

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
275 280 285

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
290 295 300

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
305 310 315 320

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
325 330 335

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu  
340 345 350

Lys Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Trp  
355 360 365

Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala His His His His His  
370 375 380

<210> 3  
<211> 334  
5 <212> DNA  
<213> artificial

<220>  
10 <223> dominio VH de DN30

<400> 3  
ggtccaactg caacagcctg ggactgaact ggtgaagcct ggggcttcag tgaagctgtc 60  
ctgcaaggct tctggctaca ccttcaccag ttactggata cactgggtga agcagaggcc 120  
tggacaaggc cttgagtgga ttggagagat taatcctagc agcggtcgta ctaactacaa 180  
cgagaaattc aagaacaagg tcacagtgac tgtagacaaa tcttcacca cagcctacat 240  
gcaactcagc aacctgacat ctgaggactc tgcggtctat tactgtgcaa gtaggggcta 300  
ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 334

15 <210> 4  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>  
<223> dominio aa VH de DN30

<400> 4

ES 2 674 491 T3

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

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

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

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

Lys Asn Lys Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

5 <210> 5  
 <211> 315  
 <212> DNA  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> dominio CH1 humano

<400> 5  
 aagggcccat cgggtttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 60  
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 120  
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 180  
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 240  
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 300  
 gacaaaactc acaca 315

15 <210> 6  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> dominio aa CH1 humano

<400> 6

ES 2 674 491 T3

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 65 70 75 80

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 85 90 95

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 100 105

5 <210> 7  
 <211> 108  
 <212> DNA  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Etiqueta de strep

<400> 7  
 ggtgccgcat ggagccaccc ccagttcgaa aaaggggccg catggagcca cccccagttc 60  
 gaaaaagggg ccgcatggag ccacccccag ttcgaaaaag gggccgca 108

15 <210> 8  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> Etiqueta de polyhis

<400> 8  
 caccatcacc atcaccat 18

25 <210> 9  
 <211> 1035  
 <212> DNA  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> cadena ligera de DCD-MvDN30.1

<400> 9

ES 2 674 491 T3

```

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccag ctccactggt      60
gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc      120
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggtg gtagttatat gagttggttc      180
caacagagac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgcatccaa ccttgaatct      240
ggcatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat      300
cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttatga agaccggctc      360
acgttcgggtg ctggtaccaa ggtggagatc aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc      420
atcttcccg ccatctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg      480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg      540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc      600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgccaagtc      660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtactgtg      720
gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc      780
tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg      840
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac      900
agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa      960
gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac     1020
aggggagagt gttaa                                                         1035

```

<210> 10  
 <211> 344  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> cadena ligera aa de DCD-MvDN30.1

10

<400> 10  
 Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15

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

ES 2 674 491 T3

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

Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro  
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 100 105 110

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

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Val  
 225 230 235 240

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 245 250 255

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 260 265 270

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 275 280 285

ES 2 674 491 T3

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 290 295 300

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 305 310 315 320

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 325 330 335

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 340

5 <210> 11  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> dominio VL de DN30

<400> 11  
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg gtagttatat gagttggttc 120  
 caacagagac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgcatccaa ccttgaatct 180  
 ggcattcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat 240  
 cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttatga agaccgctc 300  
 acgttcggtg ctggtaccaa ggtggagatc aaacga 336

15 <210> 12  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> dominio aa VL de DN30

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

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

Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
 50 55 60

ES 2 674 491 T3

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
65 70 75 80

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

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

<210> 13  
<211> 318  
<212> DNA  
<213> artificial

5

<220>  
<223> dominio CL humano

10

<400> 13  
actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60  
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120  
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180  
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240  
caciaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc 300  
ttcaacaggg gagagtgt 318

15

<210> 14  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> artificial

20

<220>  
<223> dominio aa CL humano

<400> 14  
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
85 90 95

25

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105



ES 2 674 491 T3

<210> 15  
 <211> 1023  
 <212> DNA  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> cadena pesada de DCD-MvDN30.2

<400> 15  
 atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccaactcccag 60  
 gtccaactgc aacagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120  
 tgcaaggtct ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct 180  
 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac 240  
 gagaaattca agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat cttccaccac agcctacatg 300  
 caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac 360  
 tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagctagca cgaagggccc atcggctctc 420  
 cccctggcac cctcctccaa gaggacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc 480  
 aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc 540  
 gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg 600  
 accgtgccct ccagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 660  
 agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtactgtggc tgcaccatct 720  
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 780  
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 840  
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 900  
 ctacgcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 960  
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 1020  
 10 taa 1023

<210> 16  
 <211> 340  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15

<220>  
 <223> cadena pesada aa de DCD-MvDN30.2

20 <400> 16

ES 2 674 491 T3

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp  
 1 5 10 15

Gly His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

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

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Lys Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr  
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 115 120 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 145 150 155 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 165 170 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 210 215 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Val Ala Ala Pro Ser  
 225 230 235 240

ES 2 674 491 T3

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

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val  
 260 265 270

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser  
 275 280 285

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr  
 290 295 300

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys  
 305 310 315 320

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn  
 325 330 335

Arg Gly Glu Cys  
 340

<210> 17  
 <211> 1167  
 <212> DNA  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> cadena ligera de DCD-MvDN30.2

10

<400> 17  
 atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60  
 gacattgtgc tgaccaatc tocagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120  
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg gtagttatat gagttggttc 180  
 caacagagac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgcatccaa ccttgaatct 240  
 ggcattcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat 300  
 cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttatga agaccgctc 360  
 acgttcgggtg ctggtaccaa ggtggagatc aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420  
 atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctggtgt gtgcctgctg 480  
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540  
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600  
 agcacctga cgtgagcaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc ctgccaagtc 660  
 acctatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtgcaagc 720  
 acgaagggcc catcgggtctt cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 780

ES 2 674 491 T3

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 840  
 tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 900  
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 960  
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 1020  
 tgtgacaaaa ctcacacagc tgccgcatgg agccaccccc agttcgaaaa aggggcccga 1080  
 tggagccacc cccagttcga aaaaggggcc gcatggagcc acccccagtt cgaaaaaggg 1140  
 gccgcacacc atcacatca ccattag 1167

<210> 18  
 <211> 388  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cadena ligera aa de DCD-MvDN30.2

<400> 18  
 Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15

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

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

Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro  
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 100 105 110

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

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

ES 2 674 491 T3

```

145                    150                    155                    160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
     165                                170                                175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
     180                                185                                190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
     195                                200                                205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
     210                                215                                220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ala Ser
     225                                230                                235                                240

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
     260                                265                                270

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
     275                                280                                285

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
     290                                295                                300

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
     305                                310                                315                                320

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
     325                                330                                335

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Ala Ala Trp Ser His
     340                                345                                350

Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
     355                                360                                365

Gly Ala Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ala His His
     370                                375                                380

His His His His
     385

```

<210> 19  
 <211> 8  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> DN30 CDRH1 aa

10 <400> 19

**Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp**  
**1 5**  
  
 5 <210> 20  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> DN30 CDRH1  
 10  
 <400> 20  
 ggctacacct tcaccagta ctgg 24  
  
 15 <210> 21  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 20 <223> DN30 CDRH2 aa  
  
 <400> 21  
**Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr**  
**1 5**  
 25 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 30 <220>  
 <223> DN30 CDRH2  
  
 <400> 22  
 attaatccta gcagcggctcg tact 24  
 35  
 <210> 23  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 40  
 <220>  
 <223> DN30 CDRH3 aa  
  
 <400> 23  
 45 **Ala Ser Arg Gly Tyr**  
**1 5**  
  
 50 <210> 24  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 55 <223> DN30 CDRH3  
  
 <400> 24  
 gcaagtaggg gctac 15  
 60  
 <210> 25  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> DN30 CDRL1 aa  
 5 <400> 25  
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr  
 1 5 10  
 <210> 26  
 <211> 30  
 10 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> DN30 CDRL1  
 15 <400> 26  
 caaagtgtg attatgatgg tggtagttat 30  
 <210> 27  
 20 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 25 <223> DN30 CDRL2 aa  
 <400> 27  
 Ala Ala Ser  
 1  
 30 <210> 28  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 35 <220>  
 <223> DN30 CDRL2  
 <400> 28  
 gctgcatcc 9  
 40 <210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> DN30 CDRL3 aa  
 <400> 29  
 Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr  
 50 1 5  
 <210> 30  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 55 <213> artificial  
 <220>  
 <223> DN30 CDRL3 aa  
 60 <400> 30  
 cagcaaagtt atgaagacct gctcacc 27

## REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de anticuerpo que comprende un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera y dos dominios constantes y un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada y dos dominios constantes, en donde dos dominios constantes son dominios constantes de cadena ligera y dos dominios constantes son dominios constantes de cadena pesada CH1, en donde dicho fragmento de anticuerpo tiene la semividada *in vivo* prolongada con respecto a un fragmento de Fab que comprende dichos dominios variables de cadena ligera y pesada,
- 5 en donde el primer polipéptido comprende un dominio variable de cadena ligera y dos dominios constantes de cadena ligera humana, en donde el dominio variable de cadena ligera se fusiona al primer dominio constante de cadena ligera que se fusiona al segundo dominio constante de cadena ligera en la dirección del N-terminal al C-terminal, generando así una cadena ligera quimérica VL-CL-CL, y
- 10 en donde el segundo polipéptido comprende un dominio variable de cadena pesada y dos dominios constantes de cadena pesada humana, en donde el dominio variable de cadena pesada se fusiona al primer dominio constante de cadena pesada CH1 humano que se fusiona al segundo dominio constante de cadena pesada CH1 humano en la dirección del N-terminal al C-terminal, generando así una cadena pesada quimérica VH-CH1-CH1.
- 15 2. Un fragmento de anticuerpo que comprende un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera y dos dominios constantes y un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada y dos dominios constantes, en donde dos dominios constantes son dominios constantes de cadena ligera y dos dominios constantes son dominios constantes de cadena pesada CH1, en donde dicho fragmento de anticuerpo tiene una semividada *in vivo* prolongada con respecto a un fragmento Fab que comprende dichos dominios variables de cadena ligera y pesada,
- 20 en donde el primer polipéptido comprende un dominio variable de cadena ligera, un dominio constante de cadena ligera humana y un dominio constante CH1 humano, en donde el dominio variable de cadena ligera se fusiona al dominio constante de cadena ligera humana, y el dominio constante de cadena ligera humana se fusiona al dominio constante de cadena pesada CH1 humana en la dirección desde el N-terminal al C-terminal, generando así una cadena ligera quimérica VL-CL-CH1, y
- 25 en donde el segundo polipéptido comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante de cadena pesada CH1 humana y un dominio constante de cadena ligera humana, en donde el dominio variable de cadena pesada se fusiona al dominio constante de cadena pesada CH1 humana, y el dominio constante de cadena pesada CH1 humana se fusiona al dominio constante de cadena ligera humana en la dirección desde el N-terminal al C-terminal, generando así una cadena pesada quimérica VH-CH1-CL.
- 30 3. Un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicho dominio variable de cadena ligera se selecciona entre un dominio variable de cadena ligera no humana o un dominio variable de cadena ligera humana o humanizada que comprende las regiones que determinan la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo no humano.
- 35 4. Un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho dominio variable de cadena pesada se selecciona entre un dominio variable de cadena pesada no humana o un dominio variable de cadena pesada humana o humanizada que comprende las regiones que determinan la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo no humano.
- 40 5. Un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el dominio constante de cadena ligera es un dominio constante de cadena ligera kappa humana.
6. Un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el dominio constante de cadena pesada CH1 es un dominio constante de cadena pesada CH1 gamma humana.
- 45 7. Un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el dominio constante de cadena pesada CH1 es de una IgG1 humana.
8. Un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho fragmento de anticuerpo se une específicamente al receptor del factor de crecimiento del hepatocito (HGFR)
9. Un fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 3 y 4, en donde el dominio variable de cadena ligera humanizada comprende las regiones que determinan la complementariedad (CDRs) que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO.: 25, 27 y 29, y el dominio variable de cadena pesada humanizada comprende las regiones que determinan la complementariedad (CDRs) que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO.:19, 21 y 23.
- 50 10. Una composición farmacéutica que comprende el fragmento de anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.



11. El fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de un paciente que sufre de un tumor y/o metástasis.
12. El fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho tumor y/o metástasis está asociado con la desregulación de la señalización y/o activación de HFR.
- 5 13. Un producto que contiene un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y al menos uno de un inhibidor de HGF y un inhibidor de HGFR, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores y/o metástasis, preferiblemente un tumor y/o metástasis asociado con la desregulación de la señalización y/o activación de HGFR.
- 10 14. Un producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde un inhibidor se selecciona de anticuerpos anti-HGF, moléculas recombinantes que compiten con HGF, inhibidores HGFR microcíticos, anticuerpos o inhibidores anti-HGFR.
- 15 15. Un ácido nucleico aislado que codifica el fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 15 16. Un vector que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica el fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
17. Una composición que comprende dos o más ácidos nucleicos que codifican el fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 20 18. Un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 15, un vector de acuerdo con la reivindicación 16 o una composición de acuerdo con la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento de un paciente que sufre de un tumor y/o metástasis, preferiblemente un tumor y/o metástasis asociada con la desregulación de la señalización y/o activación de HGFR.

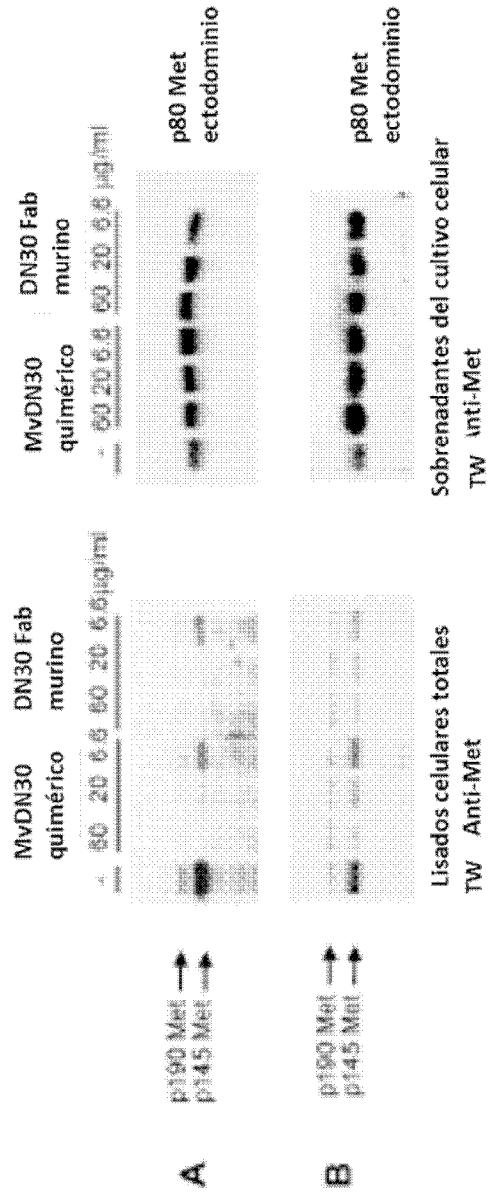


Figura 1

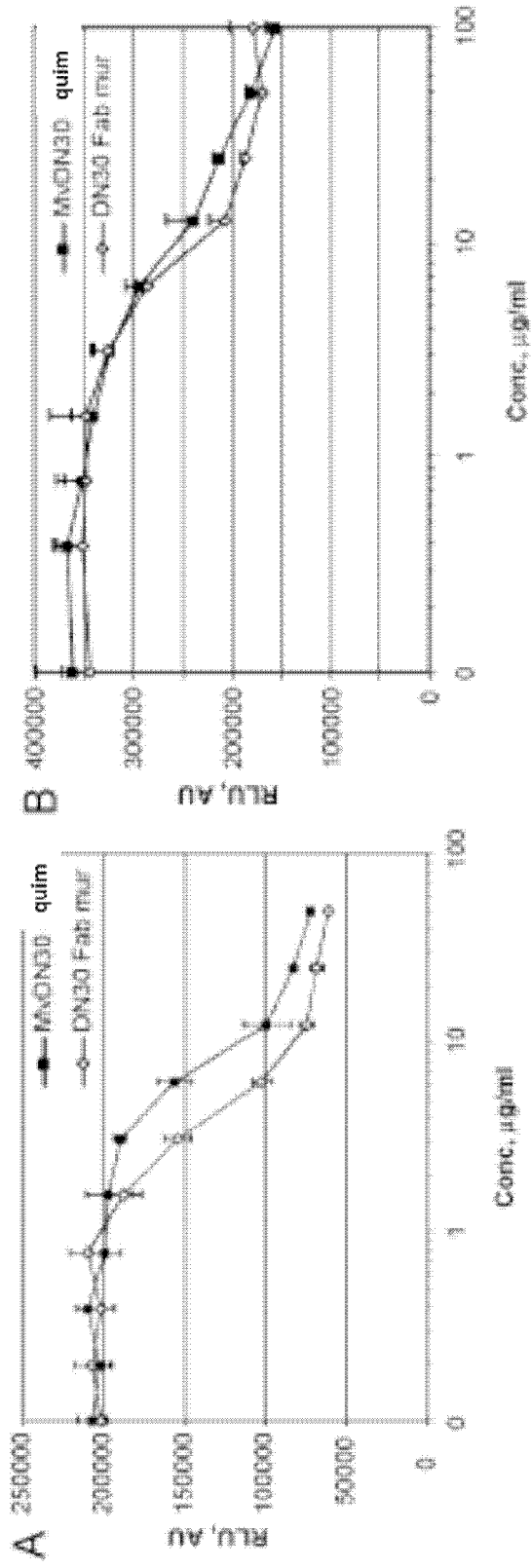


Figura 2

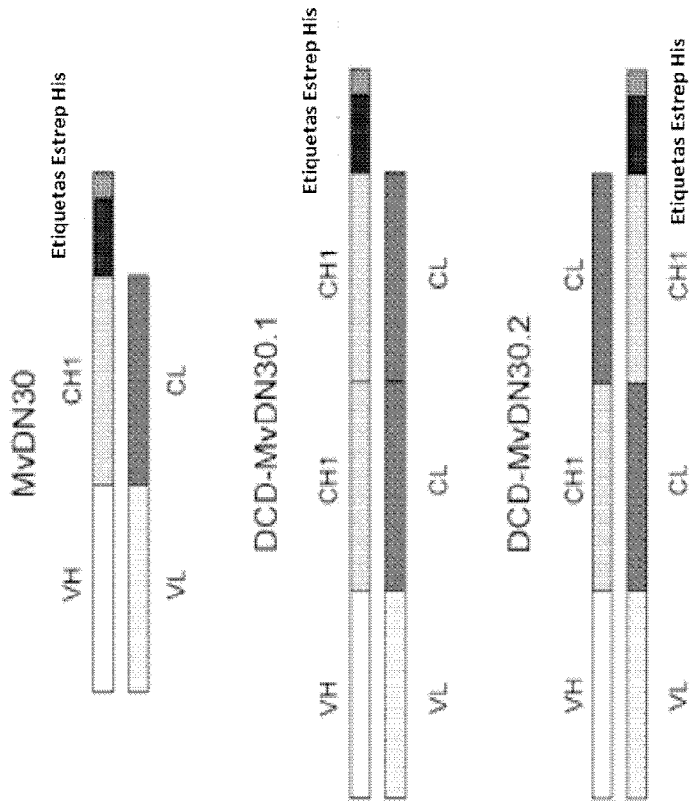


Figura 3

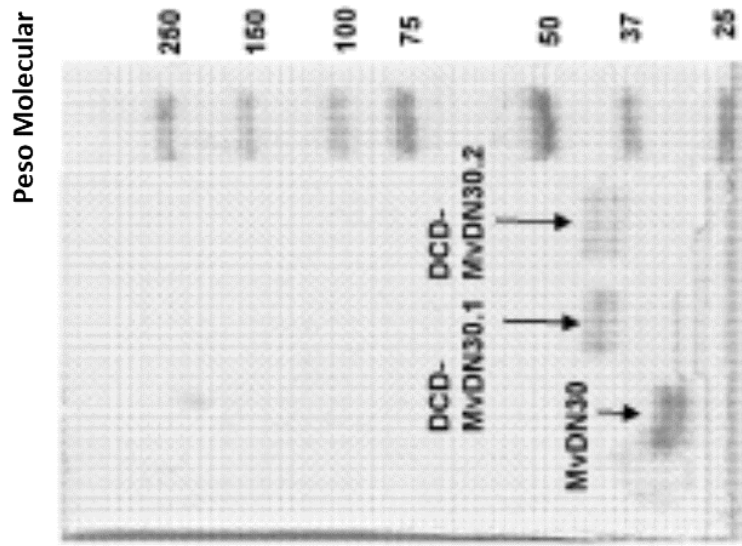


Figura 4

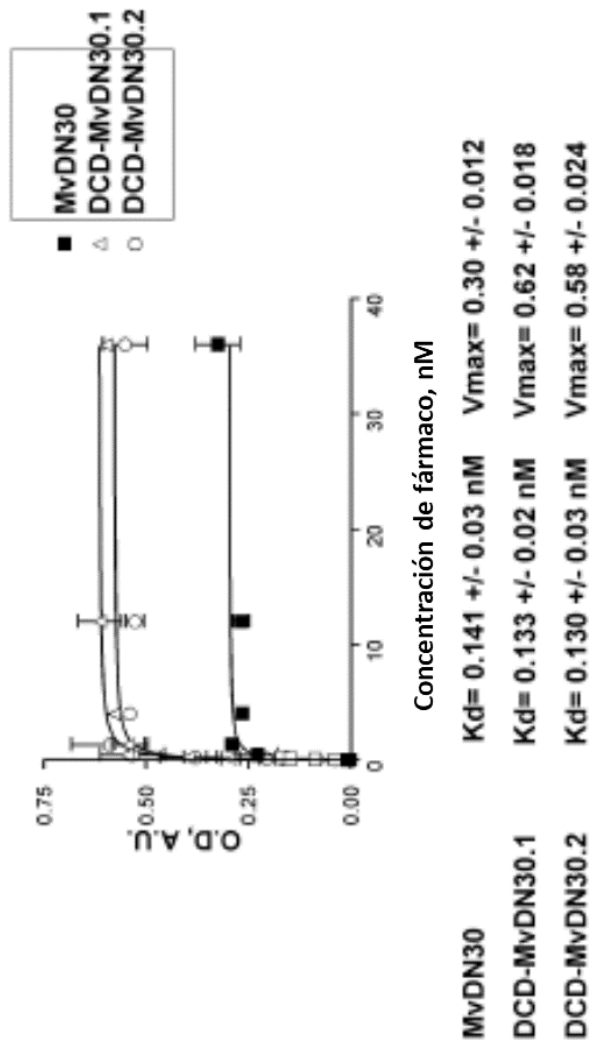


Figura 5

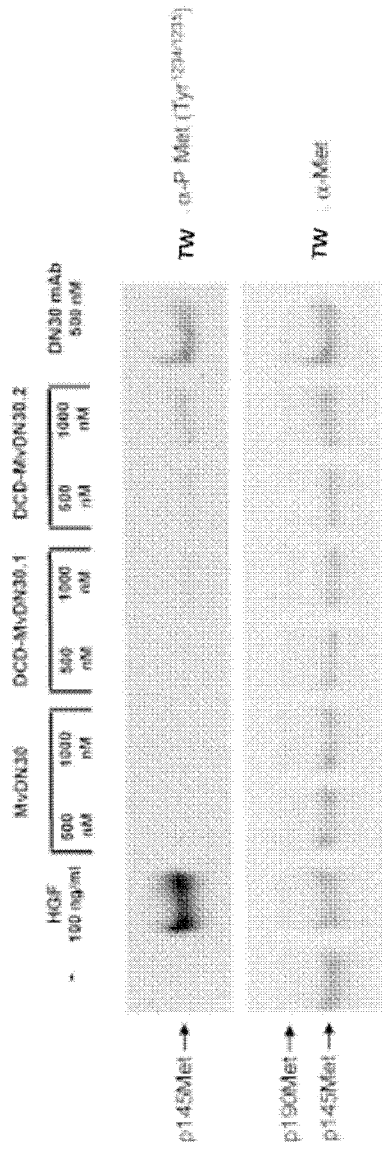


Figure 6

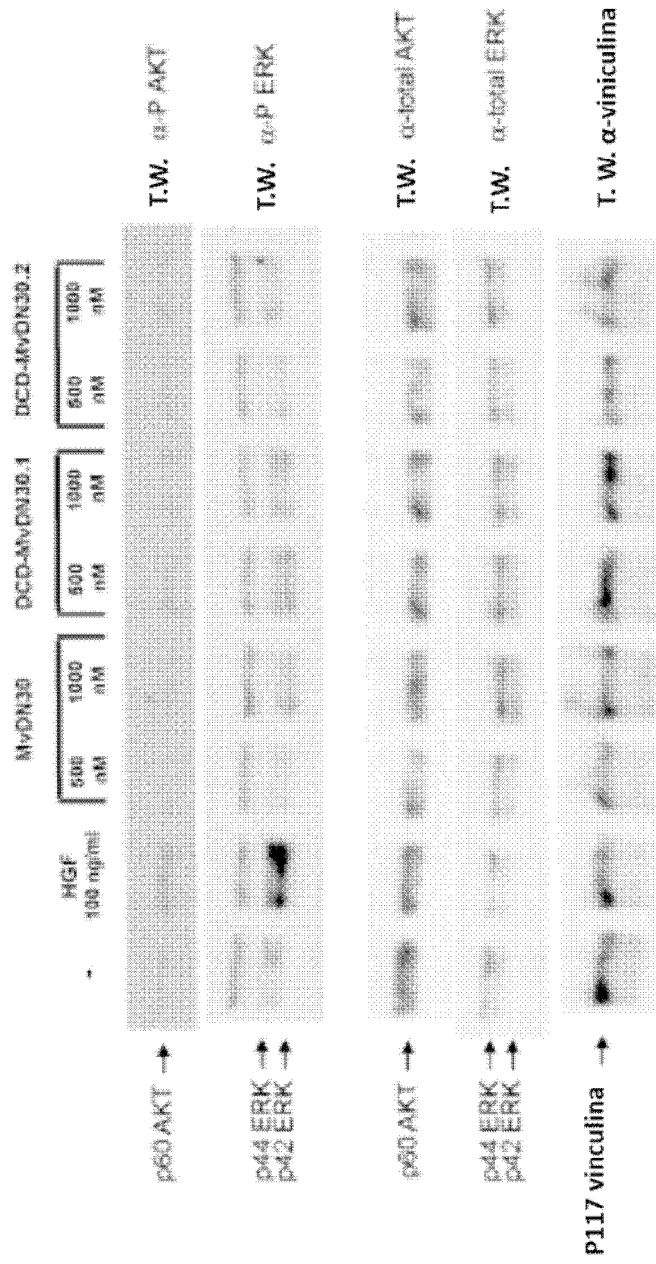


Figura 7



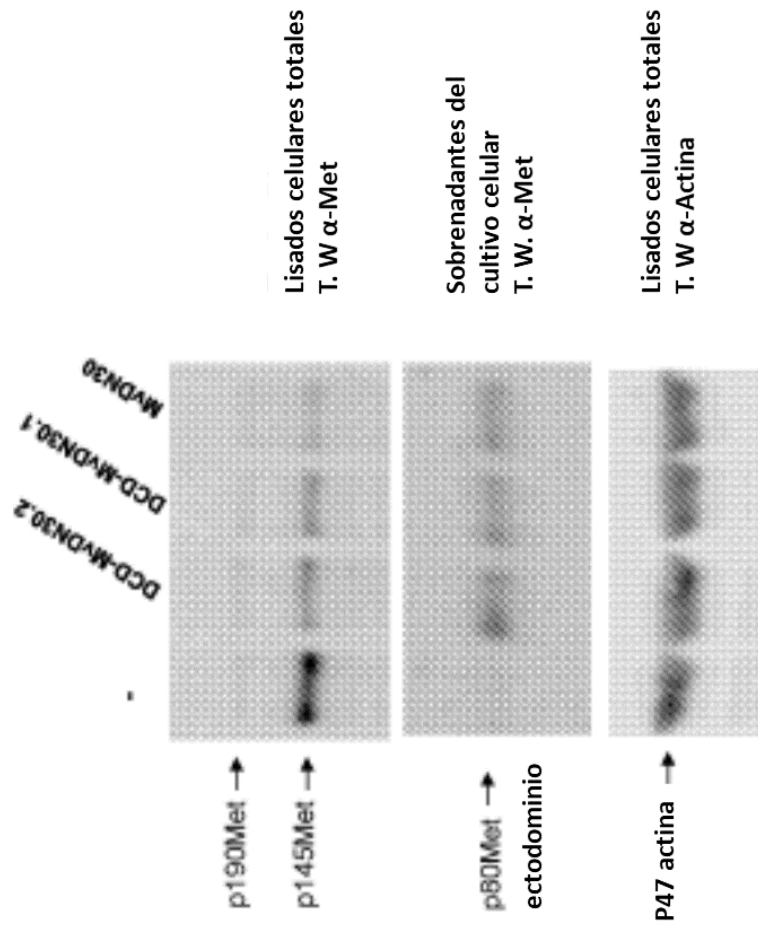


Figure 8

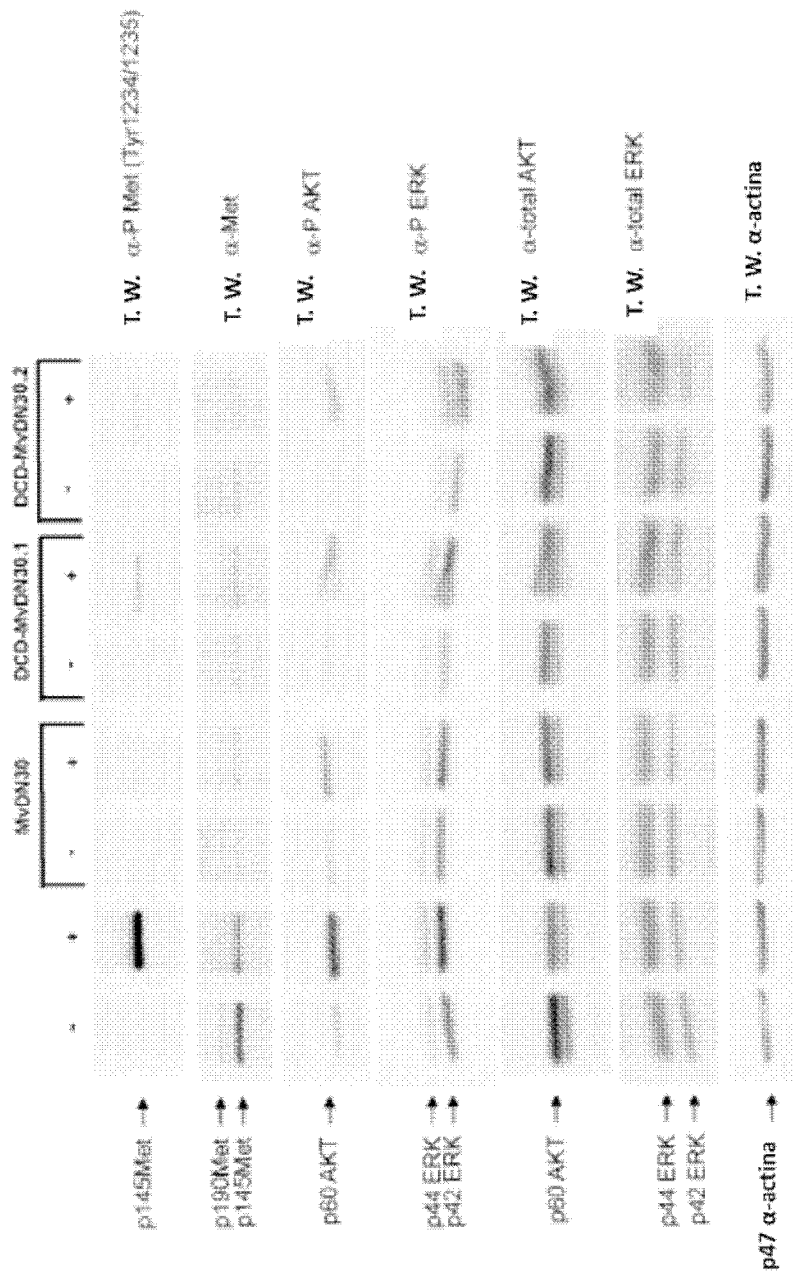


Figura 9

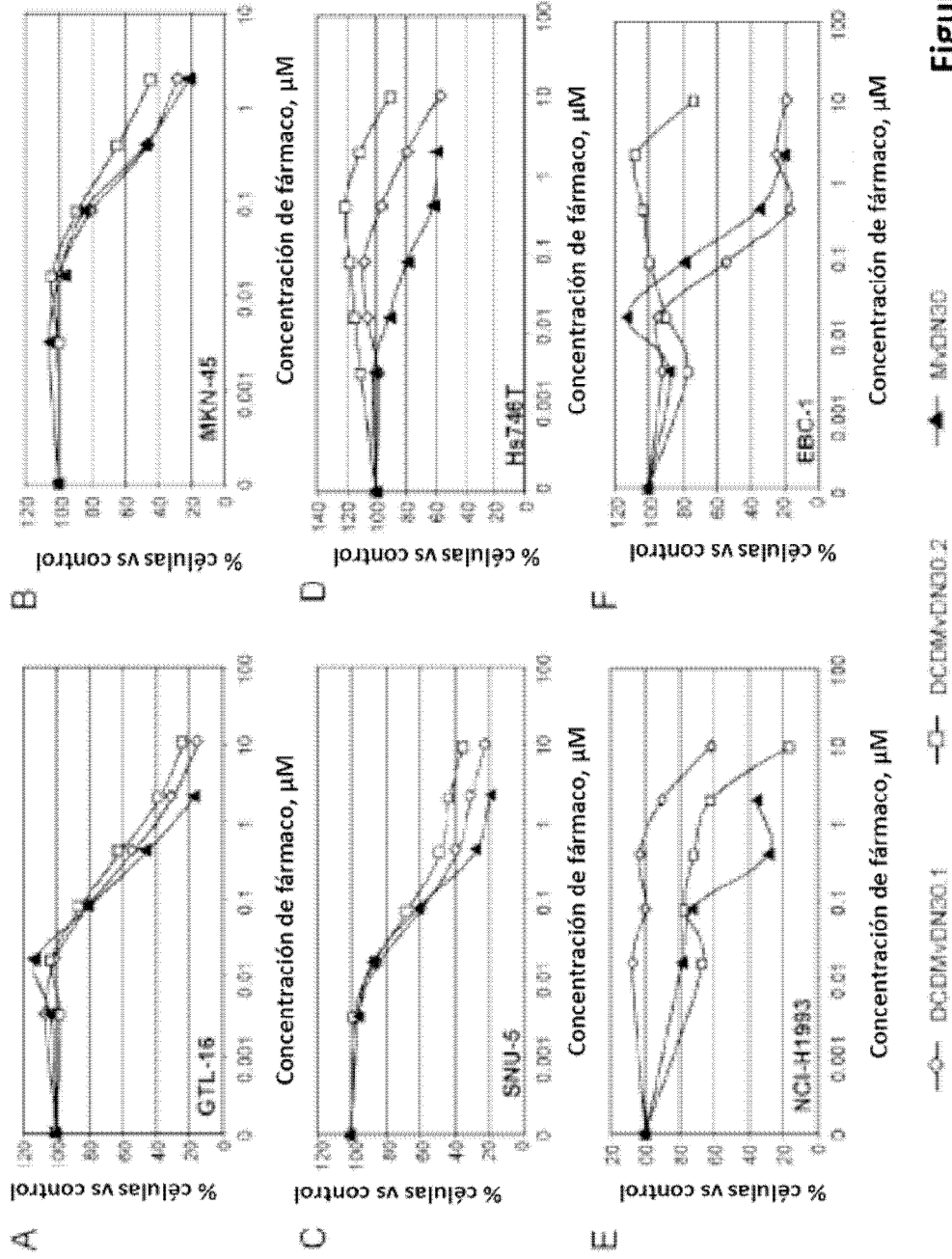


Figura 10

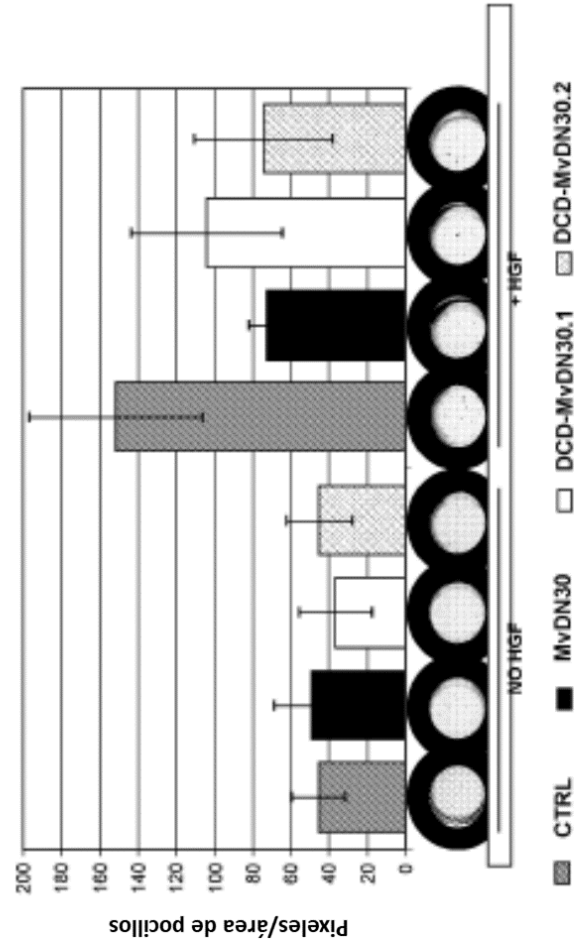


Figura 11

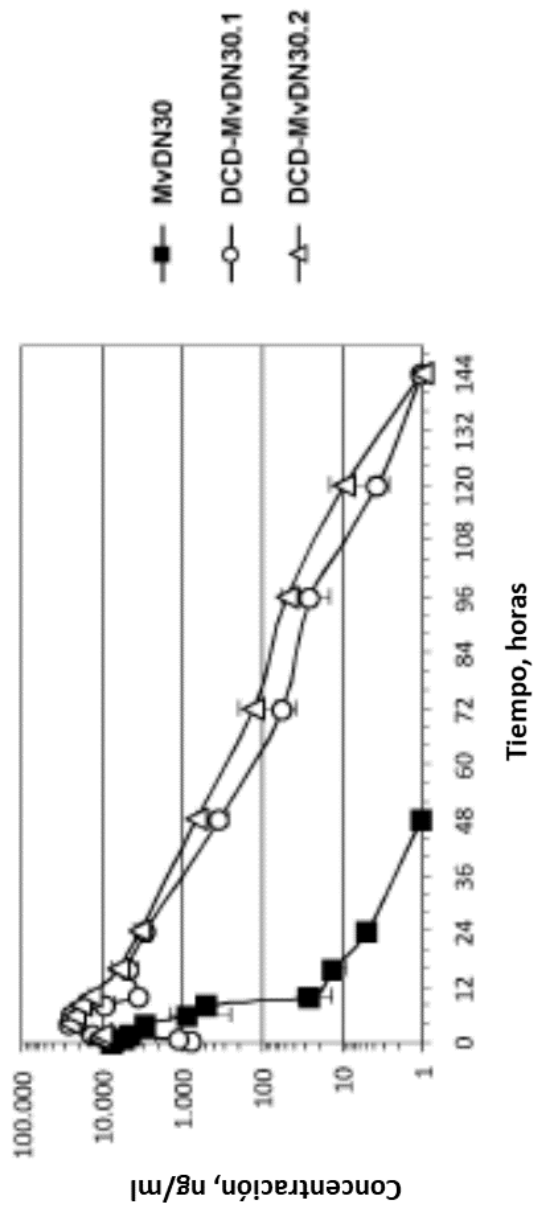


Figura 12

VL-CL-CL

A. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO.: 9)

5'-  
 atggagacagacacatcctgctatgggtgctgctgctggttccaggctccactggtgacattgctgacccaatccagctcttgg  
 ctgtctctagggcagaggccaccatcctctgcaaggccagccaaatgttgaattatgatagttggttagttatgagttcccaacaga  
 gaocaggacagccacocaaactcctcatctctgctgcatcccaacctgaatctggcatccagccaggtttagtggcagtggtctgggac  
 agactcaccccaatatacctcctggtggaggaggtgtgcaacctattactgacgcaaaatgataagaacccgctcactgctcggtg  
 ctgglaccagggtgagataacgaactggtgctgaccatctgtcttctcctccgccaatctg atgagcagttgaaatctggaactgct  
 ctgtgtgctctgataaactctatccagaggccaaglaagtggaaggatgataacgcccctcccaatcgggtaactccagg  
 agaggtcacagagcaggaagacagcaagcaccctacagccctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagagctcaaacaggagcaagcactacgagaac  
 acaaggtctacgctggaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcacaagagctcaaacagggtgagagtgactgtggctgc  
 accatctctcactctccgccaatcgtgagcagttgaaatctggaactgctgtgtgctgtaataactctatccccagaggg  
 ccaagtagtggaagggtgataacgcccctcaatoggttaactccaggagaggtgcaagcaggagcagcaaggacagcaagcagcac  
 ctacagcctcagcagccctgacgtgagcaaacgagactacgagaacacaaggtctacgctggaagtcacccatcaggccct  
 gagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagaggtgtaa-3'

B. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 10)

N term-  
 METDILLWLLWVPGSTGDMLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDVDYDGGSYMWFQQRPG  
 QPPKLLISAASNLESGIPARFSGSGTDFTLNIHPVEEEDVATYCYQQSYEDPLTFGAGTKVEIKR  
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC- C term

Figura 13

## VH-CH1-CH1-TAGs

## A. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO.: 1)

5'-  
 atgggatggactataatcactctttttgttagcaaacagclacagatggcccactccacagggtcccaactgcaaacagcctggggactgaaactggt  
 gaaagcctggggcttcagtgaaagcgtccgcaagcctctggctacaccctaccagttactgatatacacttgggtgaagcagaggccttggga  
 caaggccttagtggattgagagatttaattccctcagcagcagctctactaactaacaacgaaatcaagaacaaggctcacagtgactgta  
 gacaatctccaccacagcctacatgcaactcagcaaacctgacatctgaggaactcgcggtcttactgtgcaagtaggggctacttgggg  
 ccaggaccactcaccagtctcctcagctagcagaaagggccatcggtctcctccctggcaccctctccaaagagcaccctctggggg  
 cacagcggccctgggctcctggtaaggactactcctccggaacccggtagcgggtgcgggaaactcagggcctccgaccagcggcgctgc  
 acactcctccgggtctctacagtcctcaggaactactcctcagcagctgggtagccgtggaacggcctcagcagctctgggcaaccagactac  
 atctgcaacgtgaaticaaagcccagcaacaaccaaggtgacaagaaagtgagccaaatcttgcaagcagaaagggcccactcg  
 gtcttccctggaacccctcctcaagaccctctggggcacagcggccctggcgtctgcaaggactactcctccgaaccgggtga  
 cgggtctgtggaactcagggccctgaccagcggcgtgcacacctccggctgctacagctcctcaggaactcctcactcctcagcagcgtg  
 gtgacgtgcccctcagcagctggcacccagacctacatctgcaacgtgaaatcaacaagcccagcaaccaccaagggtgacaagaaa  
 gtgagcccacatcttgacaacacacacaGGTGCCGCATGGAGCCACCCCCAGTTTCGAAAAAGGGGCC  
 GCATGGAGCCACCCCAAGTTTCGAAAAAGGGGCCGCATGGAGCCACCCCCAGTTTCGAAAAAGG  
 GGCCGCACACCATCACCATATTAG-3'

## B. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 2)

N term-  
 MGWSYIILFLVATATDGHSQVLQQPGTELKPGASVKLSCKASGYFTFSYWIHWWKQRPQGGLLE  
 WIGEINPSSGRITNYNEKFNKVTVTVDKSSTTAYMQLSNLTSEDSAVVYCASRGYVWGQGTTLTVSS  
 ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLI  
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLV  
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLISSLVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
 KKVEPKSCDKTHTGAAWSHHPQFEKGAAWSHHPQFEKGAAWSHHPQFEKGAHHHHHHH-C term

Figura 14

### VL-CL-CH1-TAGs

#### A. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO.: 17)

5'-  
 atggagacagacacaatcctgctatgggtgctgctgctgctgtccaggctccactggtgacattgtcctgaccccaatctccagctctttggct  
 ggtctctaggggcagagggccaccatctcctgcaaggccagccaagtgttattatgctgctgtgctgatttalaigagttggtccaacagaga  
 ccaggacagccaccacaacctctcctctgctgctcctcctgcaaaccttgaaatctgcatccccagccaggtttatggtcagttgggacaga  
 cttcacccctcaatatccatcctgaggaggaggatgtgcaaccttacctgcaaaagttaaaagaccgccctcaccgttcgggtgctgggt  
 accaagtgagatcaaacgaactgctgcaacctctcctcctcctcctccagctgacagcagttgaaatctggaacigccctctgtgtg  
 gtcctgtgaataacttctatcccagagggccaaagtacagtgaaagggtgataacgccctcaatcgggtaactccaggagagtgic  
 acagagcaggaacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagaciacgagaacaacaagtct  
 acgctgcaagtcaacctcagggcctgagctgcccgtcacaagaagcttcaacagggggagtgigcaagcagaaagggcccatc  
 ggtctccccctggcacccctcctcaagagacccctctggtgggcacagcggcctggctgctctcctacagctcaggaactactcctcagcagct  
 acgggtgctggaactcagggcccctgaccagcggctgcaaccctccctggctctcctacagctcaggaactactcctcagcagctcagcagct  
 ggtgaccgtgcccctcagcagcttgggaccccagaccctacatctgcaactgaatcaagaaccagcaccacaaccaagggtgacaagaaa  
 gttgagcccagaatctgtgacaaaactcacacaGGTGCCCGCATGGAGCCACCCCCAGTTCGAA AAAAGGGGCC  
 GCATGGAGCCACCCCCAGTTCGAA AAAAGGGGCCCGCATGGAGCCACCCCCAGTTCGAA AAAAGG  
 GGCCGCACACCATCACCATCACCCATTAG-3'

#### B. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 18)

N term-  
 METDTILLWLLLWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGGSYMSWFQQRPGQ  
 PPKLLISAASNLESGIPARFSGSGTDFLNIHPVEEEDVATYYCQQSYEDPLTFGAGTKVEIKRTV  
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTSL  
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECASAKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPVTYSWNSGALTSGVHITFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
 DKKVEPKSCDKTHTGAAAWSHPQFEKGAAAWSHPQFEKGAAAWSHPQFEKGAAHHHHHH-H- C term

Figura 15



VH-CH1-CL

**A. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO.: 15)**

5'-  
atggatgagctatatactctttttgtgcaaacgctacagatggccactcccaggctccaaactgcaacagcctggactgaactgg  
tgaagcctggcttcagtagagctgtccctgcaaggctctgctacaccctcaaccagttactggatacactgggtgaagcagaggcctgg  
acaaggccttgatggattggagagattactcttagcagcggctgctactcaacacagagaaaattcaagaaacaggctcagtgactg  
tagacaaatcttccaccacagcctacatgcaacctcagcaacctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaagtgggctactg  
gggccaaggcaccactcaccagctcctcagctagcaagcagggcccatcgctctcccctggcaacctctccaaggagcacctctg  
ggggcaccagcggcctggcctgctgaaggactactctcccggaaccggtagcgggtctgtgaaactcaggcctctgaccagcg  
gctgtcaccctccggctgtccctcagctcctcagactctactcctcagcagcgggtgacogtgcctccagcagcttgggcaacca  
gacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccagggtgacaaagaagtgaaccaaatctgtactgtgctgcaacca  
tctgtctctctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgtgctgctgataaactctatccagagaggccaa  
agtacagtggaaggtagataacgcccctccaatcgggtaactccagagagtgacagagcagcagcaaggaacagcacctaca  
gcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcaagtccaccatcagggctgagc  
tcgcccgtcacaaaagagcttcaacaggggagagtgttaa-3'

**B. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 16)**

N term-  
MGWSYIILFLVATATDGHSSQVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYMIHWVKQRPGQGLE  
WIGEI~~NPSSGR~~INYN~~E~~KFKNKVTVDKSS~~TT~~AYMQLSNLTSEDSAVYYC~~ASR~~GYWGQGTLLTVS  
SASTKGPSV~~F~~PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
LSSWTV~~P~~SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK~~KK~~VEPKSCTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~V~~CL  
LN~~N~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
GLSSPVTKSFNRGEC- C term

Figura 16

VL

**A. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO.: 11)**

5'-

gacattgctgaccacaatccagcttcttggctgtgtctctagggcagagggccaaccatctcctcagagcccaaaatggttqatt  
CDRL1  
atgatgttgtagtataatgattgtccaacagagaccagagaccacccaactcctcatctctcgtcatccaaccccttgaatctgg  
CDRL2  
catccagccaggttagtgagtgctctgggacagactcaacctcaatcatcctcctgtggaggaggatgtgcaaccttata  
CDRL3  
ctgtcagcaagttatgaaagaccctcacgttggtctgtaccagggtggagatcaaacga-3'

**B. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 12)**

N term-

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGGSYMSWFQQRPGPPKLLISAAASNLESIGIPAR  
CDRL1  
CDRL2  
CDRL3  
 FSGSGGTDFTLNHPVEEEDVATYYCQQSYEDPLTFGAGTKVEIKR- C term

**Figura 17**

VH

**A. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO.: 3)**

5'-

ggttccaactgcaacagcctgggactgaactggtagaacctggggcttcagtagaacgtctctgcaaggcttcggctacacccitcaccagttac  
*CDRH1*  
 tggatacactgggtagaacagagcctggacaaggcctgtagtgatggagagattaatccttagcagcggctctactaactacaacgaga  
 aattcaagacaaggtcacagtagactgtagacaatctccaccacagcctacatgcaactcagcaaacctgacatctgaggactctgcggtct  
*CDRH2*  
 attactgtcaagttagggctactggggccaaggcaccactctcacagtctctca-3'  
*CDRH3*

**B. Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO.: 4)**

N term-

QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYW<sup>*CDRH1*</sup>YIHWVKQRPGQGLEWIGE<sup>*CDRH2*</sup>INPSSGRTNYNEKFKN  
 KVTVTVDKSSITAYMQLSNLTSEDSAVYYCASR<sup>*CDRH3*</sup>YWGQGTTLVSS-C term

**Figura 18**