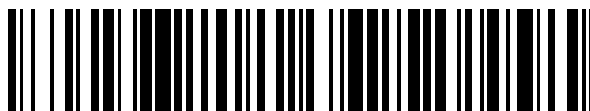


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 832 704**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2015 PCT/US2015/041989**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16014942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2015 E 15750184 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2020 EP 3172236**

54 Título: **Moléculas de unión a HER2 y CD3 biespecíficas**

30 Prioridad:

25.07.2014 US 201462029342 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2021

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER
CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**CHEUNG, NAI-KONG V.;
LOPEZ-ALBAITERO, ANDRES y
XU, HONG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 832 704 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión a HER2 y CD3 biespecíficas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/029.342, presentada el 25 de julio de 2014.

5 **1. Campo**

Se proporcionan en el presente documento composiciones, métodos y usos que implican moléculas de unión biespecíficas que se unen específicamente a HER2, una tirosina cinasa receptora, y a CD3, un receptor de células T, y median en la citotoxicidad de células T para controlar y tratar trastornos, tales como cáncer.

2. Antecedentes

10 HER2 es una tirosina cinasa receptora de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico. Se ha demostrado la amplificación o sobreexpresión de HER2 en el desarrollo y la progresión de cánceres. Herceptin® (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 aprobado para tratar el cáncer de mama metastásico positivo para HER2 y el cáncer gástrico positivo para HER2 (Trastuzumab [Highlights of Prescribing Information]. South San Francisco, CA: Genentech, Inc.; 2014). El ertumaxomab es un anticuerpo HER2-CD3 biespecífico con unión al receptor de Fc intacto (véase, por ejemplo, Kiewe *et al.* 2006, Clin Cancer Res, 12(10): 3085-3091). El ertumaxomab es un anticuerpo de rata-ratón; por tanto, tras la administración a seres humanos, se espera una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón y una respuesta de anticuerpos humanos anti-rata. 2502A, el anticuerpo parental de ertumaxomab, tiene baja afinidad por HER2 y baja avidéz (Diermeier-Daucher *et al.*, MAbs, 2012, 4(5): 614-622). Moore *et al.* construyeron un constructo biespecífico de HER2 x CD3, basado en trastuzumab y un Fv humanizado de huOKT3 unido al extremo C-terminal de la cadena pesada (Moore *et al.*, MAbs (2011), 3(6):546-557). Existe la necesidad de terapias capaces de mediar en la citotoxicidad de células T en cánceres positivos para HER2.

3. SUMARIO

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. En resumen, en un primer aspecto, la invención proporciona una molécula de unión biespecífica que comprende un anticuerpo monoclonal que es una inmunoglobulina que se une a HER2, comprendiendo dicha inmunoglobulina dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión de cadena ligera, y en la que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión de cadena ligera, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos, y (ii) se unen a CD3, y en la que los polipéptidos de fusión de cadena ligera primero y segundo son idénticos; en la que las cadenas pesadas se mutan para destruir un sitio de glicosilación; en la que las cadenas pesadas comprenden un dominio V_H presente en cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 62 o 63; en la que las cadenas ligeras comprenden un dominio V_L presente en SEQ ID NO: 25; en la que los scFv primero y segundo comprenden un dominio V_H que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15, 17 y 64, y un dominio V_L que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16 y 65; y en la que el primer scFv se fusiona al extremo carboxilo de la primera cadena ligera, y en la que el segundo scFv se fusiona al extremo carboxilo de la segunda cadena ligera.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para un polipéptido de fusión de cadena ligera que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina fusionada a un scFv, a través de un ligador peptídico, en el que el scFv se fusiona al extremo C-terminal de la cadena ligera; en el que la cadena ligera se une a HER2 y comprende un dominio V_L presente en SEQ ID NO: 25; y en el que el scFv se une a CD3 y comprende un dominio V_H que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15, 17 y 64, y un dominio V_L que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16 y 65; y;

45 en el que opcionalmente:

(a) la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena ligera es SEQ ID NO: 24;

(b) la secuencia del scFv es SEQ ID NO: 52;

50 (c) la secuencia del scFv es SEQ ID NO: 19, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para el scFv es SEQ ID NO: 18;

(d) la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25, y la secuencia del scFv es SEQ ID NO: 52;

(e) la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25, y la secuencia del scFv es SEQ ID NO: 19, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena ligera es SEQ ID NO: 24, y la secuencia de nucleótidos que codifica para el scFv es SEQ ID NO: 18;

(f) el ligador peptídico tiene 5-30, 5-25, 5-15, 10-30, 10-20, 10-15, 15-30 o 15-25 aminoácidos de longitud, en el que opcionalmente la secuencia del ligador peptídico es SEQ ID NO: 14, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para el ligador peptídico es SEQ ID NO: 13; o

5 (g) la secuencia del polipéptido de fusión de cadena ligera es SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 29, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de fusión de cadena ligera de SEQ ID NO: 29 es SEQ ID NO: 28.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende:

(i) un primer polinucleótido según el segundo aspecto de la invención operativamente unido a un primer promotor, y

10 (ii) un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada de inmunoglobulina que se une a HER2 operativamente unido a un segundo promotor.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una mezcla de polinucleótidos que comprende

(i) un primer polinucleótido según el segundo aspecto de la invención operativamente unido a un primer promotor, y

15 (ii) un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada de inmunoglobulina que se une a HER2 operativamente unido a un segundo promotor.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula *ex vivo* que comprende el vector de la invención o la mezcla de polinucleótidos de la invención.

20 En aún otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una molécula de unión biespecífica, que comprende

(i) cultivar la célula *ex vivo* de la invención para expresar los polinucleótidos primero y segundo de tal manera que se produzca una molécula de unión biespecífica que comprende dicho polipéptido de fusión de cadena ligera y dicha cadena pesada de inmunoglobulina, y

(ii) recuperar la molécula de unión biespecífica.

25 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de:

(a) la molécula de unión biespecífica de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable;

(b) el vector de la invención; o

(c) la mezcla de polinucleótidos de la invención.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica según la invención para su uso en un método de tratamiento de un cáncer positivo para HER2 en un sujeto que lo necesita.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método *ex vivo* para producir una célula T terapéutica, que comprende unir la molécula de unión biespecífica de la invención a una célula T, en la que la célula T es opcionalmente una célula T humana y en la que la unión es no covalente.

35 En las reivindicaciones adjuntas se describen otras realizaciones preferidas.

4. Breve descripción de los dibujos

La figura 1A, la figura 1B, la figura 1C, la figura 1D y la figura 1E describen HER2-AcBs. La figura 1A muestra un esquema del HER2-AcBs. La flecha apunta a la mutación N297A introducida en la cadena pesada para eliminar la glicosilación. La figura 1B representa la pureza de HER2-AcBs tal como se demuestra en condiciones reductoras de SDS-PAGE. La figura 1C representa la pureza de HER2-AcBs tal como se demuestra mediante SEC-HPLC. La figura 40 1D demuestra que la mutación N297A en la IgG1-Fc humana inhibe la unión al receptor de Fc CD16A. La figura 1E demuestra que la mutación N297A en la IgG1-Fc humana inhibe la unión al receptor de Fc CD32A.

La figura 2A y la figura 2B demuestran que HER2-AcBs se une a una línea celular de cáncer de mama y a células T. La figura 2A representa la tinción de células de cáncer de mama AU565 con trastuzumab (izquierda) o con HER2-AcBs (derecha). La figura 2B representa la tinción de células T CD3+ con huOKT3 (izquierda) o con HER2-AcBs (derecha). 45

La figura 3 demuestra que HER2-AcBs muestra una potente actividad de linfocitos T citotóxicos en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. Para obtener una descripción de trastuzumab-mOKT3, véase, Thakur *et al.*, 2010, Curr

Opin Mol Ther, 12: 340.

La figura 4 compara la expresión de HER2 frente a la citotoxicidad de células T de HER2-AcBs en un panel de líneas celulares cancerosas.

5 La figura 5A y la figura 5B demuestran que la citotoxicidad de células T redirigidas a HER2-AcBs es específica de antígeno. La figura 5A demuestra que HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T frente a la línea celular positiva para HER2, UM SCC 47, pero no en la línea celular negativa para HER2 HTB-132. La figura 5B demuestra que huOKT3 y trastuzumab pueden bloquear la capacidad de HER2-AcBs para mediar en la citotoxicidad de células T.

10 La figura 6 demuestra que HER2-AcBs detecta bajos niveles de HER2 comparando la citotoxicidad de células T mediada por HER2-AcBs con el umbral de detección de HER2 mediante citometría de flujo.

15 La figura 7A, la figura 7B y la figura 7C proporcionan la especificidad, afinidad y acción antiproliferativa de HER2-AcBs. La figura 7A demuestra que la preincubación de la línea celular de carcinoma de ovario SKOV3 positiva para HER2 bloquea la unión de HER2-AcBs. La figura 7B demuestra que las células SKOV3 marcadas con diluciones de trastuzumab o con HER2-AcBs muestran curvas similares cuando se representa gráficamente la intensidad de fluorescencia media (IFM) frente a la concentración de anticuerpos. La figura 7C demuestra la acción antiproliferativa de HER2-AcBs en comparación con trastuzumab en la línea celular de cáncer de mama sensible a trastuzumab SKBR3.

20 La figura 8 demuestra que HER2-AcBs es eficaz frente a líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC). Se analizó un panel de células de CCECC para determinar la citotoxicidad mediada por HER2-AcBs y la CE50 y se compararon con el nivel de expresión de HER2 en cada línea celular tal como se determinó mediante citometría de flujo y mediante qRT-PCR.

25 La figura 9A, la figura 9B y la figura 9C. HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T frente a CCECC resistente a otras terapias dirigidas a HER. La figura 9A demuestra que la línea celular de CCECC PCI-30 expresa EGFR y HER2. La figura 9B demuestra que las células PCI-30 son resistentes a las terapias dirigidas a HER lapatinib, erlotinib, neratinib, trastuzumab y cetuximab. La figura 9C demuestra que las células PCI-30 son sensibles a células T en presencia de HER2-AcBs. Los datos representan el promedio de tres ensayos de citotoxicidad diferentes.

30 La figura 10 demuestra que HER2-AcBs es eficaz frente a líneas celulares de osteosarcoma. Se analizó un panel de líneas celulares de osteosarcoma para determinar la citotoxicidad mediada por HER2-AcBs y la CE50 y se compararon con el nivel de expresión de HER2 en cada línea celular tal como se determina mediante citometría de flujo y mediante qRT-PCR.

35 La figura 11A, la figura 11B y la figura 11C demuestran que HER2-AcBs es eficaz frente a líneas celulares de osteosarcoma resistentes a otras terapias dirigidas. La figura 11A demuestra que la línea celular de osteosarcoma U2OS expresa EGFR y HER2. La figura 11B demuestra que las células USOS son resistentes a las terapias dirigidas a HER lapatinib, erlotinib, neratinib, trastuzumab y cetuximab. La figura 11C demuestra que las células USOS son sensibles a células T en presencia de HER2-AcBs. Los datos representan el promedio de tres ensayos de citotoxicidad diferentes.

40 La figura 12A, la figura 12B, la figura 12C y la figura 12D demuestran que HER2-AcBs es eficaz frente a la línea celular de carcinoma de cuello uterino HeLa resistente a otras terapias dirigidas. La figura 12A demuestra que las células HeLa expresan EGFR y HER2. La figura 12B demuestra que las células HeLa son resistentes a las terapias dirigidas a HER lapatinib, erlotinib, neratinib, trastuzumab y cetuximab. La figura 12C demuestra que las células HeLa son sensibles a células T en presencia de HER2-AcBs. Los datos representan el promedio de tres ensayos de citotoxicidad diferentes. La figura 12D demuestra que el pretratamiento con lapatinib mejora la sensibilidad de HeLa a HER2-AcBs.

La figura 13 demuestra que HER2-AcBs reduce el crecimiento tumoral *in vivo*. La figura 13 demuestra que HER2-AcBs protege frente a la progresión tumoral en células de cáncer de mama MCF7 implantadas mezcladas con PBMC.

45 La figura 14 demuestra que HER2-AcBs protege frente a la progresión tumoral en el cáncer de mama HCC1954 implantado mezclado con células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) *in vivo*.

La figura 15 demuestra que HER2-AcBs protege frente a un modelo metastásico de progresión tumoral inducida mediante la introducción intravenosa de células MCF7 marcadas con etiqueta de luciferasa *in vivo*.

50 La figura 16A, la figura 16B, la figura 16C y la figura 16D demuestran que HER2-AcBs bloquea el crecimiento tumoral metastásico de células MCF7 marcadas con etiqueta de luciferasa *in vivo*. La figura 16A representa ratones sin tratamiento. La figura 16B representa ratones tratados con PBMC y HER2-C825. La figura 16C representa ratones tratados con HER2-AcBs. La figura 16D representa ratones tratados con PBMC y HER2-AcBs.

La figura 17A, la figura 17B y la figura 17C describen HER2-AcBs. La figura 17A representa un esquema del HER2-AcBs. La flecha apunta a la mutación N297A introducida en la cadena pesada para eliminar la glicosilación. La figura

17B representa la pureza de HER2-AcBs tal como se demuestra en condiciones reductoras de SDS-PAGE. La figura 17C representa la pureza de HER2-AcBs tal como se demuestra mediante cromatografía de exclusión molecular - cromatografía de líquidos de alta resolución (SEC-HPLC).

5 La figura 18A, la figura 18B y la figura 18C demuestran que HER2-AcBs tiene la misma especificidad, afinidad y efectos antiproliferativos similares a los de trastuzumab.

La figura 19A y la figura 19B demuestran que la citotoxicidad de células T redirigidas a HER2-AcBs es específica de HER2 y depende de CD3.

La figura 20 representa la expresión de HER2 y la concentración eficaz mitad de la máxima (CE50) en presencia de ATC y HER2-AcBs en 35 líneas celulares diferentes de sistemas tumorales diferentes.

10 La figura 21A, la figura 21B, la figura 21C, la figura 21D, la figura 21E, la figura 21F, la figura 21G, la figura 21H y la figura 21I demuestran que HER2-AcBs media en respuestas citotóxicas frente a líneas celulares de carcinoma resistentes a otras terapias dirigidas a HER.

La figura 22 demuestra que la CE50 de HER2-AcBs se correlaciona con el nivel de expresión de HER2 determinado mediante citometría de flujo. pM = picomolar; IFM = intensidad de fluorescencia media.

15 La figura 23A, la figura 23B y la figura 23C demuestran que HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T frente a dianas HCC1954 positivas para PD-L1 de una manera que es relativamente insensible al bloqueo de PD-1 por pembrolizumab, incluso con expresión de PD-1 en células T efectoras.

La figura 24A y la figura 24B demuestra que HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T frente a dianas HEK-293 positivas para PD-L1 de una manera que es relativamente insensible a la expresión de PD-1 en células T efectoras. La citotoxicidad es un promedio de 6 experimentos.

20 La figura 25A, la figura 25B, la figura 25C y la figura 25D demuestran que HER2-AcBs es eficaz frente a xenoinjertos positivos para HER2.

5. Descripción detallada

25 La divulgación técnica detallada que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención *per se*, y también puede proporcionar antecedentes técnicos para desarrollos técnicos relacionados. Se apreciará que los antecedentes técnicos adicionales proporcionados no pretenden definir la invención como tal (que está definida exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas), sino más bien ponerla en un contexto técnico más amplio. Por consiguiente, se apreciará que el término "realizaciones" refleja un detalle específico de la divulgación, pero en la medida en que se refiere a una parte de los antecedentes técnicos adicionales, no se pretende definir como parte de la invención aspectos que no se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30 Se proporcionan en el presente documento moléculas de unión biespecíficas que se unen tanto a HER2 como a CD3. También se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos (polinucleótidos) aislados, tales como ADN complementario (ADNc), que codifican para tales moléculas de unión biespecíficas o fragmentos de las mismas. Se proporcionan además vectores (por ejemplo, vectores de expresión) y células (por ejemplo, células *ex vivo*) que comprenden ácidos nucleicos (polinucleótidos) o vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que codifican para tales moléculas de unión biespecíficas o fragmentos de las mismas. También se proporcionan en el presente documento métodos de preparación de tales moléculas de unión biespecíficas, células y vectores. También se proporcionan en el presente documento células T unidas a moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento métodos de unión de tales moléculas de unión biespecíficas a células T. Se proporcionan en el presente documento métodos y usos para tratar cánceres positivos para HER2 usando las moléculas de unión biespecíficas, ácidos nucleicos, vectores y/o células T descritos en el presente documento. Además, también se proporcionan en el presente documento composiciones relacionadas (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), kits y métodos de diagnóstico.

45 Se proporcionan en el presente documento moléculas de unión biespecíficas que se unen específicamente a HER2 y CD3, e invocan la citotoxicidad de células T para tratar el cáncer. Sin querer vincularse a ninguna teoría, se cree que las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento no sólo unen los tumores a células T, sino que también reticulan CD3 en las células T e inician la cascada de activación y, de esta manera, la citotoxicidad basada en el receptor de células T (TCR) se redirige a las dianas tumorales deseadas, sorteando las restricciones del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

50 5.1 MOLÉCULAS DE UNIÓN BIESPECÍFICAS

Se proporcionan en el presente documento moléculas de unión biespecíficas que se unen a HER2 y CD3. Una molécula de unión, que puede usarse dentro de los métodos proporcionados en el presente documento, es una molécula de unión biespecífica que comprende un anticuerpo monoclonal aglicosilado que es una inmunoglobulina que se une a HER2, que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas

cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión, y en la que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos y (ii) se unen a CD3, y en la que los polipéptidos de fusión primero y segundo son idénticos.

HER2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de tirosina cinasas receptoras. HER2 puede ser HER2 humano. El número de registro de GenBank™ NM_004448.3 (SEQ ID NO: 1) proporciona una secuencia de ácido nucleico de HER2 humano a modo de ejemplo. El número de registro de GenBank™ NP_004439.2 (SEQ ID NO: 2) proporciona una secuencia de aminoácidos de HER2 humano a modo de ejemplo. HER2 puede ser HER2 de cánido. El número de registro de GenBank™ NM_001003217.1 (SEQ ID NO: 3) proporciona una secuencia de ácido nucleico de HER2 de cánido a modo de ejemplo. El número de registro de GenBank™ NP_001003217.1 (SEQ ID NO: 4) proporciona una secuencia de aminoácidos de HER2 de cánido a modo de ejemplo.

CD3 es un correceptor de células T compuesto por una cadena gamma, una cadena delta y dos cadenas épsilon. El CD3 puede ser un CD3 humano. El número de registro de GenBank™ NM_000073.2 (SEQ ID NO: 5) proporciona una secuencia de ácido nucleico de CD3 gamma humano a modo de ejemplo. El número de registro de GenBank™ NP_000064.1 (SEQ ID NO: 6) proporciona una secuencia de aminoácidos de CD3 gamma humano a modo de ejemplo. El número de registro de GenBank™ NM_000732.4 (SEQ ID NO: 7) proporciona una secuencia de ácido nucleico de CD3 delta humano a modo de ejemplo. El número de registro de GenBank™ NP_000723.1 (SEQ ID NO: 8) proporciona una secuencia de aminoácidos de CD3 delta humano a modo de ejemplo. El número de registro de GenBank™ NM_000733.3 (SEQ ID NO: 9) proporciona una secuencia de ácido nucleico de CD3 épsilon humano a modo de ejemplo. El número de registro de GenBank™ NP_000724.1 (SEQ ID NO: 10) proporciona una secuencia de aminoácidos de CD3 épsilon humano a modo de ejemplo. El CD3 puede ser un CD3 de cánido. El número de registro de GenBank™ NM_001003379.1 (SEQ ID NO: 11) proporciona una secuencia de ácido nucleico de CD3 épsilon de cánido a modo de ejemplo. El número de registro de GenBank™ NP_001003379.1 (SEQ ID NO: 12) proporciona una secuencia de aminoácidos de CD3 épsilon de cánido a modo de ejemplo.

La inmunoglobulina en las moléculas de unión biespecíficas de la invención puede ser, como ejemplos no limitativos, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo desnudo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" se usa según su significado bien conocido en la técnica y comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Los métodos para producir anticuerpos se describen en la sección 0.

Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante que contiene los dominios variables, incluidas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo derivan de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden derivar de los de otras especies tales como, por ejemplo, caballo, mono, vaca, cerdo, gato o perro.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo producido mediante tecnología de ADN recombinante, en el que parte o la totalidad de los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana que no son necesarios para la unión del antígeno (por ejemplo, las regiones constantes y las regiones de marco de los dominios variables) se usan para sustituir los aminoácidos correspondientes de la cadena ligera o pesada del anticuerpo no humano relacionado. A modo de ejemplo, una versión humanizada de un anticuerpo murino contra un antígeno dado tiene en sus cadenas ligera y pesada (1) regiones constantes de un anticuerpo humano; (2) regiones de marco de los dominios variables de un anticuerpo humano; y (3) CDR del anticuerpo murino. Cuando sea necesario, uno o más residuos en las regiones de marco humanas pueden cambiarse a residuos en las posiciones correspondientes en el anticuerpo murino para preservar la afinidad de unión del anticuerpo humanizado al antígeno. Este cambio a veces se denomina "retromutación". De manera similar, pueden realizarse mutaciones directas para revertir de vuelta a la secuencia murina por un motivo deseado, por ejemplo, estabilidad o afinidad por el antígeno. Sin querer vincularse a ninguna teoría, los anticuerpos humanizados tienen generalmente menos probabilidad de provocar una respuesta inmunitaria en seres humanos en comparación con los anticuerpos humanos quiméricos porque los primeros contienen considerablemente menos componentes no humanos.

El término "epítipo" es reconocido en la técnica y los expertos en la técnica generalmente entienden que se refiere a la región de un antígeno que interacciona con un anticuerpo. Un epítipo de un antígeno proteico puede ser lineal o conformacional, o puede estar formado por secuencias de aminoácidos contiguas o no contiguas del antígeno.

Un scFv es un término reconocido en la técnica. Un scFv comprende una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de una inmunoglobulina, en el que la proteína de fusión conserva la misma especificidad antigénica que la inmunoglobulina completa. El V_H se fusiona al V_L a través de un ligador peptídico (tal ligador peptídico se denomina a veces en el presente documento "ligador peptídico intra-scFv").

En determinadas realizaciones de la invención, el scFv tiene un ligador peptídico que tiene entre 5-30, 5-25, 5-15, 10-30, 10-20, 10-15, 15-30 o 15-25 residuos de aminoácido de longitud. El ligador peptídico de scFv puede presentar una

o más características adecuadas para un ligador peptídico conocido por un experto en la técnica. El ligador peptídico de scFv puede comprender aminoácidos que permitan la solubilidad del ligador peptídico de scFv tales como, por ejemplo, serina y treonina. El ligador peptídico de scFv puede comprender aminoácidos que permitan la flexibilidad del ligador peptídico de scFv tales como, por ejemplo, glicina. El ligador peptídico de scFv puede conectar el extremo N-terminal del V_H al extremo C-terminal del V_L. El ligador peptídico de scFv puede conectar el extremo C-terminal del V_H al extremo N-terminal del V_L. El ligador peptídico de scFv puede ser un ligador tal como se describe en la tabla 1, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 o 35-41). En una realización preferida, el ligador peptídico es SEQ ID NO: 14.

En determinadas moléculas de unión biespecíficas de la divulgación, el scFv que se une a CD3 comprende el V_H y el V_L de un anticuerpo específico de CD3 conocido en la técnica tal como, por ejemplo, huOKT3 (véase, por ejemplo, Adair *et al.*, 1994, Hum Antibodies Hybridomas 5: 41-47), YTH12.5 (véase, por ejemplo Routledge *et al.*, 1991, Eur J Immunol, 21: 2717-2725), HUM291 (véase, por ejemplo, Norman *et al.*, 2000, Clinical Transplantation, 70(12): 1707-1712), teplizumab (véase, por ejemplo, Herold *et al.*, 2009, Clin Immunol, 132: 166-173), huCLB-T3/4 (véase, por ejemplo, Labrijn *et al.*, 2013, Proceedings of The National Academy of Sciences, 110(13): 5145-5150), otlizumab (véase, por ejemplo, Keymeulen *et al.*, 2010, Diabetologia, 53: 614-623), blinatumomab (véase, por ejemplo, Cheadle, 2006, Curr Opin Mol Ther, 8(1): 62-68), MT110 (véase, por ejemplo, Silke y Gires, 2011, MAbs, 3(1): 31-37), catumaxomab (véase, por ejemplo, Heiss y Murawa, 2010, Int J Cancer, 127(9): 2209-2221), 28F11 (véase, por ejemplo, la solicitud de patente canadiense CA 2569509 A1), 27H5 (véase, por ejemplo, la solicitud de patente canadiense CA 2569509 A1), 23F10 (véase, por ejemplo, la solicitud de patente canadiense CA 2569509 A1), 15C3 (véase, por ejemplo, la solicitud de patente canadiense CA 2569509 A1), visilizumab (véase, por ejemplo, Dean *et al.*, 2012, Swiss Med Wkly, 142: w13711) y Hum291 (véase, por ejemplo, Dean *et al.*, 2012, Swiss Med Wkly, 142: w13711).

El scFv en una molécula de unión biespecífica puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo específico de CD3 conocido en la técnica. El scFv en una molécula de unión biespecífica puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo específico de CD3, huOKT3. La unión al mismo epítipo puede determinarse mediante ensayos conocidos por un experto en la técnica tales como, por ejemplo, análisis mutacionales o estudios cristalográficos. El scFv puede competir por la unión a CD3 con un anticuerpo conocido en la técnica. El scFv en una molécula de unión biespecífica puede competir por la unión a CD3 con el anticuerpo específico de CD3, huOKT3. La competencia por la unión a CD3 puede determinarse mediante ensayos conocidos por un experto en la técnica tales como, por ejemplo, citometría de flujo. Véase, por ejemplo, la sección 0. El scFv puede comprender un V_H con una similitud de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o al menos el 99 % con el V_H de un anticuerpo específico de CD3 conocido en la técnica. El scFv puede comprender el V_H de un anticuerpo específico de CD3 conocido en la técnica, que comprende entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos conservativas. El scFv puede comprender un V_L con una similitud de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o al menos el 99 % con el V_L de un anticuerpo específico de CD3 conocido en la técnica. El scFv puede comprender el V_L de un anticuerpo específico de CD3 conocido en la técnica, que comprende entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos conservativas.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas son sustituciones de aminoácidos que se producen dentro de una familia de aminoácidos, en la que los aminoácidos están relacionados en sus cadenas laterales. Generalmente, los aminoácidos codificados genéticamente se dividen en familias: (1) ácidos, que comprenden aspartato y glutamato; (2) básico, que comprende arginina, lisina e histidina; (3) apolares, que comprenden isoleucina, alanina, valina, prolina, metionina, leucina, fenilalanina, triptófano; y (4) polares sin carga, que comprenden cisteína, treonina, glutamina, glicina, asparagina, serina y tirosina. Además, una familia hidroxilada alifática comprende serina y treonina. Además, una familia que contiene amida comprende asparagina y glutamina. Además, una familia alifática comprende alanina, valina, leucina e isoleucina. Además, una familia aromática comprende fenilalanina, triptófano y tirosina. Finalmente, una familia de cadena lateral que contiene azufre comprende cisteína y metionina. Como ejemplo, un experto en la técnica esperaría razonablemente un reemplazo aislado de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente no tenga un efecto importante sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido dentro de un sitio de marco. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservativas preferidos incluyen: lisina-arginina, alanina-valina, fenilalanina-tirosina, ácido glutámico-ácido aspártico, valina-leucina-isoleucina, cisteína-metionina y asparagina-glutamina.

El scFv puede derivar del anticuerpo huOKT3 y, por tanto, contiene el V_H y V_L del anticuerpo monoclonal huOKT3 (SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente). Véase, por ejemplo, Van Wauwe *et al.*, 1991, Nature, 349: 293-299. El scFv puede derivar del anticuerpo monoclonal huOKT3 y no tiene más de 5 mutaciones de aminoácidos en relación con las secuencias nativas de V_H y V_L de huOKT3. El scFv puede derivar del anticuerpo monoclonal huOKT3 y comprender una o más mutaciones, en relación con las secuencias nativas de V_H y V_L de huOKT3, para estabilizar los enlaces disulfuro. La estabilización de los enlaces disulfuro puede impedir la agregación de la molécula de unión biespecífica. La estabilización de los enlaces disulfuro puede reducir la agregación de la molécula de unión biespecífica en comparación con la agregación de la molécula de unión biespecífica sin la estabilización de los enlaces disulfuro. La una o más mutaciones para estabilizar los enlaces disulfuro pueden comprender una mutación G44C de V_H y una mutación Q100C de V_L (por ejemplo, como está presente en las SEQ ID NO: 54-59). La una o más mutaciones para estabilizar los enlaces disulfuro puede ser el reemplazo del residuo de aminoácido en V_H44 (según el sistema de numeración de Kabat) por una cisteína y el reemplazo del residuo de aminoácido en V_L100 (según el sistema de

numeración de Kabat) por una cisteína para introducir un enlace disulfuro entre V_H44 y V_L100 (por ejemplo, como está presente en las SEQ ID NO: 54-59). El scFv puede comprender el V_H de huOKT3 que comprende la sustitución de aminoácidos en la posición numerada 105, en la que la cisteína se sustituye por una serina (SEQ ID NO: 17). La secuencia del V_H del scFv puede ser tal como se describe en la tabla 4, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 17 o 64). La secuencia del V_L del scFv puede ser tal como se describe en la tabla 5, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 16 o 65). La secuencia del scFv puede ser tal como se describe en la tabla 6, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 19 o 48-59). La secuencia del scFv puede ser SEQ ID NO: 19. El scFv puede comprender una variante del V_H de huOKT3 que no tiene más de 5 mutaciones de aminoácidos en relación con la secuencia nativa de V_H de huOKT3. El scFv puede comprender una variante del V_L de huOKT3 que no tiene más de 5 mutaciones de aminoácidos en relación con la secuencia nativa de V_L de huOKT3.

Las secuencias de las regiones variables de un scFv anti-CD3 pueden modificarse mediante inserciones, sustituciones y deleciones en la medida en que el scFv resultante mantenga la capacidad de unirse a CD3 tal como se determina, por ejemplo, mediante ELISA, citometría de flujo y BiaCore™. El experto habitual en la técnica puede determinar el mantenimiento de esta actividad realizando los ensayos funcionales que se describen a continuación en el presente documento tales como, por ejemplo, análisis de unión y análisis de citotoxicidad.

El ligador peptídico que conjuga la cadena ligera de inmunoglobulina y el scFv puede tener una longitud de entre 5-30, 5-25, 5-15, 10-30, 10-20, 10-15, 15-30 o 15-25 aminoácidos. El ligador peptídico puede presentar una o más características adecuadas para un ligador peptídico conocido por un experto en la técnica. El ligador peptídico puede comprender aminoácidos que permitan la solubilidad del ligador peptídico tales como, por ejemplo, serina y treonina. El ligador peptídico puede comprender aminoácidos que permitan la flexibilidad del ligador peptídico tales como, por ejemplo, glicina. La secuencia del ligador peptídico que conjuga la cadena ligera de inmunoglobulina y el scFv puede ser tal como se describe en la tabla 1, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 o 35-41). En realizaciones preferidas, el ligador peptídico es SEQ ID NO: 14.

En las moléculas de unión biespecíficas, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender la cadena pesada y/o la cadena ligera de un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica tal como, por ejemplo, trastuzumab (véase, por ejemplo, Baselga *et al.* 1998, Cancer Res 58(13): 2825-2831), M-111 (véase, por ejemplo, Higgins *et al.*, 2011, J Clin Oncol, 29 (Supl.): Abstract TPS119), pertuzumab (véase, por ejemplo, Franklin *et al.*, 2004, Cancer Cell, 5: 317-328), ertumaxomab (véase, por ejemplo, Kiewe y Thiel, 2008, Expert Opin Investig Drugs, 17(10): 1553-1558), MDXH210 (véase, por ejemplo, Schwaab *et al.*, 2001, Journal of Immunotherapy, 24(1): 79-87), 2B1 (véase, por ejemplo, Borghaei *et al.*, 2007, J Immunother, 30: 455-467) y MM-302 (véase, por ejemplo, Wickham y Futch, 2012, Cancer Research, 72(24): Suplemento 3). En las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender la cadena pesada de trastuzumab. En las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 23. En las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender una variante de la cadena pesada de trastuzumab (véase, por ejemplo, la tabla 2, a continuación). En las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender una variante de la cadena ligera de trastuzumab que no tiene más de 5 mutaciones de aminoácidos en relación con la secuencia nativa de trastuzumab. Las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2, puede comprender la cadena ligera de trastuzumab (SEQ ID NO: 25). En las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender una variante de la cadena ligera de trastuzumab. En las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender una variante de la cadena ligera de trastuzumab. En las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender una variante de la cadena ligera de trastuzumab que no tiene más de 5 mutaciones de aminoácidos en relación con la secuencia nativa de trastuzumab.

En las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica. La inmunoglobulina en una molécula de unión biespecífica puede unirse al mismo epítipo que trastuzumab. La unión al mismo epítipo puede determinarse mediante ensayos conocidos por un experto en la técnica tales como, por ejemplo, análisis mutacionales o estudios cristalográficos. La inmunoglobulina que se une a HER2 puede competir por la unión a HER2 con un anticuerpo conocido en la técnica. La inmunoglobulina en una molécula de unión biespecífica puede competir por la unión a HER2 con trastuzumab. La competencia por la unión a HER2 puede determinarse mediante ensayos conocidos por un experto en la técnica tales como, por ejemplo, citometría de flujo. Véase, por ejemplo, la sección 0. La inmunoglobulina puede comprender un V_H con una similitud de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o al menos el 99 % con el V_H de un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica. La inmunoglobulina puede comprender el V_H de un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica, que comprende entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos conservativas. La inmunoglobulina puede comprender un V_L con una similitud de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o al menos el 99 % con el V_L de un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica. La inmunoglobulina puede comprender el V_L de un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica, que comprende entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos conservativas. La inmunoglobulina puede comprender un V_H de una cadena pesada descrita en la tabla 2, a continuación (por ejemplo, el V_H de una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 62 o 63). La inmunoglobulina puede comprender un V_L de una cadena ligera descrita en la tabla 3, a continuación (por ejemplo, el V_L de SEQ ID NO: 25).

Las secuencias de las regiones variables de un anticuerpo anti-HER2 pueden modificarse mediante inserciones, sustituciones y deleciones en la medida en que el anticuerpo resultante mantenga la capacidad de unirse a HER2 tal como se determina, por ejemplo, mediante ELISA, citometría de flujo y BiaCore™. El experto habitual en la técnica puede determinar el mantenimiento de esta actividad realizando los ensayos funcionales que se describen a continuación en el presente documento tales como, por ejemplo, análisis de unión y análisis de citotoxicidad.

En algunas de las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, la inmunoglobulina que se une a HER2 es una inmunoglobulina IgG1.

Los expertos en la técnica conocen métodos de producción de anticuerpos humanos tales como, por ejemplo, los métodos de presentación en fago descritos anteriormente que usan bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse además, las patentes estadounidenses n.ºs 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/60433, WO 98/24893, WO 98/16664, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerder *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Riss, (1985); y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1): 86-95, (1991)).

Los anticuerpos humanos pueden producirse usando ratones transgénicos, que son incapaces de expresar inmunoglobulinas de ratón endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humanos. Por ejemplo, los complejos génicos de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena ligera y pesada humanos. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente a la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían luego para producir descendencia homocigótica que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una parte de un polipéptido proporcionado en el presente documento. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humanos que albergan los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de las células B y, posteriormente, experimentan cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para obtener una descripción general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n.º 0 598 877; las patentes estadounidenses n.ºs 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.886.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San Jose, Calif.) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ) pueden participar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden producirse inmunizando ratones trasplantados con leucocitos de sangre periférica humana, esplenocitos o médula ósea (por ejemplo, técnicas de trioma de XTL). Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. Véase, por ejemplo, Jaspers *et al.*, Bio/technology 12:899-903 (1988). Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante células B activadas *in vitro*. Véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.567.610 y 5.229.275.

Los expertos en la técnica conocen métodos de preparación de anticuerpos humanizados. Véanse, por ejemplo, documento EP 0 239 400 de Winter; Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988); Queen *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029 (1989); patente estadounidense n.º 6.180.370; y Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833 (1989). Generalmente, el trasplante de CDR murinas (u otras no humanas) en un anticuerpo humano se logra tal como sigue. Los ADNc que codifican para los dominios variables de cadena pesada y ligera se aíslan de un hibridoma. Las secuencias de ADN de los dominios variables, incluidas las CDR, se determinan mediante secuenciación. Los ADN, que codifican para las CDR, se insertan en las regiones correspondientes de secuencias codificantes de dominio variable de cadena ligera o pesada de un anticuerpo humano, se unen a segmentos de genes de la región constante humana de un isotipo deseado (por ejemplo, gamma-1 para CH y K para CL), se sintetizan genéticamente. Los genes de las cadenas ligera y pesada humanizada se coexpresan en células huésped de mamíferos (por ejemplo, células CHO o NSO) para producir anticuerpos humanizados solubles. Para facilitar la producción de anticuerpos a gran escala, a menudo es deseable seleccionar un agente de alta expresión usando un gen DHFR o gen GS en la línea productora. Estas líneas de células productoras se cultivan en biorreactores, o sistema de cultivo de fibra hueca, o tecnología WAVE, para producir cultivos a granel de anticuerpos solubles o para producir mamíferos transgénicos (por

ejemplo, cabras, vacas u ovejas) que expresan el anticuerpo en la leche (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.827.690).

Pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, tal como se conoce en la técnica y/o tal como se describe en el presente documento. Los anticuerpos también pueden producirse en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de terminación en el sentido de 5' del sitio de terminación natural. Por ejemplo, una combinación de genes que codifica para una parte de cadena pesada F(ab')₂ puede diseñarse para incluir secuencias de ADN que codifican para el dominio CH, y/o la región bisagra de la cadena pesada. Las diversas partes de anticuerpos pueden unirse entre sí químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. Pueden introducirse elementos de un locus de cadena ligera y pesada humana en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen disrupciones dirigidas de los loci de cadena pesada y cadena ligera endógenos. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos y los ratones pueden usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen en Green *et al.*, Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg *et al.*, Nature 368:856 (1994), y Taylor *et al.*, Int. Immun. 6:579 (1994). También puede construirse un anticuerpo completamente humano mediante métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación en fago, todos los cuales se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, los genes de dominio variable de anticuerpo se clonan en el marco o bien en un gen de la proteína de la cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica para el anticuerpo que muestra esas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fago puede realizarse en una variedad de formatos, para su revisión, véase por ejemplo Johnson y Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:556-571 (1993).

La humanización del anticuerpo también puede realizarse, por ejemplo, sintetizando una biblioteca combinatoria que comprende las seis CDR de un anticuerpo monoclonal diana no humano fusionado en marco a un conjunto de regiones de marco humanas individuales. Puede usarse una biblioteca de regiones de marco humanas que contiene genes representativos de todos los genes de línea germinal humana de cadena ligera y pesada conocidos. Luego, las bibliotecas combinatorias resultantes pueden examinarse para determinar la unión a antígenos de interés. Este enfoque puede permitir la selección de las combinaciones más favorables de regiones de marco completamente humanas en términos de mantener la actividad de unión al anticuerpo parental. Luego, los anticuerpos humanizados pueden optimizarse adicionalmente mediante una variedad de técnicas.

La humanización de anticuerpos puede usarse para desarrollar anticuerpos de ratón u otros anticuerpos no humanos en anticuerpos "completamente humanos". El anticuerpo resultante contiene sólo una secuencia humana y ninguna secuencia de anticuerpo de ratón o no humano, mientras que mantiene una afinidad y especificidad de unión similares a las del anticuerpo de partida.

Para moléculas de anticuerpos de longitud completa, los genes de inmunoglobulina pueden obtenerse a partir de ADN genómico o ARNm de líneas celulares de hibridoma. Las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos se clonan en un sistema de vector de mamífero. El ensamblaje se documenta con análisis de secuencia de doble hebra. El constructo de anticuerpo puede expresarse en otras líneas de células huésped humanas o de mamífero. Entonces, el constructo puede validarse mediante ensayos de transfección transitoria y análisis de inmunotransferencia de tipo Western del anticuerpo de interés expresado. Las líneas celulares estables con la mayor productividad pueden aislarse y examinarse usando métodos de ensayo rápidos.

En un enfoque, se produce un hibridoma fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero sin limitarse a, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SSI, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIIWA, NEURO 2A), o similar, o heteromilomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o célula de fusión derivada de los mismos, o cualquier otra línea celular adecuada tal como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, el sitio web de ATCC o LifeTech, y similares, con células productoras de anticuerpos tales como, pero sin limitarse a, bazo aislado o clonado, sangre periférica, linfa, amígdala u otras células inmunitarias o que contengan células B, o cualquier otra célula que exprese secuencias de CDR o de marco constantes o variables de cadena pesada o ligera, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de algas, procariota, anfibio, aviar, insecto, reptil, pez, mamífero, roedor, equino, ovino, caprino, ovino, primate, eucariota, ADN genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, ARNhn, ARNm, ARNt, de hebra sencilla, doble o triple, hibridado, y similares o cualquier combinación de los mismos. Véanse, por ejemplo, Ausubel, citado anteriormente, y Colligan, Immunology, citado anteriormente, capítulo 2. Las células fusionadas (hibridomas) o las células recombinantes pueden aislarse usando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y clonarse mediante dilución limitante o clasificación celular, u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden seleccionarse

mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

La molécula de unión biespecífica puede comprender una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con relación a una región Fc silvestre, de tal manera que dicha molécula no se une o tiene una unión reducida a un receptor de Fc (FcR), en forma soluble o forma unida a células (incluso en células efectoras inmunitarias tales como, por ejemplo, células NK, monocitos y neutrófilos). Estos FcR incluyen, pero no se limitan a, FcRI (CD64), FcRII (CD32) y FcRIII (CD16). La afinidad por FcR(n), el receptor de Fc neonatal, no se ve afectada y, por tanto, se mantiene en la molécula de unión biespecífica. Por ejemplo, si la inmunoglobulina es una IgG, preferiblemente, la IgG tiene una afinidad reducida o nula por un receptor gamma de Fc. Una o más posiciones dentro de la región Fc que entra en contacto directo con el receptor gamma de Fc tal como, por ejemplo, los aminoácidos 234-239 (región bisagra), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297- 299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 327-332 (bucle F/G), se mutan de tal manera que la molécula de unión biespecífica tiene una afinidad disminuida o nula por un receptor gamma de Fc. Véase, por ejemplo, Sonderrmann *et al.*, 2000, *Nature*, 406: 267-273. Preferiblemente, para una IgG, se realiza la mutación N297A para destruir la unión al receptor de Fc. La afinidad de la molécula de unión biespecífica o el fragmento de la misma por un receptor gamma de Fc puede determinarse mediante, por ejemplo, el ensayo BiaCore™ tal como se describe, por ejemplo, en Okazaki *et al.*, 2004. *J Mol Biol*, 336(5): 1239-49. Véase también, la sección 0. La molécula de unión biespecífica que comprende tal región Fc variante puede unirse a un receptor de Fc en una célula efectora inmunitaria portadora de FcR con menos del 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o el 5 % de unión en comparación a una región Fc de referencia. Sin querer vincularse a ninguna teoría en particular, una molécula de unión biespecífica que comprende tal región Fc variante tendrá una capacidad disminuida para inducir una tormenta de citocinas. La molécula de unión biespecífica puede comprender tal región Fc variante y puede no unirse a un receptor de Fc en forma soluble o como una forma unida a células.

La molécula de unión biespecífica puede comprender una región Fc variante tal como, por ejemplo, una región Fc con adiciones, delecciones y/o sustituciones con respecto a uno o más aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento para alterar la función efectora, o potenciar o disminuir la afinidad del anticuerpo por FcR. La afinidad del anticuerpo por FcR puede verse disminuida. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en determinados casos tales como, por ejemplo, en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica bloqueo o antagonismo pero no la muerte de las células portadoras de un antígeno diana. Las variantes de Fc proporcionadas en el presente documento pueden combinarse con otras modificaciones de Fc incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora. Tales modificaciones pueden proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o novedosas en anticuerpos o fusiones de Fc. Preferiblemente, las variantes de Fc proporcionadas en el presente documento potencian el fenotipo de la modificación con la que se combinan.

La molécula de unión biespecífica puede estar aglicosilada. Esto puede lograrse mutando la porción de inmunoglobulina anti-HER2 de la molécula de unión biespecífica en su receptor de Fc para destruir un sitio de glicosilación, preferiblemente un sitio de glicosilación de unión a N. Alternativamente, una inmunoglobulina puede mutar para destruir un sitio de glicosilación ligado a N. La molécula de unión biespecífica puede haberse mutado para destruir un sitio de glicosilación de unión a N. La cadena pesada de la molécula de unión biespecífica puede tener una sustitución de aminoácidos para reemplazar una asparagina que es un sitio de glicosilación de unión a N, por un aminoácido que no funciona como sitio de glicosilación. El método puede englobar la delección del sitio de glicosilación de la región Fc de una molécula de unión biespecífica, modificando la posición 297 de asparagina a alanina (N297A). Por ejemplo, la molécula de unión biespecífica puede comprender una cadena pesada con la secuencia de SEQ ID NO: 20. Tal como se usa en el presente documento, los "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo para el cual un oligosacárido (es decir, hidratos de carbono que contienen dos o más azúcares simples enlazados entre sí) se conectarán de manera específica y covalente. Las cadenas laterales de oligosacárido se unen a la estructura principal de un anticuerpo mediante uniones a N u O. La glicosilación de unión a N se refiere a la conexión de un resto de oligosacárido a la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glicosilación de unión a O se refiere a la conexión de un resto de oligosacárido a un hidroxiaminoácido, por ejemplo, serina, treonina. Los métodos para modificar el contenido de glicosilación de anticuerpos se conocen bien en la técnica, véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.218.149; el documento EP 0 359 096 B1; la publicación estadounidense n.º US 2002/0028486; el documento WO 03/035835; la publicación estadounidense n.º 2003/0115614; la patente estadounidense n.º 6.218.149; la patente estadounidense n.º 6.472.511. Alternativamente, la aglicosilación de las moléculas de unión biespecíficas de la invención puede lograrse produciendo de manera recombinante la molécula de unión biespecífica en una célula o un sistema de expresión que no puede producir glicosilación tal como, por ejemplo, bacterias. Alternativamente, la aglicosilación de las moléculas de unión biespecíficas de la invención puede lograrse mediante la eliminación enzimática de los restos de hidrato de carbono del sitio de glicosilación.

La molécula de unión biespecífica puede no unirse o puede tener una afinidad de unión reducida (con relación a una inmunoglobulina de referencia o silvestre) al componente del complemento C1q. Preferiblemente, esto se logra mutando la porción de inmunoglobulina anti-HER2 de la molécula de unión biespecífica para destruir un sitio de unión a C1q. El método puede englobar la delección del sitio de unión a C1q de la región Fc de un anticuerpo, modificando la posición 322 de lisina a alanina (K322A). Por ejemplo, la molécula de unión biespecífica puede comprender una cadena pesada con la secuencia de SEQ ID NO: 21. La afinidad de la molécula de unión biespecífica o el fragmento de la misma por el componente del complemento C1q puede determinarse, por ejemplo, mediante el ensayo BiaCore™

tal como se describe, por ejemplo, en Okazaki *et al.*, 2004. J Mol Biol, 336(5): 1239-49. Véase también, la sección 0. La unión biespecífica puede comprender una inmunoglobulina anti-HER2 que comprende un sitio de unión a C1q destruido que se une al componente del complemento C1q con menos del 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o el 5 % de unión en comparación con una inmunoglobulina de referencia o silvestre. Es posible que la molécula de unión biespecífica no active el complemento.

La molécula de unión biespecífica dada a conocer en el presente documento puede comprender una inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina (i) comprende al menos una modificación de aminoácido con relación a una región Fc silvestre, de tal manera que dicha molécula no se une o tiene una unión reducida a un receptor de Fc en forma soluble o como forma unida a la célula; (ii) comprende una o más mutaciones en la región Fc para destruir un sitio de glicosilación de unión a N; y (iii) no tiene o tiene una unión reducida al componente del complemento C1q. Por ejemplo, la molécula de unión biespecífica puede comprender una IgG que comprende una primera mutación, N297A, en la región Fc para (i) abolir o reducir la unión a un receptor de Fc en forma soluble o como forma unida a células; y (ii) destruir un sitio de glicosilación de unión a N en la región Fc; y una segunda mutación, K322A, en la región Fc para (iii) suprimir o reducir la unión al componente del complemento C1q. Véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 27.

La inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender las regiones variables de trastuzumab (véanse, por ejemplo, las tablas 2 y 3), y preferiblemente una región constante de IgG1 humana. La inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender las regiones variables de trastuzumab en las que la secuencia de la cadena pesada es SEQ ID NO: 27 y en las que la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25. La inmunoglobulina que se une a HER2 puede ser una variante de trastuzumab, en la que la cadena pesada no se une o tiene una unión reducida a un receptor de Fc en forma soluble o como forma unida a células. La cadena pesada que no se une a un receptor de Fc en forma soluble o como una forma unida a células puede comprender una mutación en la región Fc para destruir un sitio de glicosilación de unión a N. En la cadena pesada puede tener una sustitución de aminoácidos para reemplazar una asparagina que es un sitio de glicosilación de unión a N, por un aminoácido que no funciona como sitio de glicosilación. La mutación para destruir un sitio de glicosilación de unión a N puede ser N297A en la región Fc (SEQ ID NO: 20). La inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender las regiones variables de trastuzumab, en las que la secuencia de la cadena pesada comprende una mutación en la región Fc para destruir un sitio de unión a C1q. Es posible que la inmunoglobulina no active el complemento. La mutación para destruir un sitio de unión a C1q puede ser K322A en la región Fc (SEQ ID NO: 21). La inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender las regiones variables de trastuzumab, en la que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una mutación en la región Fc para destruir un sitio de glicosilación ligado a N y una mutación en la región Fc para destruir un sitio de unión a C1q (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 27). La inmunoglobulina que se une a HER2 puede comprender las regiones variables de trastuzumab en las que la secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina se ha mutado en la región Fc y es SEQ ID NO: 27 y en las que la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25. La secuencia del polipéptido de fusión de cadena ligera puede ser SEQ ID NO: 29. La cadena pesada puede comprender la región constante de trastuzumab. La cadena pesada puede comprender la región constante de una cadena pesada descrita en la tabla 2, a continuación (por ejemplo, la región constante de una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 62 o 63). La secuencia de la cadena pesada puede ser tal como se describe en la tabla 2, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 62 o 63). La cadena ligera puede comprender la región constante de una cadena ligera descrita en la tabla 3, a continuación (por ejemplo, la región constante de SEQ ID NO: 25). La secuencia de la cadena ligera puede ser tal como se describe en la tabla 3, a continuación (por ejemplo, SEQ ID NO: 25).

La molécula de unión biespecífica puede tener una secuencia derivada de trastuzumab que contiene una o más de las modificaciones en la inmunoglobulina de trastuzumab, y tiene una secuencia derivada de huOKT3 que contiene una o más de las modificaciones en las secuencias V_H y V_L de huOKT3, tal como se describe en la tabla 8, a continuación. Las moléculas de unión biespecíficas que tienen otras secuencias de inmunoglobulina o scFv pueden contener mutaciones análogas en las posiciones correspondientes en estas otras secuencias de inmunoglobulina o scFv. La molécula de unión biespecífica puede (a) derivar de trastuzumab y huOKT3; y (b) contiene una o más de las modificaciones descritas en la tabla 8, a continuación. La secuencia del ligador peptídico que conjuga la cadena ligera de inmunoglobulina y el scFv puede ser tal como se describe en la tabla 1, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 o 35-41). La secuencia de la cadena pesada puede ser tal como se describe en la tabla 2, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 62 o 63). La secuencia de la cadena ligera puede ser tal como se describe en la tabla 3, a continuación (por ejemplo, SEQ ID NO: 25). La secuencia del V_H del scFv puede ser tal como se describe en la tabla 4, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 17 o 64). La secuencia del V_L del scFv puede ser tal como se describe en la tabla 5, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 16 o 65). La secuencia del ligador peptídico de scFv puede ser tal como se describe en la tabla 1, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 o 35-41). La secuencia del scFv puede ser tal como se describe en la tabla 6, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 19 48-59 o 66). La secuencia del polipéptido de fusión de cadena ligera puede ser tal como se describe en la tabla 7, a continuación (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 34, 42-47 o 60).

La molécula de unión biespecífica puede comprender un anticuerpo monoclonal glicosilado que es una inmunoglobulina que se une a HER2, que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión de cadena ligera, y en la que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv,

a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión de cadena ligera, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos, y (ii) se unen a CD3, en la que los polipéptidos de fusión de cadena ligera primero y segundo son idénticos, en la que la secuencia de cada cadena pesada es SEQ ID NO: 62, y en la que la secuencia de cada polipéptido de fusión de cadena ligera es SEQ ID NO: 60.

La molécula de unión biespecífica puede comprender un anticuerpo monoclonal glicosilado que es una inmunoglobulina que se une a HER2, que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión de cadena ligera, y en la que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión de cadena ligera, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos, y (ii) se unen a CD3, en la que los polipéptidos de fusión de cadena ligera primero y segundo son idénticos, en la que la secuencia de cada cadena pesada es SEQ ID NO: 27, y en la que la secuencia de cada polipéptido de fusión de cadena ligera es SEQ ID NO: 47.

La molécula de unión biespecífica puede comprender un anticuerpo monoclonal glicosilado que es una inmunoglobulina que se une a HER2, que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión de cadena ligera, y en la que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión de cadena ligera, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos, y (ii) se unen a CD3, en la que los polipéptidos de fusión de cadena ligera primero y segundo son idénticos, en la que la secuencia de cada cadena pesada es SEQ ID NO: 27, y en la que la secuencia de cada polipéptido de fusión de cadena ligera es SEQ ID NO: 29.

La molécula de unión biespecífica puede tener baja inmunogenicidad. La inmunogenicidad baja o aceptable y/o alta afinidad, así como otras propiedades adecuadas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos conseguidos. "Baja inmunogenicidad" se define en el presente documento como el aumento de respuestas HAMA, HACA o HAMA significativas en menos de aproximadamente el 75 %, o preferiblemente en menos de aproximadamente el 50 % de los pacientes tratados y/o el aumento de bajos títulos en el paciente tratado (Elliott *et al.*, Lancet 344:1125-1127 (1994)).

Las moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento pueden unirse a HER2 y CD3 con una amplia gama de afinidades. La afinidad o afección de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado. Véase, por ejemplo, Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y métodos descritos en el presente documento. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones (por ejemplo, concentración de sal, pH). Por tanto, las medidas de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno se realizan preferiblemente con disoluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón normalizado, tal como el tampón descrito en el presente documento. La afinidad, K_D es una razón de k_{on}/k_{off} . Generalmente, una K_D en el rango micromolar se considera de baja afinidad. Generalmente, una K_D en el rango picomolar se considera de alta afinidad. La molécula de unión biespecífica puede tener una alta afinidad por HER2 y una baja afinidad por CD3. La molécula de unión biespecífica puede tener una alta afinidad por HER2 y una afinidad media por CD3. La molécula de unión biespecífica puede tener una K_D de entre 70 nM y 1 μ M para CD3. La molécula de unión biespecífica puede tener una K_D de entre 70 nM y 500 nM para CD3. La molécula de unión biespecífica puede tener una K_D de entre 500 nM y 1 μ M para CD3.

La molécula de unión biespecífica puede unirse a una o más líneas celulares de carcinoma positivas para HER2, tal como se determina mediante ensayos conocidos por los expertos en la técnica tales como, por ejemplo, ELISA, BiaCore™ y citometría de flujo. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de carcinoma de mama tal como, por ejemplo, MDA-MB-361, MDA-MB-468, AU565, SKBR3, HTB27, HTB26, HCC1954 y/o MCF7. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de carcinoma de ovario tal como, por ejemplo, OVCAR3 y/o SKOV3. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de melanoma tal como, por ejemplo, HT144, SKMEL28, M14 y/o HTB63. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de osteosarcoma tal como, por ejemplo, RG160, RG164, CRL1427 y/o U2OS. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de sarcoma de Ewing tal como, por ejemplo, SKEAW y/o SKES-1. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de rabdomiosarcoma tal como, por ejemplo, HTB82. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de neuroblastoma tal como, por ejemplo, NMB7, SKNBE(2)C, IMR32, SKNBE(2)S, SKNBE(1)N y/o NB5. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) tal como, por ejemplo, 15B, 93-VU-147T, PCI-30, UD-SCC2, PCI-15B, SCC90 y/o UMSCC47. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de cáncer de cuello uterino tal como, por ejemplo, HeLa. La línea celular de carcinoma puede ser una línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas tal como, por ejemplo, NCI-H524, NCI-H69 y/o NCI-H345. La molécula de unión biespecífica puede unirse a la línea celular de carcinoma positivo para HER2 con una CE50 en el rango picomolar. Véase, por ejemplo, la sección 0 y la sección 0.

La molécula de unión biespecífica puede unirse a células T CD3+, tal como se determina mediante ensayos conocidos

por un experto en la técnica tales como, por ejemplo, ELISA, BiaCore™ y citometría de flujo. La molécula de unión biespecífica puede unirse a las células T CD3+ con una unión más de 15 veces menor que la unión de huOKT3 a las células T CD3+. Véase, por ejemplo, la sección 0. Las células T CD3+ pueden ser células T humanas.

La molécula de unión biespecífica puede mediar en la citotoxicidad de células T frente a células positivas para HER2, tal como se determina mediante ensayos conocidos por un experto en la técnica tales como, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad. La molécula de unión biespecífica puede mediar en la citotoxicidad de células T frente a líneas celulares positivas para HER2 con una CE50 en el rango picomolar. Las células positivas para HER2 pueden ser líneas celulares de carcinoma de mama tales como, por ejemplo, MDA-MB-361, MDA-MB-468, AU565, SKBR3, HTB27, HTB26 y/o MCF7. Las células positivas para HER2 pueden ser líneas celulares de carcinoma de ovario tales como, por ejemplo, OVCAR3 y/o SKOV3. Las células positivas para HER2 pueden ser líneas celulares de melanoma tales como, por ejemplo, HT144, SKMEL28, M14 y/o HTB63. Las células positivas para HER2 pueden ser líneas celulares de osteosarcoma tales como, por ejemplo, RG160, RG164, CRL1427 y/o U2OS. Las células positivas para HER2 pueden ser líneas celulares de sarcoma de Ewing tales como, por ejemplo, SKEAW y/o SKES-1. Las células positivas para HER2 pueden ser líneas celulares de rhabdomyosarcoma tales como, por ejemplo, HTB82. Las células positivas para HER2 pueden ser líneas celulares de neuroblastoma tales como, por ejemplo, NMB7, SKNBE(2)C, IMR32, SKNBE(2)S, SKNBE(1)N y/o NB5. Las células positivas para HER2 pueden ser líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) tales como, por ejemplo, 15B, 93-VU-147T, PCI-30, UD-SCC2, PCI-15B, SCC90 y/o UMSCC47. Las células positivas para HER2 pueden ser una línea celular de cáncer de cuello uterino tal como, por ejemplo, HeLa. Las células positivas para HER2 pueden ser una línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas tal como, por ejemplo, NCI-H524, NCI-H69 y/o NCI-H345. Véase, por ejemplo, la sección 0 y la sección 0.

La preincubación de células positivas para HER2 con huOKT3 puede bloquear la capacidad de la molécula de unión biespecífica para inducir citotoxicidad de células T. La preincubación de células positivas para HER2 con trastuzumab puede bloquear la capacidad de la molécula de unión biespecífica para inducir citotoxicidad de células T. Véase, por ejemplo, la sección 0.

La molécula de unión biespecífica puede mediar en la citotoxicidad de células T frente a células positivas para HER2, en la que el nivel de expresión de HER2 en dichas células está por debajo del umbral de detección mediante citometría de flujo realizada con la molécula de unión biespecífica. Véase, por ejemplo, la sección 0.

La molécula de unión biespecífica puede mediar en la citotoxicidad de células T frente a células positivas para HER2 resistentes a otras terapias dirigidas a HER tales como, por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib, neratinib o cualquier otra molécula pequeña o anticuerpo que se dirija a la familia HER de receptores. El tumor que es resistente a las terapias dirigidas a HER tales como, por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib, neratinib o cualquier otra molécula pequeña o anticuerpo que se dirija a la familia HER de receptores puede responder al tratamiento con una molécula de unión biespecífica de la invención. Véase, por ejemplo, la sección 0, la sección 0, la sección 0 y la sección 0.

La molécula de unión biespecífica puede reducir la progresión tumoral, la metástasis y/o el tamaño del tumor positivo para HER2. Véase, por ejemplo, la sección 0.

La molécula de unión biespecífica puede unirse a una célula T. La unión de la molécula de unión biespecífica a una célula T puede ser no covalente. La célula T puede administrarse a un sujeto. La célula T puede ser autóloga para el sujeto al que va a administrarse la célula T. La célula T puede ser alogénica para el sujeto al que va a administrarse la célula T. La célula T puede ser una célula T humana.

La molécula de unión biespecífica puede no estar unida a una célula T.

La molécula de unión biespecífica puede conjugarse con un resto orgánico, un marcador detectable y/o isótopo tal como se describe en la sección 0.

La molécula de unión biespecífica o el fragmento de la misma puede producirse tal como se describe en la sección 0. La molécula de unión biespecífica o el fragmento de la misma puede estar codificada por un polinucleótido tal como se describe en la sección 0. La molécula de unión biespecífica o el fragmento de la misma puede estar codificada por un vector (por ejemplo, vector de expresión) tal como se describe en la sección 0. La molécula de unión biespecífica o el fragmento de la misma puede producirse a partir de una célula tal como se describe en la sección 0.

La molécula de unión biespecífica puede ser un componente de una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) y/o como parte de un kit tal como se describe en la sección 0.

La molécula de unión biespecífica puede usarse según los métodos proporcionados en la sección 0. La molécula de unión biespecífica puede usarse como herramienta de diagnóstico según los métodos proporcionados en la sección 0. La molécula de unión biespecífica puede usarse como agente terapéutico según los métodos proporcionados en la sección 0. La molécula de unión biespecífica puede administrarse a un sujeto, tal como un sujeto descrito en la sección 0, para su uso según los métodos proporcionados en la sección 0. La molécula de unión biespecífica puede administrarse a un sujeto como parte de una terapia de combinación tal como se describe en la sección 0, para su uso

según los métodos proporcionados en la sección 0.

Tabla 1. Secuencia de ligador

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (SEQ ID NO:)
(G ₄ S) ₃	GGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 14)
Ligador TS(G ₄ S) ₃	TSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 35)
Ligador G ₄ S	GGGSG (SEQ ID NO: 36)
Ligador (G ₄ S) ₂	GGGSGGGSG (SEQ ID NO: 37)
Ligador (G ₄ S) ₃	GGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 38)
Ligador (G ₄ S) ₄	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 39)
Ligador (G ₄ S) ₅	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 40)
Ligador (G ₄ S) ₆	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 41)

Tabla 2. Secuencia de cadena pesada. La secuencia sin subrayar y sin cursiva representa el dominio V_H. La secuencia en cursiva representa la región constante. Las secuencias subrayadas, en cursiva y en negrita representan las mutaciones descritas en la columna "DESCRIPCIÓN".

5

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (SEQ ID NO:)
Dominio V _H de trastuzumab con región constante de IgG1 humana	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSCKDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23)
Dominio V _H de trastuzumab con región constante de IgG1 humana; N297A; K322A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSCKDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27)
Dominio V _H de trastuzumab con región constante de IgG1 humana; N297A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSCKDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 62)

Dominio V_H de trastuzumab con región constante de IgG1 humana; K322A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS <i>ASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KC</i> <u><i>AV</i></u> <i>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFC</i> <i>SV</i> <i>MHEALHNHYTOKSLSPGK</i> (SEQ ID NO:63)
---	---

Tabla 3. Secuencia de cadena ligera. La secuencia que no está en cursiva representa el dominio V_L . La secuencia en cursiva representa la región constante.

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (SEQ ID NO:)
Cadena ligera de trastuzumab	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS <i>VFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLTLTSLKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTS</i> (SEQ ID NO: 25)

5 Tabla 4. Secuencia de V_H de scFv. Las secuencias subrayadas, en cursiva y en negrita representan las mutaciones descritas en la columna "DESCRIPCIÓN".

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (SEQ ID NO:)
V_H de huOKT3	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSS (SEQ ID NO: 15)
V_H de huOKT3; C105S	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY <u>SL</u> LDYWGQGPVTVSS (SEQ ID NO: 17)
V_H de huOKT3; C105S + V_H -G44C	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK CLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY <u>SL</u> LDYWGQGPVTVSS (SEQ ID NO: 64)

Tabla 5. Secuencia de V_L de scFv. La secuencia subrayada, en cursiva y en negrita representa las mutaciones descritas en la columna "DESCRIPCIÓN".

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (SEQ ID NO:)
V_L de huOKT3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKR WIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDATYYCQQWS SNPFTFGQGTKLQITR (SEQ ID NO: 16)
V_L de huOKT3; V_L -Q100C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKR WIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDATYYCQQWS SNPFTFG <u>CG</u> TKLQITR (SEQ ID NO:65)

10 Tabla 6. Secuencia de scFv. La secuencia en mayúsculas, sin cursiva, sin negrita y sin subrayar representa el dominio V_H . La secuencia en mayúsculas y en cursiva representa el dominio V_L . Las secuencias en mayúsculas, subrayadas, en cursiva y en negrita representan las mutaciones descritas en la columna "DESCRIPCIÓN". Las secuencias en negrita y en minúsculas representan el ligador intra-scFv.

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (SEQ ID NO:)
scFv de huOKT3	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK

C105S; ligador intra-scFv de 15 aminoácidos	GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>DI</i> <i>QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT</i> <i>SKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQ</i> <i>GTKLQITR</i> (SEQ ID NO: 19)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 5 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>DIQMTQSPSS</i> <i>LSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPS</i> <i>RFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR</i> (SEQ ID NO: 48)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 10 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>DIQMT</i> <i>QSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA</i> <i>SGVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQGTKL</i> <i>QITR</i> (SEQ ID NO: 49)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 20 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>ggsgggsgggsgggsgg</i> <i>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRW</i> <i>IYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFT</i> <i>FGQGTKLQITR</i> (SEQ ID NO: 50)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 25 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>ggsgggsgggsgggsgg</i> <i>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKA</i> <i>PKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWS</i> <i>SNPFTFGQGTKLQITR</i> (SEQ ID NO: 51)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 30 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>ggsgggsgggsgggsgg</i> <i>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTP</i> <i>GKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQ</i> <i>QWSSNPFTFGQGTKLQITR</i> (SEQ ID NO: 52)
C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 5 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK C LEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>DIQMTQSPSS</i> <i>LSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPS</i> <i>RFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFG</i> C <i>GTKLQITR</i> (SEQ ID NO: 53)
C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 10 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK C LEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>DIQMT</i> <i>QSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA</i> <i>SGVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFG</i> C <i>GTKL</i> <i>QITR</i> (SEQ ID NO: 54)
C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 15 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK C LEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRLP EDTGVYFCARYYDDHY SLDYWGQ GPVTVSS ggggsgggsgggsgg <i>DI</i> <i>QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT</i> <i>SKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFG</i> C <i>GTKLQITR</i> (SEQ ID NO: 55)

C105S de scFv de huOKT3; VL-Q100C; VH-G44C; ligador intra-scFv de 20 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK CLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRP EDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGPVTVSSggggsgggsgggsggg ggsgggsgggDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQT PGKAPKRWIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIA TYTCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 56)
C105S de scFv de huOKT3; VL-Q100C; VH-G44C; ligador intra-scFv de 25 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK CLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRP EDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGPVTVSSggggsgggsgggsggg ggsgggsgggDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQT PGKAPKRWIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIA TYTCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 57)
C105S de scFv de huOKT3; VL-Q100C; VH-G44C; ligador intra-scFv de 30 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK CLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRP EDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGPVTVSSggggsgggsgggsggg ggsgggsgggDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQT PGKAPKRWIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIA TYTCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 58)
huOKT3; ligador intra-scFv de 15 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRP EDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSggggsgggsgggsggg DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQT PGKAPKRWIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIA TYTCQQWSSNPFTFGQGTKLOITR (SEQ ID NO: 59)

Tabla 7. Secuencia de polipeptido de fusión de cadena ligera. La secuencia en mayúsculas, sin cursiva, sin negrita y sin subrayar representa el dominio V_L de la cadena ligera de trastuzumab. La secuencia en mayúsculas y en cursiva representa la región constante de la cadena ligera de trastuzumab. La secuencia en minúsculas, sin cursiva, sin negrita y sin subrayar representa el ligador que conjuga la cadena ligera con el scFv. La secuencia subrayada y en mayúsculas representa el dominio V_H del scFv. La secuencia en negrita y en mayúsculas representa el dominio V_L del scFv. Las secuencias en mayúsculas, subrayadas, en cursiva y en negrita representan las mutaciones descritas en la columna "DESCRIPCIÓN". Las secuencias en negrita y en minúsculas representan el ligador intra-scFv.

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (SEQ ID NO:)
Cadena ligera de trastuzumab; C10S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 15 aminoácidos	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF <i>YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLISKADYE</i> <i>KHKVYACEVTHLQGLSSPVTKSFNRGECtsggggsggggsggggsQVQLVQS</i> <i>GGGVYQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY</i> <i>INPSRGTYNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSL RPEDTG VYF</i> <i>CARYDDHYSLDYWGOGTPVTVSSggggsggggsggggsDIQMTQSP</i> <i>SSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTS</i> <i>KLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDIA TYYCQQWSSNP F</i> TFGQGTKLQITR (SEQ ID NO: 29)

[illegible]

[illegible]

Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv de huOKT3; ligador peptídico intra-scFv de 30 aminoácidos; V _L -Q100C; V _H -G44C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSYGVPSTRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECtsggggsgggsgggsgggsgggsgg GGGVVQPGRLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYI NPSRGYTNYNQKFDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF CARYDDHYSLDYWGQGTPTVTVSSggggsgggsgggsgggsgggsgggsgg gggDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGK APKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATY YCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 47)
Cadena ligera de trastuzumab; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 15 aminoácidos	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSYGVPSTRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECtsggggsgggsgggsgggsgggsgg GGGVVQPGRLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY INPSRGYTNYNQKFDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF CARYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSSggggsgggsgggsgggsgggsgggsgg DIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYTCQQWSSNPFT FGQGTKLQITR (SEQ ID NO: 60)

Tabla 8. Modificaciones de moléculas de unión biespecíficas

UBICACIÓN DE LA MODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Cadena pesada	Mutación para reducir la unión al receptor de Fc (como ejemplo, mutación N297A)
	Mutación para destruir un sitio de glicosilación (como ejemplo, mutación N297A)
	Mutación para reducir la unión a C1q (como ejemplo, mutación K322A)
Ligador que conjuga la cadena ligera con el scFv de huOKT3	Aumentar o disminuir la longitud del ligador
V _H de scFv de huOKT3	Mutación para aumentar la estabilización y/o reducir la agregación (como ejemplo, introducir enlaces disulfuro entre V _H 40 y V _L 100 (según la numeración de Kabat), como ejemplo, V _H G44C y V _L Q100C)
	Reducir la agregación (como ejemplo, mutación C105S)
V _L de scFv de huOKT3	Mutación para aumentar la estabilización y/o reducir la agregación (como ejemplo, introducir enlaces disulfuro entre V _H 40 y V _L 100 (según la numeración de Kabat), como ejemplo, V _H G44C y V _L Q100C)
Ligador intra-scFv de huOKT3	Aumentar o disminuir la longitud del ligador

5.2 CONJUGADOS BIESPECÍFICOS DE MOLÉCULA DE UNIÓN

- 5 Una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento puede no conjugarse con ninguna otra molécula, tal como un resto orgánico, un marcador detectable o un isótopo. Alternativamente, una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento puede conjugarse con uno o más restos orgánicos. Alternativamente, una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento puede conjugarse con uno o más marcadores detectables. Alternativamente, una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento puede conjugarse con uno o más isótopos.

5.2.1 ISÓTOPOS Y MARCADORES DETECTABLES

- 15 Una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento puede conjugarse con uno o más isótopos o marcadores detectables, por ejemplo, con propósitos de obtención de imágenes. Una molécula de unión biespecífica puede marcarse de manera detectable mediante conexión covalente o no covalente de un agente cromogénico, enzimático, radioisotópico, isotópico, fluorescente, tóxico, quimioluminiscente, de contraste de resonancia magnética nuclear u otro marcador.

Los ejemplos no limitativos de marcadores cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina y ácido 4-hidroxiazobenceno-2-carboxílico.

Los ejemplos no limitativos de marcadores enzimáticos adecuados incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa., ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa.

Los ejemplos no limitativos de marcadores radioisotópicos adecuados incluyen ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{223}Ra , ^{223}Ra , ^{89}Zr , ^{177}Lu y ^{109}Pd . ^{111}In puede ser un isótopo preferido para obtención de imágenes *in vivo*, ya que evita el problema de deshalogenación de moléculas de unión biespecíficas marcadas con ^{125}I o ^{131}I en el hígado. Adicionalmente, ^{111}In tiene una energía de emisión gamma más favorable para la obtención de imágenes (Perkins *et al.*, Eur. J. Nucl. Med. 70:296-301 (1985); Carasquillo *et al.*, J. Nucl. Med. 25:281-287 (1987)). Por ejemplo, ^{111}In en combinación con anticuerpos monoclonales con 1-(P-isotiocianatobencil)-DPTA ha mostrado escasa captación en tejidos no tumorales, particularmente el hígado y, por tanto, potencia la especificidad de la localización tumoral (Esteban *et al.*, J. Nucl. Med. 28:861-870 (1987)).

Los ejemplos no limitativos de marcadores isotópicos no radiactivos adecuados incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tr y ^{56}Fe .

Los ejemplos no limitativos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen un marcador de ^{152}Eu , un marcador de fluoresceína, un marcador de isotiocianato, un marcador de rodamina, un marcador de ficoeritrina, un marcador de ficocianina, un marcador de alofocianina, un marcador de proteína fluorescente verde (GFP), un marcador de o-ftaldehído y un marcador de fluorescamina.

Los ejemplos no limitativos de marcadores quimioluminiscentes incluyen un marcador de luminol, un marcador de isoluminol, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de luciferina, un marcador de luciferasa y un marcador de aequorina.

Los ejemplos no limitativos de agentes de contraste de resonancia magnética nuclear incluyen núcleos de metales pesados tales como Gd, Mn y hierro.

Se describen técnicas conocidas por un experto en la técnica para unir los marcadores descritos anteriormente a una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, por ejemplo, en Kennedy *et al.*, Clin. CMm. Acta 70:1-31 (1976), y Schurs *et al.*, Clin. CMm. Acta 81:1-40 (1977). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en este último son el método del glutaraldehído, el método del peryodato, el método de la dimaleimida, el método del éster de m-maleimidobencil-N-hidroxisuccinimida.

La molécula de unión biespecífica puede conjugarse con un agente de diagnóstico. Un agente de diagnóstico es un agente útil para diagnosticar o detectar una enfermedad localizando las células que contienen el antígeno. Los agentes de diagnóstico útiles incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, colorantes (tales como con el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos) para la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM). La patente estadounidense n.º 6.331.175 describe la técnica de IRM y la preparación de anticuerpos conjugados con un agente potenciador de IRM. Preferiblemente, los agentes de diagnóstico se seleccionan del grupo que consiste en radioisótopos, agentes potenciadores para su uso en obtención de imágenes por resonancia magnética y compuestos fluorescentes. Para cargar un componente de anticuerpo con metales radiactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tenga una cola larga a la que se conectan una multiplicidad de grupos quelantes para unir los iones. Tal cola puede ser un polímero tal como una polilisina, polisacárido u otra cadena derivatizada o derivatizable que tiene grupos colgantes a los que pueden unirse grupos quelantes tales como, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), porfirinas, poliaminas, éteres corona, bis-tiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares que se sabe que son útiles para este propósito. Los quelatos se acoplan con los anticuerpos usando químicas convencionales. El quelato se une normalmente al anticuerpo por un grupo que permite la formación de un enlace a la molécula con una mínima pérdida de inmunorreactividad y mínima agregación y/o reticulación interna. Se describen otros métodos y reactivos más inusuales para conjugar quelatos con anticuerpos en la patente estadounidense n.º 4.824.659 concedida a Hawthorne, titulada "Antibody Conjugates", expedida el 25 de abril de 1989. Las combinaciones de quelato de metal particularmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos de monometilo y ciclohexilo, usados con isótopos de diagnóstico para la obtención de imágenes radiológicas. Los mismos quelatos, cuando se complejan con metales no radiactivos, tales como manganeso, hierro y gadolinio, son útiles para IRM, cuando se usan junto con moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento. Los quelatos macrocíclicos tales como NOTA, DOTA y TETA son útiles con una variedad de metales y radiometales, lo más particularmente con radionúclidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Puede hacerse que tales complejos de metal-quelato sean muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Otros quelatos de tipo anillo, tales como los poliéteres macrocíclicos, que son de interés para la unión estable de núclidos, tales como ^{223}Ra para RAIT están englobados en el presente documento.

5.2.2 CONJUGADOS ORGÁNICOS

Las moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento pueden comprender uno o más restos orgánicos que se unen de manera covalente, directa o indirectamente, a la molécula de unión biespecífica. Tal modificación puede producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, semivida sérica *in vivo* aumentada). El resto orgánico puede ser un grupo polimérico hidrófilo, un grupo de ácido graso o un grupo de éster de ácido graso. Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido graso” engloba ácidos monocarboxílicos y ácidos dicarboxílicos. Tal como se usa en el presente documento, un “grupo polimérico hidrófilo” se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano, por ejemplo, polilisina. Los polímeros hidrófilos adecuados para modificar una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento pueden ser lineales o ramificados e incluyen, por ejemplo, polialcanoglicoles (por ejemplo, polietilenglicol, (PEG), monometoxi-polietilenglicol y polipropilenglicol), hidratos de carbono (por ejemplo, dextrano, celulosa, oligosacáridos y polisacáridos), polímeros de aminoácidos hidrófilos (por ejemplo, polilisina, poliarginina y poliaspartato), poli(óxidos de alcano) (por ejemplo, poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno)) y polivinilpirrolidona. El polímero hidrófilo que modifica una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento puede tener un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 150.000 Dalton como entidad molecular independiente. Por ejemplo PEG₅₀₀₀ y PEG_{20.000}, en los que el subíndice es el peso molecular promedio del polímero en Daltons. El grupo polimérico hidrófilo puede estar sustituido con de uno a aproximadamente seis grupos alquilo, ácido graso o éster de ácido graso. Los polímeros hidrófilos que están sustituidos con un grupo ácido graso o éster de ácido graso pueden prepararse empleando métodos adecuados. Por ejemplo, un polímero que comprende un grupo de amina puede acoplarse con un carboxilato del ácido graso o éster de ácido graso, y puede acoplarse un carboxilato activado (por ejemplo, activado con N,N-carbonildiimidazol) en un ácido graso o éster de ácido graso con un grupo hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y los ésteres de ácidos grasos adecuados para modificar moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento pueden ser saturados o pueden contener una o más unidades de insaturación. Los ácidos grasos que son adecuados para modificar moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato, n-tetradecanoato, n-octadecanoato, n-eicosanoato, n-docosanoato, n-triacontanoato, n-tetracontanoato, cis-delta-9-octadecanoato, todo cis-delta-5,8,11,14-eicosatetraenoato, ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico, y similares. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen monoésteres de ácidos dicarboxílicos que comprenden un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender de uno a aproximadamente doce, preferiblemente de uno a aproximadamente seis, átomos de carbono.

Los conjugados de moléculas de unión biespecíficas proporcionados en el presente documento pueden prepararse usando métodos adecuados, tales como mediante reacción con uno o más agentes de modificación. Tal como se usa en el presente documento, un “grupo de activación” es un resto químico o grupo funcional que puede, en condiciones apropiadas, reaccionar con un segundo grupo químico formando de ese modo un enlace covalente entre el agente de modificación y el segundo grupo químico. Por ejemplo, los grupos de activación reactivos con amina incluyen grupos electrófilos tales como, por ejemplo, tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, fluoro, yodo), ésteres de N-hidroxisuccinimido (NHS), y similares. Los grupos de activación que pueden reaccionar con tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, disulfuros de piridilo, tiol del ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol), y similares. Puede acoplarse un grupo funcional aldehído con moléculas que contienen amina o hidrazida, y un grupo azida puede reaccionar con un grupo de fósforo trivalente para formar uniones fosforamido o fosforimida. Se conocen en la técnica métodos adecuados para introducir grupos de activación en moléculas (véase, por ejemplo, Hernanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, California (1996)). Un grupo de activación puede unirse directamente al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrófilo, ácido graso, éster de ácido graso), o a través de un resto de ligador, por ejemplo un grupo C₁-C₁₂ divalente, en el que uno o más átomos de carbono pueden reemplazarse por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Los restos de ligador adecuados incluyen, por ejemplo, tetraetilenglicol, (CH₂)₃ y NH. Pueden producirse agentes de modificación que comprenden un resto de ligador, por ejemplo, haciendo reaccionar una mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono-Boc-etilendiamina o mono-Boc-diaminohexano) con un ácido graso en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para formar un enlace amida entre la amina libre y el carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc puede eliminarse del producto mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que puede acoplarse con otro carboxilato tal como se describe, o puede hacerse reaccionar con anhídrido maleico y el producto resultante se cicla para producir un derivado de maleimido activado del ácido graso. (Véase, por ejemplo, Thompson, *et al.*, documento WO 92/16221.)

Tal como se usa en el presente documento, un “agente de modificación” se refiere a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrófilo, un ácido graso y un éster de ácido graso) que comprende un grupo de activación. Por ejemplo, los restos orgánicos pueden unirse a la molécula de unión biespecífica de una manera no específica del sitio empleando un agente de modificación reactivo con amina, por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG. Las moléculas de unión biespecíficas modificadas también pueden prepararse reduciendo los enlaces disulfuro (por ejemplo, enlaces disulfuro intracatenarios) de la molécula de unión biespecífica. La molécula de unión biespecífica reducida puede hacerse reaccionar luego con un agente de modificación reactivo con tiol para producir la molécula de unión biespecífica modificada proporcionada en el presente documento. Las moléculas de unión biespecíficas modificadas que comprenden un resto orgánico que se une a sitios específicos de una molécula de unión biespecífica

proporcionada en el presente documento pueden prepararse usando métodos adecuados, tales como proteólisis inversa (Fisch *et al.*, Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992); Werlen *et al.*, Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994); Kumaran *et al.*, Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997); Itoh *et al.*, Bioorg. Chem., 24(1): 59-68 (1996).); Capellas *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997).)), y los métodos descritos en Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996).

5.3 PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE UNIÓN BIESPECÍFICAS

Se proporcionan en el presente documento métodos para producir moléculas de unión biespecíficas tal como se describe en la sección 0 y la sección 0. Se proporcionan en el presente documento métodos para producir una molécula de unión biespecífica que comprende un anticuerpo monoclonal aglicosilado que es una inmunoglobulina que se une a HER2, que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos idénticas cadenas ligeras, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión, y la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos y (ii) se unen a CD3, y en la que los polipéptidos de fusión primero y segundo son idénticos.

Un experto habitual en la técnica conoce métodos para producir moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento, por ejemplo, mediante síntesis química, mediante purificación a partir de fuentes biológicas o mediante técnicas de expresión recombinante incluyendo, por ejemplo, a partir de preparaciones transgénicas o de células de mamífero. Los métodos descritos en el presente documento emplean, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales en biología molecular, microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácidos nucleicos y campos relacionados dentro del conocimiento de la técnica. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en las referencias citadas en el presente documento y se explican con detalle en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Maniatis *et al.* (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook *et al.* (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook *et al.* (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren *et al.* (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Existe una variedad de métodos en la técnica para la producción de moléculas de unión biespecíficas. Por ejemplo, la molécula de unión biespecífica puede prepararse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 4.816.567. El uno o más ADN que codifican para una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento pueden aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos, o tales cadenas de fuentes humanas, humanizadas u otras). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transforman en células huésped tales como células NS0, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de levaduras, células de algas, huevos o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de las moléculas de unión biespecíficas en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena ligera y pesada humana de una especie deseada en lugar de las secuencias humanas homólogas (la patente estadounidense n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, citado anteriormente) o uniendo de manera covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido distinto de inmunoglobulina. Tal polipéptido distinto de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento. El ADN puede ser tal como se describe en la sección 0.

Las moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento también pueden prepararse usando al menos un polinucleótido que codifica para la molécula de unión biespecífica para proporcionar animales o mamíferos transgénicos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas, y similares, que producen tales anticuerpos en su leche. Estos animales pueden proporcionarse usando métodos conocidos. Véanse, por ejemplo, pero no se limita a, las patentes estadounidenses n.ºs 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616. 5.565.362; 5.304.489, y similares.

Las moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento pueden prepararse adicionalmente usando al menos un polinucleótido que codifica para la molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento para proporcionar plantas transgénicas y células vegetales cultivadas (por ejemplo, pero sin limitarse a tabaco y maíz) que producen tales anticuerpos, porciones o variantes especificadas en las partes de la planta o en las células cultivadas a partir de ellas. Como ejemplo no limitativo, se han usado satisfactoriamente hojas de tabaco transgénicas que expresan proteínas recombinantes para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. Véase, por ejemplo, Cramer *et al.*, Curr. Top. Microbol.

Immunol. 240:95-118 (1999) y las referencias citadas en ese documento. Además, se ha usado maíz transgénico para expresar proteínas de mamíferos a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas a partir de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) y las referencias citadas en ese documento. También se han producido anticuerpos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas, incluyendo fragmentos de anticuerpo, tales como scFv, incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad *et al.*, Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) y las referencias citadas en ese documento. Por tanto, también pueden producirse moléculas de unión biespecíficas usando plantas transgénicas, según métodos conocidos. Véase también, por ejemplo, Fischer *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (octubre, 1999), Ma *et al.*, Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma *et al.*, Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam *et al.*, Biochem Soc. Trans. 22:940-944 (1994); y las referencias citadas en ese documento.

Las moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento pueden prepararse usando al menos un polinucleótido que codifica para una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento para proporcionar bacterias que produzcan tales moléculas de unión biespecíficas. Como ejemplo no limitativo, se ha usado satisfactoriamente *E. coli* que expresa proteínas recombinantes para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes. Véase, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, 216(1-2): 165-181 y las referencias citadas en ese documento.

Véase, también, la sección 0 para un ejemplo detallado para el diseño y producción de una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento.

Las moléculas de unión biespecíficas pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo, pero sin limitarse a, purificación con proteína A, purificación con proteína G, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxiapatita y cromatografía de lectina. También puede emplearse cromatografía de líquidos de alta resolución ("HPLC") para la purificación. Véase, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology, o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), por ejemplo, capítulos 1, 4, 6, 8, 9 y 10.

Las moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento pueden incluir productos purificados de manera natural, productos de procedimientos de síntesis química y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, células de levadura, plantas superiores, insectos y mamíferos. La molécula de unión biespecífica puede generarse en un huésped de tal manera que la molécula de unión biespecífica esté aglicosilada. La molécula de unión biespecífica puede generarse en una célula bacteriana de tal manera que la molécula de unión biespecífica esté aglicosilada. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, citado anteriormente, secciones 17.37-17.42; Ausubel, citado anteriormente, capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, Protein Science, citado anteriormente, capítulos 12-14.

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse, por ejemplo, mediante ELISA, ELISPOT, citometría de flujo, inmunocitología, análisis BiaCore™, ensayo de exclusión cinética Sapidyn KinExA™, SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western, o mediante análisis de HPLC, así como mediante varios otros ensayos funcionales dados a conocer en el presente documento.

5.3.1 POLINUCLEÓTIDOS

Se proporcionan en el presente documento polinucleótidos que pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica para una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento o un fragmento de la misma (por ejemplo, un polipéptido de fusión de cadena pesada y/o cadena ligera) que se une de manera inmunoespecífica a HER2 y CD3, tal como se describe en la sección 0 y la sección 0. También se proporcionan en el presente documento vectores que comprenden tales polinucleótidos. Véase, la sección 0. También se proporcionan en el presente documento polinucleótidos que codifican para antígenos de las moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de menor rigurosidad con polinucleótidos que codifican para una molécula de unión biespecífica o un fragmento de la misma proporcionados en el presente documento.

La expresión "purificado" incluye preparaciones de polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico que tienen menos de aproximadamente el 15 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o el 0,1 % (en particular menos de aproximadamente el 10 %) de otro material, por ejemplo, material celular, medio de cultivo, otras moléculas de ácido nucleico, precursores químicos y/u otros productos químicos. Una(s) molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) para una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento puede aislarse o purificarse.

Las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNhn, ARNt o cualquier otra forma, o en forma de ADN incluyendo, pero sin limitarse a, ADNc y ADN genómico obtenidos mediante clonación o producidos de manera sintética, o cualquier combinación de los mismos. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario, o cualquier combinación de los mismos. Cualquier porción de al menos una hebra del ADN o ARN puede ser la hebra codificante, también conocida como hebra sentido, o puede

ser la hebra no codificante, también denominada hebra antisentido.

Se proporciona en el presente documento un polinucleótido que puede comprender secuencias de nucleótidos que codifican para una molécula de unión biespecífica o un fragmento de la misma tal como se describe en la sección 0 y la sección 0, en el que la molécula de unión biespecífica puede comprender un anticuerpo monoclonal aglicosilado que es una inmunoglobulina que se une a HER2, que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en el que la primera cadena ligera se fusiona a un primer scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión de cadena ligera, y en el que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión de cadena ligera, en el que los scFv primero y segundo (i) son idénticos, y (ii) se unen a CD3, y en el que los polipéptidos de fusión de cadena ligera primero y segundo son idénticos.

Para obtener un ejemplo detallado de la generación de una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento, véase, la sección 0 para un ejemplo detallado para el diseño y la producción de una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento.

Se proporciona en el presente documento un polinucleótido que puede comprender secuencias de nucleótidos que codifican para un polipéptido de fusión de cadena ligera que comprende una cadena ligera fusionada a un scFv, a través de un ligador peptídico, en el que la cadena ligera se une a HER2 y en el que el scFv se une a CD3. La cadena ligera puede ser la cadena ligera de un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica tal como, por ejemplo, trastuzumab, M-111, pertuzumab, ertumaxomab, MDXH210, 2B1 y MM-302. El scFv puede comprender el V_H y V_L de un anticuerpo anti-CD3 conocido en la técnica tal como, por ejemplo, huOKT3, YTH12.5, HUM291, teplizumab, huCLB-T3/4, oteixizumab, blinatumomab, MT110, catumaxomab, 28F11, 27H5, 23F10, 15C3, visilizumab y Hum291. El anticuerpo anti-CD3 puede ser huOKT3. El scFv puede comprender el V_H de huOKT3 y puede comprender además la sustitución de aminoácidos en la posición numerada 105, en la que la cisteína se sustituye por una serina. Véase, por ejemplo, Kipriyanov *et al.* 1997, Protein Eng. 445-453. El scFv puede derivarse del anticuerpo monoclonal huOKT3 y comprender una o más mutaciones, en relación con el V_H y V_L nativos de huOKT3, para estabilizar los enlaces disulfuro. La estabilización de los enlaces disulfuro puede impedir la agregación de la molécula de unión biespecífica. La estabilización de los enlaces disulfuro puede reducir la agregación de la molécula de unión biespecífica en comparación con la agregación de la molécula de unión biespecífica sin la estabilización de los enlaces disulfuro. En la molécula de unión biespecífica, la una o más mutaciones para estabilizar los enlaces disulfuro pueden comprender una mutación V_H G44C y una mutación V_L Q100C (por ejemplo, como está presente en las SEQ ID NO: 54-59). En la molécula de unión biespecífica, una o más mutaciones para estabilizar los enlaces disulfuro pueden ser el reemplazo del residuo de aminoácido en V_H44 (según el sistema de numeración de Kabat) por una cisteína y el reemplazo del residuo de aminoácido en V_L100 (según el sistema de numeración de Kabat) por una cisteína para introducir un enlace disulfuro entre V_H44 y V_L100 (por ejemplo, como está presente en las SEQ ID NO: 54-59). El ligador peptídico puede tener entre 5-30, 5-25, 5-15, 10-30, 10-20, 10-15, 15-30 o 15-25 residuos de aminoácido de longitud. La secuencia del ligador peptídico puede ser tal como se describe en la tabla 1 anterior (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 o 35-41). La secuencia del ligador peptídico puede ser SEQ ID NO: 14. La secuencia del scFv puede comprender una o más modificaciones tal como se describe en la tabla 8 anterior.

Los polinucleótidos proporcionados en el presente documento pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican para moléculas de unión biespecíficas o fragmentos de las mismas, que se unen específicamente a HER2 y CD3, y comprenden una secuencia de aminoácidos tal como se describe en el presente documento, así como anticuerpos que compiten con tales moléculas de unión biespecíficas por unirse a HER2 y/o CD3, o que se une al mismo epítopo que el de tales anticuerpos.

La secuencia de la cadena ligera puede ser SEQ ID NO: 25. La secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena ligera puede ser SEQ ID NO: 24. La secuencia del scFv puede ser SEQ ID NO: 19. La secuencia de nucleótidos que codifica para el scFv puede ser SEQ ID NO: 18. La secuencia de la cadena ligera puede ser SEQ ID NO: 25 y la secuencia del scFv puede ser SEQ ID NO: 19. La secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena ligera puede ser SEQ ID NO: 24 y la secuencia de nucleótidos que codifica para el scFv puede ser SEQ ID NO: 18. La secuencia del polipéptido de fusión de cadena ligera puede ser SEQ ID NO: 29. La secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de fusión de cadena ligera puede ser SEQ ID NO: 28.

La molécula de unión biespecífica puede tener una secuencia derivada de trastuzumab que contiene una o más de las modificaciones en la inmunoglobulina trastuzumab, y puede tener una secuencia derivada de huOKT3 que contiene una o más de las modificaciones en las secuencias de V_H y V_L de huOKT3, tal como se describe en la tabla 8, a continuación. Las moléculas de unión biespecíficas que tienen otras secuencias de inmunoglobulina o scFv pueden contener mutaciones análogas en las posiciones correspondientes en estas otras secuencias de inmunoglobulina o scFv. La molécula de unión biespecífica puede (a) derivar de trastuzumab y huOKT3; y (b) puede contener una o más de las modificaciones descritas en la tabla 8 anterior. La secuencia del ligador peptídico que conjuga la cadena ligera de inmunoglobulina y el scFv puede ser tal como se describe en la tabla 1 anterior (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 o 35-41). La secuencia de la cadena pesada puede ser tal como se describe en la tabla 2 anterior (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 62 o 63). La secuencia de la cadena ligera puede ser tal como se describe en la tabla 3 anterior (por ejemplo, SEQ ID NO: 25). La secuencia del V_H del scFv puede ser tal como se describe en la tabla 4 anterior (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 17 o 64). La secuencia del V_L del

scFv puede ser tal como se describe en la tabla 5 anterior (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 16 o 65). La secuencia del ligador peptídico de scFv puede ser tal como se describe en la tabla 1 anterior (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 o 35-41). La secuencia del scFv puede ser tal como se describe en la tabla 6 anterior (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 19 o 48-59). La secuencia del polipéptido de fusión de cadena ligera puede ser tal como se describe en la tabla 7 anterior (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 34, 42-47 o 60).

Un polinucleótido tal como se proporciona en el presente documento puede comprender secuencias de nucleótidos que codifican para la cadena pesada de un anticuerpo específico de HER2 descrito en la sección 0. La cadena pesada puede ser la cadena pesada de un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica tal como, por ejemplo, trastuzumab, M-111, pertuzumab, ertumaxomab, MDXH210, 2B1 y MM-302. El anticuerpo puede comprender el V_H de trastuzumab, en el que la secuencia de la cadena pesada es SEQ ID NO: 27. El anticuerpo puede comprender el V_H de trastuzumab, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena pesada es SEQ ID NO: 26. La secuencia de la cadena pesada puede comprender el V_H de trastuzumab y comprende la sustitución de aminoácidos N297A en la región Fc (SEQ ID NO: 26). La secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena pesada puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica para el V_H de trastuzumab y puede comprender la sustitución de aminoácidos N297A en la región Fc (SEQ ID NO: 26). La secuencia de la cadena pesada puede comprender la secuencia del V_H de trastuzumab y puede comprender la sustitución de aminoácidos K322A en la región Fc (SEQ ID NO: 27). La secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena pesada puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica para el V_H de trastuzumab y puede comprender la sustitución de aminoácidos K322A en la región Fc (SEQ ID NO: 26). La secuencia de la cadena pesada puede comprender la secuencia del V_H de trastuzumab y puede comprender las sustituciones de aminoácidos N297A y K322A en la región Fc (SEQ ID NO: 27). La secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena pesada puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica para el V_H de trastuzumab y puede comprender las sustituciones de aminoácidos N297A y K322A en la región Fc (SEQ ID NO: 26).

Los polinucleótidos proporcionados en el presente documento pueden obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos que codifica para una molécula de unión biespecífica o un fragmento de la misma descritos en el presente documento, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica para la molécula de unión biespecífica o un fragmento de la misma a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, tal como se describe en Kutmeier *et al.*, BioTechniques 17:242 (1994)) que, en resumen, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica para el anticuerpo, hibridación y ligamiento de esos oligonucleótidos, y luego amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

Alternativamente, puede generarse un polinucleótido que codifica para una molécula de unión biespecífica o un fragmento de la misma a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica para una molécula de unión biespecífica particular o un fragmento de la misma no está disponible, pero se conoce la secuencia de la molécula de unión biespecífica o el fragmento de la misma, puede sintetizarse químicamente un ácido nucleico que codifica para la molécula de unión biespecífica o el fragmento de la misma u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado de cualquier tejido o célula que exprese el anticuerpo, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo proporcionado en el presente documento) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que se hibridan con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia génica particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica para el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR pueden clonarse luego en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la sección 0.

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la molécula de unión biespecífica puede conocerse en la técnica. Un polipéptido que codifica para tal anticuerpo puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. y Ausubel *et al.*, Eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y.), para generar moléculas de unión biespecíficas que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, tales manipulaciones pueden realizarse para hacer que el aminoácido codificado esté aglicosilado, o para destruir la capacidad del anticuerpo para unirse al receptor de C1q, Fc, o para activar el sistema del complemento.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas proporcionadas en el presente documento pueden incluir moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés), opcionalmente con uno o más intrones, por ejemplo, pero sin limitarse a, al menos una porción especificada de al menos una región determinante de complementariedad (CDR), tal como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de al menos una cadena pesada o cadena ligera; moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia codificante de un anticuerpo anti-HER2 o región variable, un scFv anti-CD3 o un polipéptido de fusión de cadena sencilla; y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración

del código genético, todavía codifican para al menos una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento y/o tal como se conoce en la técnica.

También se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos aislados que se hibridan en condiciones de hibridación selectivas con un polinucleótido descrito en el presente documento. Por tanto, los polinucleótidos pueden usarse para aislar, detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden tales polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos proporcionados en el presente documento pueden usarse para identificar, aislar o amplificar clones de longitud completa o parcial en una biblioteca depositada. Los polinucleótidos pueden ser secuencias genómicas o de ADNc aisladas o complementarias de otro modo a un ADNc de una biblioteca de ácidos nucleicos de seres humanos o mamíferos.

Los ácidos nucleicos pueden comprender convenientemente secuencias además de un polinucleótido proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, puede insertarse un sitio de clonación múltiple que comprende uno o más sitios de restricción de endonucleasa en el ácido nucleico para ayudar en el aislamiento del polinucleótido. Además, pueden insertarse secuencias traducibles para ayudar en el aislamiento del polinucleótido traducido proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, una secuencia de marcador de hexahistidina proporciona un medio conveniente para purificar los polipéptidos proporcionados en el presente documento. El ácido nucleico proporcionado en el presente documento, excluyendo la secuencia codificante, es opcionalmente un vector, adaptador o ligador para la clonación y/o expresión de un polinucleótido proporcionado en el presente documento.

También pueden añadirse secuencias adicionales a tales secuencias de clonación y/o expresión para optimizar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar en el aislamiento del polinucleótido o para mejorar la introducción del polinucleótido en una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores y ligadores se conoce bien en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, citado anteriormente; o Sambrook, citado anteriormente).

Usando técnicas de ADN recombinante de rutina, una o más de las CDR de un anticuerpo descrito en el presente documento pueden insertarse dentro de las regiones de marco. Las regiones de marco pueden ser regiones de marco de consenso o que se producen de manera natural, y preferiblemente regiones de marco humanas (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998) para obtener una lista de regiones de marco humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones de marco y las CDR codifica para un anticuerpo que se une específicamente a HER2. Pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones de marco y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, tales métodos pueden usarse para realizar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Se proporcionan en el presente documento otras alteraciones del polinucleótido y están dentro del conocimiento de la técnica.

La molécula de ácido nucleico aislada o purificada, o un fragmento de la misma, tras la unión con otra molécula de ácido nucleico, puede codificar para una proteína de fusión. La generación de proteínas de fusión está dentro de los conocimientos habituales en la técnica y puede implicar el uso de enzimas de restricción o técnicas de clonación recombinacional (véase, por ejemplo, Gateway.TM. (Invitrogen)). Véase, además, la patente estadounidense n.º 5.314.995.

Un polinucleótido proporcionado en el presente documento puede estar en forma de un vector (por ejemplo, vector de expresión) tal como se describe en la sección 0.

5.3.2 CÉLULAS Y VECTORES

Se proporcionan en el presente documento células (por ejemplo, células *ex vivo*) que expresan (por ejemplo, de manera recombinante) moléculas de unión biespecíficas tal como se describe en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden secuencias de nucleótidos (véase, por ejemplo, la sección 0) que codifican para una molécula de unión biespecífica o un fragmento de la misma descritos en el presente documento para la expresión recombinante en células huésped, preferiblemente en células de mamífero. También se proporcionan en el presente documento células (por ejemplo, células *ex vivo*) que comprenden tales vectores o secuencias de nucleótidos para expresar de manera recombinante una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento métodos para producir una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento, que comprenden expresar tal molécula de unión biespecífica a partir de una célula (por ejemplo, célula *ex vivo*). La célula puede ser una célula *ex vivo*.

Un vector (por ejemplo, un vector de expresión) es una molécula de ADN que comprende un gen que se expresa en una célula (por ejemplo, célula *ex vivo*). Normalmente, la expresión génica se coloca bajo el control de determinados elementos reguladores, incluyendo promotores constitutivos o inducibles, elementos reguladores específicos de tejido y potenciadores. Se dice que tal gen está "operativamente unido a" los elementos reguladores, por ejemplo, un promotor. Un huésped recombinante puede ser cualquier célula procariota o eucariota que contenga un vector de clonación o un vector de expresión. Este término también incluye aquellas células procariotas o eucariotas, así como un animal transgénico, que se han modificado genéticamente para contener el/los gen(es) clonado(s) en el cromosoma

o genoma de la célula huésped o células de las células huésped (por ejemplo, células *ex vivo*).

El promotor puede ser el promotor de CMV.

Se proporciona en el presente documento un vector que puede comprender uno o más polinucleótidos tal como se describe en la sección 0.

5 Un polinucleótido tal como se describe en la sección 0 puede clonarse en un vector adecuado y puede usarse para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. El experto en la técnica conoce vectores y métodos para construir tales vectores y se describen en referencias técnicas generales (véase, en general, "Recombinant DNA Part D," Methods in Enzymology, Vol. 153, Wu and Grossman, eds., Academic Press (1987)). El vector puede comprender
10 secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicas para el tipo de huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta, insecto o mamífero) en el que se introducirá el vector, según corresponda y teniendo en cuenta si el vector es ADN o ARN. El vector puede comprender secuencias reguladoras que son específicas para el género del huésped. El vector puede comprender secuencias reguladoras que son específicas para la especie del huésped.

15 El vector puede comprender uno o más genes marcadores, que permiten la selección de huéspedes transformados o transfectados. Los ejemplos no limitativos de genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un huésped auxótrofo para proporcionar prototrofia, y similares. El vector puede comprender marcadores seleccionables de ampicilina e higromicina.

20 Un vector de expresión puede comprender un promotor nativo o normativo operativamente unido a un polinucleótido tal como se describe en la sección 0. La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos del desarrollo, está dentro del conocimiento de la técnica. De manera similar, la combinación de una molécula de ácido nucleico, o un fragmento de la misma, tal como se describió anteriormente con un promotor, también está dentro del conocimiento de la técnica.

25 Los ejemplos no limitativos de vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para propagación y expansión o para expresión o ambos. Por ejemplo, puede seleccionarse un vector de clonación del grupo que consiste en la serie pUC, la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), La serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, California). También pueden usarse vectores de bacteriófagos, tales como lamda-GT10, lamda-GT11, lamda-ZapII (Stratagene), lamda-EMBL4 y lamda-NM1149. Los ejemplos no limitativos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI110, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos no limitativos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-C1, pMAM y pMAMneo (Clontech). El sistema de clonación TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California) también puede usarse según las recomendaciones del fabricante.

35 El vector puede ser un vector de mamífero. El vector de mamífero puede contener al menos un elemento promotor, que media en la iniciación de la transcripción de ARNm, la secuencia codificante de la molécula de unión inespecífica y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y poliadenilación del transcrito. El vector de mamífero puede contener elementos adicionales tales como, por ejemplo, potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donadores y aceptores para el corte y empalme de ARN. Puede lograrse una transcripción altamente eficiente, por ejemplo, con los promotores de expresión temprana y tardía de SV40, las repeticiones terminales largas (LTRS) de retrovirus, por ejemplo, VSR, VLTH1, VIH1 y el promotor de expresión temprana de citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden usarse elementos celulares (por ejemplo, el
40 promotor de actina humana). Los ejemplos no limitativos de vectores de expresión de mamíferos incluyen vectores tales como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN o pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA3.1/Zeo (+/-) o pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL y PMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12M1 (ATCC 67109). Los ejemplos no limitativos de células huésped de mamíferos que pueden usarse en combinación con tales vectores de mamíferos incluyen células humanas Hela 293, H9 y Jurkat, células NIH3T3 y C127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV 1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

45 El vector puede ser un vector viral, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores basados en parvovirus, por ejemplo, vectores basados en virus adenoasociado (VAA), vectores quiméricos adenovirales de VAA y vectores basados en adenovirus, y vectores lentivirales, tales como vectores basados en el herpes simple (VHS). El vector viral puede manipularse para hacer que la replicación del virus sea deficiente. El vector viral puede manipularse para eliminar la toxicidad para el huésped. Estos vectores virales pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (1994).

55 Un vector o polinucleótido descrito en el presente documento puede transferirse a una célula (por ejemplo, una célula *ex vivo*) mediante técnicas convencionales y la célula resultante puede cultivarse mediante técnicas convencionales para producir una molécula de unión inespecífica descrita en el presente documento. Por consiguiente, se proporcionan en el presente documento células que comprenden un polinucleótido que codifica para una molécula de

unión biespecífica o un fragmento de la misma, una cadena pesada o ligera de la misma, o un polipéptido de fusión de cadena ligera del mismo, operativamente unido a un promotor para la expresión de tales secuencias en la célula huésped. Un vector que codifica para la cadena pesada puede unirse operativamente a un promotor y un vector que codifica para el polipéptido de fusión de cadena ligera puede unirse operativamente a un promotor y pueden coexpresarse en la célula para la expresión de la molécula de unión biespecífica completa, tal como se describe a continuación. Una célula puede comprender un vector que comprende un polinucleótido que codifica tanto para el polipéptido de fusión de cadena pesada como de cadena ligera de una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento unida operativamente a un promotor. Una célula puede comprender dos vectores diferentes, un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica para una cadena pesada unida operativamente a un promotor, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica para un polipéptido de fusión de cadena ligera operativamente unido a un promotor. Una primera célula puede comprender un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica para una cadena pesada de una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento, y una segunda célula comprende un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica para un polipéptido de fusión de cadena ligera de una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento. Se proporciona en el presente documento una mezcla de células que comprenden tal primera célula y tal segunda célula. La célula puede expresar el vector o los vectores de tal manera que el oligonucleótido sea tanto transcrito como traducido de manera eficiente por la célula.

La célula puede expresar el vector, de tal manera que el oligonucleótido, o fragmento del mismo, sea tanto transcrito como traducido de manera eficiente por la célula.

La célula proporcionada en el presente documento puede estar presente en un huésped, que puede ser un animal, tal como un mamífero. Los ejemplos de células incluyen, pero no se limitan a, una célula humana, una línea celular humana, *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* TB-1, TG-2, DH5a, XL-Blue MRF' (Stratagene), SA2821 y Y1090), *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *N. crassa*, células de insectos (por ejemplo, Sf9, Ea4) y otras expuestas a continuación. La célula puede ser una célula CHO. La célula puede ser una célula CHO-S.

Un polinucleótido descrito en el presente documento puede expresarse en una línea celular estable que comprende el polinucleótido integrado en un cromosoma mediante la introducción del polinucleótido en la célula. El polinucleótido puede introducirse en la célula mediante, por ejemplo, electroporación. El polinucleótido puede introducirse en la célula mediante, por ejemplo, la transfección de un vector que comprende el polinucleótido en la célula. El vector puede cotransfectarse con un marcador seleccionable tal como DHFR, GPT, neomicina o higromicina para permitir la identificación y el aislamiento de las células transfectadas. El polinucleótido transfectado también puede amplificarse para expresar grandes cantidades de la molécula de unión biespecífica codificada. Por ejemplo, el marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) puede utilizarse para desarrollar líneas celulares que porten varios cientos o incluso varios miles de copias del polinucleótido de interés. Otro ejemplo de marcador de selección es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy *et al.*, Biochem. J. 227:277-279 (1991).; Bebbington *et al.*, Bio/Technology 10:169-175 (1992)). Usando estos marcadores, las células se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen el/los gen(es) amplificado(s) integrado(s) en un cromosoma. Las células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO se usan a menudo para la producción de moléculas de unión biespecíficas.

El vector puede comprender (i) una primera secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido de fusión de cadena ligera que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina fusionada a un scFv, a través de un ligador peptídico, en el que la cadena ligera se une a HER2 y en el que el scFv se une a CD3, operativamente unido a un primer promotor y (ii) un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada de inmunoglobulina que se une a HER2 operativamente unido a un segundo promotor. El vector puede ser un vector viral.

5.4 CÉLULAS T UNIDAS A MOLÉCULAS DE UNIÓN BIESPECÍFICAS

Sin querer vincularse a ninguna teoría, se cree que cuando las moléculas de unión biespecíficas proporcionadas en el presente documento se unen a células T mediante, por ejemplo, procedimientos tales como los descritos en el presente documento, un scFv anti-CD3 de la molécula de unión biespecífica se une a CD3 en la superficie de la célula T. Sin querer vincularse a ninguna teoría, se cree que la unión de la molécula de unión biespecífica a la célula T (es decir, unión de un scFv anti-CD3 a CD3 expresado en la célula T) activa la célula T y, por consiguiente, permite que la citotoxicidad basada en el receptor de células T se redirija a las dianas tumorales deseadas, sorteando las restricciones de CMH.

Por tanto, también se proporcionan células T que se unen a una molécula de unión biespecífica de la invención (por ejemplo, tal como se describe en la sección 0 y la sección 0). Las células T pueden unirse a la molécula de unión biespecífica de manera no covalente. Las células T pueden ser autólogas de un sujeto al que van a administrarse las células T. Las células T pueden ser alogénicas para un sujeto al que van a administrarse las células T. Las células T pueden ser células T humanas.

Las células T que se unen a moléculas de unión biespecíficas pueden usarse según los métodos descritos en la sección 0. Las células T que se unen a moléculas de unión biespecíficas pueden usarse como parte de una terapia de combinación tal como se describe en la sección 0.

5.5 COMPOSICIONES Y KITS FARMACÉUTICOS

Se proporcionan en el presente documento composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) y kits que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión biespecíficas tal como se describe en la sección 0 o la sección 0. Las composiciones pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias individuales. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden formularse para administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intraceliaca, intracerebelosa, intracerebroventricular, intraventricular tipo Ommaya, intraocular, intravítrea, intracárdica, intracolónica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, intratecal, intraventricular en el cerebro, intraparenquimatosa en el cerebro o transdérmica. La composición puede formularse para administración parenteral. La composición puede formularse para administración intravenosa. La composición puede formularse para administración intraperitoneal. La composición puede formularse para administración intraperitoneal para tratar metástasis peritoneales. La composición puede formularse para administración intratecal. La composición puede formularse para administración intratecal para tratar metástasis cerebrales. Véase, por ejemplo, Kramer *et al.*, 2010, 97: 409-418. La composición puede formularse para administración intraventricular en el cerebro. La composición puede formularse para administración intraventricular para tratar metástasis cerebrales. Véase, por ejemplo, Kramer *et al.*, 2010, 97: 409-418. La composición puede formularse para administración intraparenquimatosa en el cerebro. La composición puede formularse para la administración intraparenquimatosa para tratar un tumor cerebral o metástasis de un tumor cerebral. Véase, por ejemplo, Luther *et al.*, 2014, Neuro Oncol, 16: 800-806 e ID de ensayo clínico NO NCT01502917.

La composición puede formularse para administración intraperitoneal para metástasis peritoneales.

Se proporciona en el presente documento una composición que puede comprender uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento. Se proporciona en el presente documento una composición que puede comprender una célula, en la que la célula comprende uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento. Se proporciona en el presente documento una composición que puede comprender un vector, en la que el vector comprende uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento. Se proporciona en el presente documento una composición que puede comprender una célula, en la que la célula comprende un vector, en la que el vector comprende uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento.

Una composición descrita en el presente documento puede ser una formulación estable o con conservantes. La formulación estable puede comprender un tampón fosfato con solución salina o una sal elegida. Una composición descrita puede ser una formulación con conservantes para múltiples usos, adecuada para uso farmacéutico o veterinario. Una composición descrita en el presente documento puede comprender un conservante. Los conservantes se conocen por los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de conservantes incluyen fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito de fenilmercurio, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidratado), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo, y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Puede usarse cualquier concentración o mezcla adecuada tal como se conoce en la técnica, tal como el 0,001-5 %, o cualquier intervalo o valor en los mismos tal como, pero sin limitarse a, el 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, el 4,9 o cualquier intervalo o valor en los mismos. Los ejemplos no limitativos incluyen, sin conservante, el 0,1-2 % de m-cresol (por ejemplo, el 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0 %), el 0,1-3 % de alcohol bencílico (por ejemplo, el 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5 %), el 0,001-0,5 % de timerosal (por ejemplo, el 0,005, 0,01), el 0,001-2,0 % de fenol (por ejemplo, el 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0 %), el 0,0005-1,0 % de alquilparabeno(s) (por ejemplo, el 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0 %), y similares.

A veces puede ser deseable administrar las composiciones proporcionadas en el presente documento a un sujeto durante periodos de tiempo prolongados, por ejemplo, durante periodos de una semana a un año o más a partir de una única administración. Pueden usarse diversas formas de dosificación de liberación lenta, depósito o implante. Por ejemplo, una forma de dosificación puede contener una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de los compuestos que tiene un bajo grado de solubilidad en líquidos corporales, por ejemplo, (a) una sal de adición de ácido con un ácido polibásico tal como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pámico, ácido algínico, ácido poliglútamico, ácidos naftaleno-mono o disulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; (b) una sal con un catión de metal polivalente tal como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, y similares, o con un catión orgánico formado a partir de, por ejemplo, N,N'-dibencil-etilendiamina o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b), por ejemplo, una sal de tanato de zinc. Además, una composición proporcionada en el presente documento, preferiblemente una sal relativamente insoluble tal como las que acaban de describirse, puede formularse en un gel, por ejemplo, un gel de monoestearato de aluminio con, por ejemplo, aceite de sésamo, adecuado

para inyección. Las sales particularmente preferidas son las sales de zinc, las sales de tanato de zinc, las sales de pamoato, y similares. Otro tipo de formulación de depósito de liberación lenta para inyección contendría el compuesto o la sal dispersos para encapsularlos en un polímero no antigénico, no tóxico y de degradación lenta, tal como un polímero de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico), por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 3.773.919. Los compuestos o, preferiblemente, sales relativamente insolubles tales como las descritas anteriormente también pueden formularse en microgránulos de Silastic de matriz de colesterol, particularmente para su uso en animales. Se conocen composiciones de liberación lenta, depósito o implante adicionales, por ejemplo liposomas gaseosos o líquidos, en la bibliografía (la patente estadounidense n.º 5.770.222 y "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

El intervalo de al menos una composición de molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento incluye cantidades que producen tras su reconstitución, si se encuentra en un sistema húmedo/seco, concentraciones de desde aproximadamente 1,0 microgramos/ml hasta aproximadamente 1000 mg/ml, aunque puede funcionar con concentraciones mayores y menores y dependen del vehículo de administración pretendido, por ejemplo, las formulaciones en disolución diferirán de los métodos de parche transdérmico, pulmonares, transmucosos u osmóticos o de microbomba.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden comprender al menos uno de cualquier agente auxiliar adecuado tal como, pero sin limitarse a, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservantes, adyuvantes, o similares. Pueden preferirse los agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitativos y los métodos de preparación de tales disoluciones estériles se conocen bien en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990. Pueden seleccionarse de manera rutinaria portadores farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para el modo de administración, la solubilidad y/o estabilidad de la molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener uno o más excipientes y/o aditivos farmacéuticos. Los ejemplos no limitativos de excipientes y aditivos farmacéuticos son proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono (por ejemplo, azúcares, incluidos monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados, y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes individualmente o en combinación, comprendiendo solos o en combinación el 1-99,99 % en peso o volumen. Los ejemplos no limitativos de excipientes proteicos incluyen albúmina sérica tal como albúmina sérica humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, y similares. Los ejemplos no limitativos de componentes de aminoácidos/anticuerpos, que también pueden funcionar en una capacidad tamponante, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares. El aminoácido puede ser glicina. Los ejemplos no limitativos de excipientes de hidratos de carbono incluyen monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, sorbitol de xilitol (glucitol), mioinositol, y similares. El excipiente de hidrato de carbono puede ser manitol, trehalosa o rafinosa.

Una composición proporcionada en el presente documento puede incluir uno o más tampones o un agente de ajuste del pH; normalmente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o una base orgánicos. Los ejemplos no limitativos de tampones incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; tampones Tris, clorhidrato de trometamina o fosfato. El tampón puede ser una sal de ácido orgánico tal como citrato. Pueden añadirse opcional y preferiblemente al diluyente otros excipientes, por ejemplo, agentes de isotonicidad, tampones, antioxidantes, potenciadores de conservantes. Un agente de isotonicidad, tal como glicerina, se usa comúnmente a concentraciones conocidas. Se añade preferiblemente un tampón fisiológicamente tolerado para proporcionar un control del pH mejorado. Las composiciones pueden cubrir un amplio intervalo de pH, tal como desde aproximadamente pH 4 hasta aproximadamente pH 10, e intervalos preferidos de desde aproximadamente pH 5 hasta aproximadamente pH 9, y el intervalo más preferido de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. Preferiblemente, las composiciones proporcionadas en el presente documento tienen un pH entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,8. Los tampones preferidos incluyen tampones fosfato, lo más preferiblemente fosfato de sodio, particularmente solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Una composición proporcionada en el presente documento puede incluir uno o más excipientes/aditivos poliméricos tales como, por ejemplo, polivinilpirrolidonas, los Ficoll (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y/o agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

Pueden añadirse opcionalmente a las composiciones otros aditivos, tales como solubilizadores farmacéuticamente aceptables como Tween 20 (monolaurato de polioxietileno (20)-sorbitano), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno (20)-sorbitano), Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitano), Pluronic F68 (copolímeros de bloque de

polioxietileno-polioxipropileno) y PEG (polietilenglicol) o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20 u 80 o poloxámero 184 o 188, Pluronic.RTM, polilos, otros copolímeros de bloque y quelantes tales como EDTA y EGTA, para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si se usa una bomba o un recipiente de plástico para administrar la composición. La presencia de tensioactivo farmacéuticamente aceptable mitiga la propensión a que la proteína se agregue.

El experto en la técnica conoce excipientes y/o aditivos farmacéuticos adicionales adecuados para su uso en una composición proporcionada en el presente documento y se hace referencia a los mismos, por ejemplo, en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), y en el "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998). Los materiales portadores o excipientes son hidratos de carbono (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y tampones (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos.

Preferiblemente, el diluyente acuoso opcionalmente comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. Los conservantes preferidos incluyen los seleccionados del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo, y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos. La concentración de conservante usada en la composición es una concentración suficiente para producir un efecto antimicrobiano. Tales concentraciones dependen del conservante seleccionado y el experto en la técnica las determina fácilmente.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden prepararse mediante un proceso que comprende mezclar al menos una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento y un conservante seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo, y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. La mezcla de la al menos una molécula de unión biespecífica y el conservante en un diluyente acuoso se lleva a cabo usando procedimientos de disolución y mezclado convencionales. Para preparar una composición adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos una molécula de unión biespecífica en disolución tamponada con el conservante deseado en una disolución tamponada en cantidades suficientes para proporcionar la molécula de unión biespecífica y el conservante a las concentraciones deseadas. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden prepararse mediante un proceso que comprende mezclar al menos una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento y un tampón seleccionado, preferiblemente un tampón fosfato que contiene solución salina o una sal elegida. El mezclado de la al menos una molécula de unión biespecífica y el tampón en un diluyente acuoso se lleva a cabo usando procedimientos de disolución y mezclado convencionales. Para preparar una composición adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos una molécula de unión biespecífica en agua o tampón con el agente tamponante deseado en agua en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el tampón a las concentraciones deseadas. Un experto en la técnica reconocerá variaciones de estos procesos. Por ejemplo, el orden en que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la composición, son todos factores que pueden optimizarse para la concentración y los medios de administración usados.

En realizaciones específicas de la divulgación que implican terapia de combinación con infusión de células T, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende (a) una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento (véase, por ejemplo, la sección 0 o 0); (b) células T; y/o (c) un portador farmacéuticamente eficaz. Las células T pueden ser autólogas para el sujeto al que se administran las células T. Las células T pueden ser alogénicas para el sujeto al que se administran las células T. Las células T pueden unirse a la molécula de unión biespecífica. La unión de las células T a la molécula de unión biespecífica puede ser no covalente. Las células T pueden ser células T humanas. Se conocen en la técnica métodos que pueden usarse para unir moléculas de unión biespecíficas a células T. Véanse, por ejemplo, Lum *et al.*, 2013, Biol Blood Marrow Transplant, 19:925-33, Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 5ª edición, Nueva York: Garland Science; Vaishampayan *et al.*, 2015, Prostate Cancer, 2015:285193 y Stromnes *et al.*, 2014, Immunol Rev. 257(1):145-164. Véase también, Vaishampayan *et al.*, 2015, Prostate Cancer, 2015:285193, que describe el siguiente método a modo de ejemplo, no limitativo, para unir moléculas de unión biespecíficas a células T:

Se recogen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para obtener linfocitos para la expansión de células T activadas a partir de 1 o 2 leucoféresis. Las PBMC se activan con, por ejemplo, 20 ng/ml de OKT3 y se expanden en 100 UI/ml de IL-2 para generar 40-320 mil millones de células T activadas durante un máximo de 14 días de cultivo en condiciones de BPF actuales tal como se describe en Ueda *et al.*, 1993, Transplantation, 56(2):351-356 y Uberti *et al.*, 1994, Clinical Immunology and Immunopathology, 70(3):234-240. Las células se cultivan en frascos con respiradero (bolsa de FEP tipo 750-Cl, American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD) en medio RPMI 1640 (Lonza) complementado con suero humano inactivado por calor combinado al 2 %. Las células T activadas se dividen aproximadamente cada 2-3 días según el recuento de células. Después de 14 días, las células T activadas se cultivan con 50 ng de una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento por 10⁶ células T activadas. A continuación, la mezcla se lava y se criopreserva.

Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede usarse según los métodos proporcionados en el presente documento (véase, por ejemplo, la sección 0).

5.5.1 FORMULACIONES PARENTERALES

Una composición proporcionada en el presente documento puede formularse para administración inyectable parenteral. Tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral" incluye intravenoso, intravascular, intramuscular, intradérmico, subcutáneo e intraocular. Para la administración parenteral, la composición puede formularse como una disolución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación, o proporcionarse por separado, con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Ejemplos no limitativos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, disolución de dextrosa, glicerol, etanol y albúmina sérica humana al 1-10 %. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas conocidas o adecuadas.

Se describen portadores farmacéuticos adecuados en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia habitual en este campo.

Las formulaciones para administración parenteral pueden contener como excipientes comunes agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y similares. Pueden prepararse suspensiones acuosas u oleosas para inyección usando un emulsionante o humidificador apropiado y un agente de suspensión, según métodos conocidos. Los agentes para inyección pueden ser un agente de dilución no tóxico, no administrable por vía oral, tal como una disolución acuosa o una disolución o suspensión inyectable estéril en un disolvente. Como vehículo o disolvente utilizable, se permiten agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, etc. como disolvente habitual, o disolvente de suspensión, puede usarse aceite no volátil estéril. Con estos propósitos, puede usarse cualquier clase de aceite no volátil y ácido graso, incluyendo aceites grasos o ácidos grasos naturales o sintéticos o semisintéticos; mono, di o tri-glicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. La administración parenteral se conoce en la técnica e incluye, pero no se limita a, medios convencionales de inyección, un dispositivo de inyección sin aguja presurizado con gas tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.851.198, y un dispositivo de perforador láser tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.839.446.

5.5.2 FORMULACIONES PULMONARES

Una composición que comprende una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento puede formularse para administración pulmonar. Para la administración pulmonar, la composición se administra en un tamaño de partícula eficaz para alcanzar las vías respiratorias bajas del pulmón o los senos paranasales. Las composiciones para administración pulmonar pueden administrarse mediante cualquiera de una variedad de dispositivos nasales o de inhalación conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos que pueden depositar formulaciones aerosolizadas en la cavidad sinusal o los alvéolos de un paciente incluyen inhaladores dosificadores, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores, y similares. También se conocen en la técnica otros dispositivos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento. Todos estos dispositivos usan formulaciones adecuadas para la administración para la dispensación de una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento en un aerosol. Tales aerosoles pueden estar compuestos por disoluciones (tanto acuosas como no acuosas) o partículas sólidas. Los inhaladores dosificadores, tales como el inhalador dosificador Ventolin®, usan normalmente un gas propulsor y requieren su accionamiento durante la inspiración (Véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/16970, WO 98/35888). Los inhaladores de polvo seco tales como Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), los dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, por nombrar algunos, usan el accionamiento de la respiración de un polvo mezclado (la patente estadounidense n.º 4.668.218 Astra, el documento EP 237507 Astra, el documento WO 97/25086 Glaxo, el documento WO 94/08552 Dura, la patente estadounidense n.º 5.458.135 Inhale, el documento WO 94/06498 Fisons). Los nebulizadores como el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt) y el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products) (la patente estadounidense n.º 5.404.871 Aradigm, el documento WO 97/22376), producen aerosoles a partir de disoluciones, mientras que los inhaladores dosificadores, los inhaladores de polvo seco, etc. generan aerosoles de partículas pequeñas. Tales ejemplos de dispositivos de inhalación disponibles comercialmente son ejemplos no limitativos que no pretenden ser limitativos en su alcance.

Una pulverización que comprende una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento puede producirse forzando una suspensión o disolución de al menos una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento a través de una boquilla a presión. El tamaño y la configuración de la boquilla, la presión aplicada y la velocidad de alimentación del líquido pueden elegirse para lograr la salida y el tamaño de partícula deseados. Puede producirse una electropulverización, por ejemplo, mediante un campo eléctrico en conexión con un capilar o una boquilla de alimentación. Ventajosamente, las partículas de una composición que comprende al menos una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento suministrada por un pulverizador tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 µm, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 5 µm, y lo más preferiblemente de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 3 µm.

Las formulaciones de una composición que comprenden al menos una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento adecuada para su uso con un pulverizador incluyen normalmente la al menos una molécula de unión biespecífica en una disolución acuosa a una concentración de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg por ml de disolución o mg/g, o cualquier intervalo o valor en los mismos, por ejemplo, pero sin limitarse a, 0,1,

0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/ml o mg/g. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un tensioactivo y, preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de la composición de la molécula de unión biespecífica, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína a granel o un hidrato de carbono. Las proteínas a granel útiles para formular tal composición incluyen albúmina, protamina, o similar. Los hidratos de carbono típicos útiles en la formulación de proteínas de composición de anticuerpos incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similar. La composición también puede incluir un tensioactivo, que puede reducir o impedir la agregación de la composición inducida por la superficie provocada por la atomización de la disolución al formar un aerosol. Pueden emplearse diversos tensioactivos convencionales, tales como alcoholes y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno-sorbitol. Las cantidades oscilarán generalmente entre el 0,001 y el 14 % en peso de la formulación. Los tensioactivos preferidos son monooleato de polioxietileno-sorbitano, polisorbato 80, polisorbato 20, o similar.

La composición puede administrarse mediante un nebulizador, tales como un nebulizador de chorro o un nebulizador ultrasónico. Normalmente, en un nebulizador de chorro, se usa una fuente de aire comprimido para crear un chorro de aire de alta velocidad a través de un orificio. A medida que el gas se expande más allá de la boquilla, se crea una región de baja presión, que extrae una disolución de proteína de composición de anticuerpo a través de un tubo capilar conectado a un depósito de líquido. La corriente de líquido desde el tubo capilar se corta en filamentos inestables y gotitas a medida que sale del tubo, creando el aerosol. Puede emplearse una variedad de configuraciones, velocidades de flujo y tipos de deflectores para lograr las características de rendimiento deseadas de un nebulizador de chorro dado. En un nebulizador ultrasónico, se usa energía eléctrica de alta frecuencia para crear energía mecánica vibratoria, empleando normalmente un transductor piezoeléctrico. Esta energía se transmite a la formulación de la proteína de composición de anticuerpo o bien directamente o bien mediante un fluido de acoplamiento, creando un aerosol que incluye la proteína de composición de anticuerpo. Ventajosamente, las partículas de proteína de composición de anticuerpo administradas por un nebulizador tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 μm , preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm , y lo más preferiblemente de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 3 μm .

La composición puede administrarse a través de un inhalador dosificador (MDI, *metered dose inhaler*), en el que un propulsor, al menos una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento y cualquier excipiente u otros aditivos están contenidos en un bote como una mezcla que incluye un gas comprimido licuado. El accionamiento de la válvula dosificadora libera la mezcla en forma de aerosol, que contiene preferiblemente partículas en el intervalo de tamaño de menos de aproximadamente 10 μm , preferiblemente de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm , y lo más preferiblemente de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 3 μm . El tamaño de partícula de aerosol deseado puede obtenerse empleando una formulación de proteína de composición de anticuerpo producida mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo molienda por chorro, secado por pulverización, condensación de punto crítico, o similar. Los inhaladores dosificadores preferidos incluyen los fabricados por 3M o Glaxo y que emplean un propulsor de hidrofluorocarbono.

Las formulaciones de una molécula de unión biespecífica descritas en el presente documento para su uso con un dispositivo de inhalador dosificador incluirán generalmente un polvo finamente dividido que contiene al menos un anticuerpo anti-IL-6 como una suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, en suspensión en un propulsor con la ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado con este propósito, tal como clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFAI-134a (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227), o similar. Preferiblemente, el propulsor es un hidrofluorocarbono. El tensioactivo puede elegirse para estabilizar la al menos una molécula de unión biespecífica como una suspensión en el propulsor, para proteger al principio activo frente a la degradación química, y similares. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitano, lecitina de soja, ácido oleico, o similar. En algunos casos, se prefieren los aerosoles de disolución que usan disolventes tales como etanol. También pueden incluirse en la formulación agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína.

5.5.3 FORMULACIONES ORALES

Una composición proporcionada en el presente documento puede formularse para administración oral. Para la administración oral, las composiciones y los métodos de administración de al menos una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento se basan en la coadministración de adyuvantes tales como, por ejemplo, resorcinoles y tensioactivos no iónicos tales como oleil éter de polioxietileno y éter de n-hexadecilpolietileno, para aumentar artificialmente la permeabilidad de las paredes intestinales, así como la coadministración de inhibidores enzimáticos tales como, por ejemplo, inhibidores de tripsina pancreática, fluorofosfato de diisopropilo (DFF) y Trasyolol, para inhibir la degradación enzimática. El compuesto constituyente activo de la forma de dosificación de tipo sólido para administración oral puede mezclarse con al menos un aditivo, incluyendo sacarosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, dextrano, almidones, agar, arginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábiga, gelatina, colágeno, caseína, albúmina, polímero sintético o semisintético y glicérido. Estas formas de dosificación también pueden contener otro(s) tipo(s) de aditivos tales como, por ejemplo, agente diluyente inactivo, lubricante tal como estearato de magnesio, parabeno, agente conservante tal como ácido sórbico, ácido ascórbico,

alfa-tocoferol, antioxidante tal como cisteína, disgregador, aglutinante, espesante, agente tamponante, agente edulcorante, agente saborizante, agente perfumante, etc.

Los comprimidos y las pastillas para administración oral pueden procesarse adicionalmente en preparaciones con recubrimiento entérico. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden incluir, por ejemplo, preparaciones en emulsión, jarabe, elixir, suspensión y disolución permitidas para uso médico. Estas preparaciones pueden contener agentes diluyentes inactivos usados habitualmente en dicho campo, por ejemplo, agua. Las preparaciones de liposomas pueden utilizarse para preparaciones de administración oral, por ejemplo, tal como se describe para insulina y heparina (la patente estadounidense n.º 4.239.754). Además, pueden utilizarse microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mixtos (proteínoides) en la administración oral de productos farmacéuticos, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.925.673. Además, se usan compuestos portadores, tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 5.879.681 y la patente estadounidense n.º 5.871.753, en la administración oral de agentes biológicamente activos.

5.5.4 FORMULACIONES MUCOSAS

Una composición proporcionada en el presente documento puede formularse para su absorción a través de superficies mucosas. Para la absorción a través de superficies mucosas, las composiciones y los métodos de administración de al menos una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento pueden incluir una emulsión que comprende una pluralidad de partículas submicrométricas, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo y una fase acuosa continua, que fomenta la absorción a través de superficies mucosas logrando la mucoadhesión de las partículas de la emulsión (la patente estadounidense n.º 5.514.670). Las superficies mucosas adecuadas para la aplicación de las emulsiones proporcionadas en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, vías de administración corneal, conjuntival, bucal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar, estomacal, intestinal y rectal. Las formulaciones para administración vaginal o rectal, por ejemplo, supositorios, pueden contener como excipientes, por ejemplo, polialquilenglicoles, vaselina, manteca de cacao, y similares. Las formulaciones para administración intranasal pueden ser sólidas y contener como excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser disoluciones acuosas u oleosas de gotas nasales. Para la administración bucal, los excipientes incluyen, por ejemplo, azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado, y similares (la patente estadounidense n.º 5.849.695).

5.5.5 FORMULACIONES TRANSDÉRMICAS

Una composición proporcionada en el presente documento puede formularse para administración transdérmica. Para la administración transdérmica, la composición puede comprender al menos una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento encapsulada en un dispositivo de administración tal como, por ejemplo, un liposoma o nanopartículas poliméricas, micropartículas, microcápsulas o microesferas (denominadas colectivamente micropartículas a menos que se indique lo contrario). Se conocen varios dispositivos adecuados para la administración transdérmica, incluyendo micropartículas compuestas por polímeros sintéticos tales como polihidroxiácidos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y copolímeros de los mismos, poliortoésteres, polianhídridos y polifosfacenos, y polímeros naturales tales como colágeno, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos, y combinaciones de los mismos (la patente estadounidense n.º 5.814.599).

5.5.6 KITS

Se proporcionan en el presente documento kits que comprenden una o más moléculas de unión biespecíficas tal como se describe en el presente documento, o una o más composiciones tal como se describe en el presente documento. El kit puede comprender material de envasado y al menos un vial que comprende una composición que comprende una molécula de unión biespecífica o composición descrita en el presente documento. El vial puede comprender una disolución de al menos una molécula de unión biespecífica o composición tal como se describe en el presente documento con los tampones y/o conservantes prescritos, opcionalmente en diluyentes acuosos. El material de envasado puede comprender una etiqueta que indique que tal disolución puede conservarse durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o más. El kit puede comprender dos viales. El primer vial comprende al menos una molécula de unión biespecífica o composición liofilizada tal como se describe en el presente documento y el segundo vial comprende diluyentes acuosos de tampón o conservante prescrito. El material de envasado puede comprender una etiqueta que indique a un sujeto que reconstituya la al menos una molécula de unión biespecífica liofilizada en los diluyentes acuosos para formar una disolución que puede conservarse durante un periodo de veinticuatro horas o más. El material de envasado comprende una etiqueta que indica que tal disolución puede conservarse durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o más.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden proporcionarse a un sujeto como disoluciones o como viales duales que comprenden un vial de al menos una molécula de unión biespecífica o composición liofilizada que se reconstituye con un segundo vial que contiene agua, un conservante y/o excipientes, preferiblemente un tampón fosfato y/o solución salina y una sal elegida, en un diluyente acuoso. Puede reutilizarse varias veces o bien un vial de disolución única o bien un vial dual que requiere reconstitución y puede ser suficiente para uno o varios ciclos de tratamiento del sujeto y, por tanto, puede proporcionar un régimen de tratamiento más conveniente que el disponible actualmente.

Un kit que comprende una molécula de unión biespecífica o composición descrita en el presente documento puede ser útil para la administración durante un periodo de inmediatamente a veinticuatro horas o más. Por consiguiente, el kit ofrece ventajas significativas para el paciente. Un kit que comprende una molécula de unión biespecífica o composición descrita en el presente documento opcionalmente puede almacenarse de manera segura a temperaturas de desde aproximadamente 2 °C hasta aproximadamente 40 °C y retener la actividad biológica de la proteína durante periodos de tiempo prolongados, lo que permite una etiqueta del paquete que indique que la disolución puede conservarse y/o usarse durante un periodo de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 o 96 horas o más. El kit puede comprender un

Si se usa un diluyente con conservantes, tal etiqueta puede incluir un uso de hasta 1-12 meses, medio, uno y medio y/o dos años.

Los kits pueden proporcionarse indirectamente a un sujeto, tal como un sujeto tal como se describe en la sección 0, proporcionándose a farmacias, clínicas u otras instituciones e instalaciones similares, disoluciones o viales duales que comprenden un vial de al menos una molécula de unión biespecífica o composición liofilizada que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. En este caso, la disolución puede tener un tamaño de hasta un litro o incluso mayor, lo que proporciona un depósito grande del que pueden recuperarse porciones más pequeñas de la al menos una disolución de anticuerpo una o varias veces para transferirlas a viales más pequeños y proporcionarlas la farmacia o clínica a sus clientes y/o pacientes.

Los dispositivos reconocidos que comprenden estos sistemas de un único vial incluyen los dispositivos inyectores de pluma para la administración de una disolución tales como BD Pens (plumas de BD), BD Autojector®, Humaject®, por ejemplo, tal como se fabrican o desarrollan por Becton Dickensen (Franklin Lakes, N.J.), Disetronic (Burgdorf, Suiza; Bioject, Portland, Oreg.; National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, R.U.), Medi-Ject Corp (Mineápolis, Minn). Los dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de vial dual incluyen aquellos sistemas de inyector de pluma para reconstituir un fármaco liofilizado en un cartucho para la administración de la disolución reconstituida, tal como HumatroPen®.

Los kits pueden comprender material de envasado. El material de envasado puede proporcionar, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones en las cuales puede usarse el producto. El material de envasado proporciona instrucciones al sujeto para reconstituir la al menos una molécula de unión biespecífica en el diluyente acuoso para formar una disolución y para usar la disolución a lo largo de un periodo de 2-24 horas o más para el producto húmedo/seco en dos viales. Para el producto en disolución de vial único, la etiqueta indica que tal disolución puede usarse a lo largo de un periodo de 2-24 horas o más. El kit es útil para el uso de productos farmacéuticos en seres humanos. El kit puede ser útil para uso farmacéutico veterinario. El kit puede ser útil para el uso de productos farmacéuticos en cánidos. El kit puede resultar útil para la administración intravenosa. El kit puede ser útil para administración intraperitoneal, intratecal, intraventricular en el cerebro o intraparenquimatosa en el cerebro.

5.6 USOS Y MÉTODOS

5.6.1 USOS TERAPÉUTICOS

Se proporcionan en el presente documento métodos para tratar una célula cancerosa positiva para HER2 en un sujeto que comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión biespecífica tal como se describe en la sección 0 o en la sección 0, una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula, un polinucleótido o vector que codifica para tal molécula de unión biespecífica tal como se describe en la sección 0, o una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica tal como se describe en la sección 0, o una cantidad terapéuticamente eficaz de células T unidas a una molécula de unión biespecífica tal como se describe en la sección 0. El sujeto puede ser un sujeto tal como se describe en la sección 0. La molécula de unión biespecífica puede administrarse en una dosis tal como se describe en la sección 0. La molécula de unión biespecífica puede administrarse según los métodos descritos en la sección 0. La molécula de unión biespecífica puede administrarse por vía intravenosa. La molécula de unión biespecífica puede administrarse por vía intratecal, por vía intraventricular en el cerebro, por vía intraparenquimatosa en el cerebro o por vía intraperitoneal. La molécula de unión biespecífica puede administrarse en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales tal como se describe en la sección 0.

Se proporcionan en el presente documento métodos para tratar una célula cancerosa positiva para HER2 en un sujeto que comprenden administrar al sujeto que lo necesita una composición farmacéutica tal como se describe en la sección 0 o en la sección 0. La composición farmacéutica puede ser una composición tal como se describe en la sección 0. El sujeto puede ser un sujeto tal como se describe en la sección 0. La composición farmacéutica puede administrarse en una dosis tal como se describe en la sección 0. La composición farmacéutica puede administrarse según los métodos descritos en la sección 0. La composición farmacéutica puede administrarse por vía intravenosa. La molécula de unión biespecífica puede administrarse por vía intratecal, por vía intraventricular en el cerebro, por vía intraparenquimatosa en el cerebro o por vía intraperitoneal. La composición farmacéutica puede administrarse en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales tal como se describe en la sección 0.

Para el uso de una molécula de unión biespecífica en un sujeto de una especie particular, se usa una molécula de

unión biespecífica que se une al HER2 y al CD3 de esa especie en particular. Por ejemplo, para tratar a un ser humano, la molécula de unión biespecífica comprende un anticuerpo monoclonal aglicosilado que es una inmunoglobulina que se une a HER2 humano, que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión de cadena ligera, y en la que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión de cadena ligera, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos y (ii) se unen a CD3 humano, y en la que los polipéptidos de fusión de cadena ligera primero y segundo son idénticos. En otro ejemplo, para tratar a un cánido, la molécula de unión biespecífica comprende un anticuerpo monoclonal aglicosilado que es una inmunoglobulina que se une a HER2 de cánido, que comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión de cadena ligera, y en la que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión de cadena ligera, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos, y (ii) se unen a CD3 de cánido, y en la que los polipéptidos de fusión de cadena ligera primero y segundo son idénticos. Las moléculas de unión biespecíficas que tienen reactividad cruzada con HER2 y/o CD3 de diversas especies pueden usarse para tratar sujetos en esas especies. Por ejemplo, se espera que trastuzumab se una a HER2 tanto humano como de cánido debido a la conservación relativa del epítipo en HER2 reconocido por trastuzumab. Véase, también, por ejemplo, Singer *et al.*, 2012, *Mol Immunol*, 50: 200-209.

Además, para el uso de una molécula de unión biespecífica en un sujeto de una especie particular, la molécula de unión biespecífica, preferiblemente, la región constante de la porción de inmunoglobulina, se deriva de esa especie particular. Por ejemplo, para tratar a un ser humano, la molécula de unión biespecífica puede comprender un anticuerpo monoclonal aglicosilado que es una inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina comprende una región constante humana. En otro ejemplo, para tratar un cánido, la molécula de unión biespecífica puede comprender un anticuerpo monoclonal aglicosilado que es una inmunoglobulina, en la que la inmunoglobulina comprende una región constante de cánido. Cuando se trata a un ser humano, la inmunoglobulina puede humanizarse. El sujeto puede ser un cánido.

El cáncer positivo para HER2 puede ser cáncer de mama, cáncer gástrico, un osteosarcoma, cáncer desmoplásico de células redondas pequeñas, carcinoma de células escamosas de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, adenocarcinoma de la unión gástrica, adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, cáncer de cuello uterino, cáncer de glándulas salivales, sarcoma de tejidos blandos, leucemia, melanoma, sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, neuroblastoma o cualquier otro tejido neoplásico que exprese el receptor HER2.

La célula cancerosa positiva para HER2 puede ser resistente al tratamiento con trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib o cualquier otra molécula pequeña o anticuerpo que se dirija a la familia HER de receptores. El tumor puede ser resistente al tratamiento con trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib o cualquier otra molécula pequeña o anticuerpo que se dirija a la familia HER de receptores y responda al tratamiento con una molécula de unión biespecífica a la invención.

El tratamiento puede ser para lograr resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyendo, pero sin limitarse a, el alivio de un síntoma, la disminución de la extensión de una enfermedad, la estabilización (es decir, que no empeora) del estado de una enfermedad, el retardo o la desaceleración de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "tratamiento" también puede ser prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

5.6.2 USOS DE DIAGNÓSTICO

Las moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento pueden usarse con propósitos de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorizar una afección descrita en el presente documento (por ejemplo, una afección que implica células cancerosas positivas para HER2). Las moléculas de unión biespecíficas pueden usarse con propósitos de diagnóstico y se marcan tal como se describe en la sección 0.

En el presente documento se proporcionan métodos para la detección de una afección descrita en el presente documento, los métodos pueden comprender (a) someter a ensayo la expresión de HER2 en células o una muestra de tejido de un sujeto usando una o más moléculas de unión biespecíficas descritas en el presente documento; y (b) comparar el nivel de expresión de HER2 con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normal (por ejemplo, de un sujeto que no tiene una afección descrita en el presente documento, o del mismo paciente antes del inicio de la afección), mediante lo cual un aumento o una disminución del nivel sometido a ensayo de expresión de HER2 en comparación con el nivel de control de expresión de HER2 es indicativo de una afección descrita en el presente documento.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para someter a ensayo los niveles de HER2 en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos tal como se describe en el presente documento o

que conocen los expertos en la técnica (por ejemplo, véanse Jalkanen *et al.*, 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; y Jalkanen *et al.*, 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de genes de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Se conocen en la técnica marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados e incluyen marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In) y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Puede realizarse la monitorización de una afección descrita en el presente documento (por ejemplo, un cáncer positivo para HER2), repitiendo el método para el diagnóstico durante un periodo de tiempo después del diagnóstico inicial.

La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el sujeto usando métodos conocidos en la técnica para la exploración *in vivo*. Los expertos podrán determinar el método apropiado para detectar un marcador particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada (TC), exploración de cuerpo entero tal como tomografía por emisión de posición (PET, por sus siglas en inglés), obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) y ecografía.

5.7 POBLACION DE PACIENTES

Un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento puede ser cualquier mamífero, tal como un roedor, un gato, un cánido, un caballo, una vaca, un cerdo, un mono, un primate o un ser humano, etc. El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede ser un cánido.

Un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento puede haberse diagnosticado que tiene un cáncer positivo para HER2, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de mama, cáncer gástrico, osteosarcoma, cáncer desmoplásico de células redondas pequeñas, carcinoma de células escamosas de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, adenocarcinoma de la unión gástrica, adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, cáncer de cuello uterino, cáncer de glándulas salivales, sarcoma de tejidos blandos, leucemia, melanoma, sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, neuroblastoma o cualquier otro tejido neoplásico que exprese el receptor HER2.

El sujeto puede ser resistente al tratamiento con trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib o cualquier otra molécula pequeña o anticuerpo que se dirija a la familia HER de receptores. El tumor que es resistente al tratamiento con trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib o cualquier otra molécula pequeña o anticuerpo que se dirija a la familia HER de receptores puede responder al tratamiento con una molécula de unión biespecífica de la invención.

Un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento puede tener un cáncer positivo para HER2 que sea resistente al tratamiento con trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib o cualquier otra molécula pequeña o anticuerpo que se dirija a la familia HER de receptores. Un sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento puede tener un cáncer positivo para HER2 que responde al tratamiento con una molécula de unión biespecífica de la invención.

El sujeto tratado según los métodos proporcionados en el presente documento puede haber recibido previamente uno o más regímenes de quimioterapia para la enfermedad metastásica, por ejemplo, metástasis cerebrales o peritoneales. Es posible que el sujeto no haya recibido previamente tratamiento para la enfermedad metastásica.

5.8 DOSIS Y REGIMENES

La dosis de una molécula de unión biespecífica tal como se describe en la sección 0 puede administrarse a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento en una dosis determinada según las necesidades del sujeto. La dosis puede determinarla un médico según las necesidades del sujeto.

La dosis de una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento puede ser menor que la dosis de trastuzumab. Véase, por ejemplo, Trastuzumab [Highlights of Prescribing Information]. South San Francisco, CA: Genentech, Inc.; 2014. La dosis de una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento puede ser aproximadamente entre 20 y 40 veces menor que una dosis de trastuzumab aprobada por la FDA.

La dosis de una molécula de unión biespecífica tal como se describe en la sección 0 puede administrarse a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento, es de entre 0,01 mg/kg y 0,025 mg/kg, es de entre 0,025 mg/kg y 0,05 mg/kg, es de entre 0,05 mg/kg y 0,1 mg/kg, es de entre 0,1 mg/kg y 0,5 mg/kg, entre 0,1 mg/kg y 0,6 mg/kg, entre 0,2 mg/kg y 0,7 mg/kg, entre 0,3 mg/kg y 0,8 mg/kg, entre 0,4 mg/kg y 0,8 mg/kg, entre 0,5 mg/kg y 0,9 mg/kg, o entre 0,6 mg/kg y 1.

La dosis de una molécula de unión biespecífica tal como se describe en la sección 0 administrada a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento, una dosis inicial puede ir seguida de una dosis ajustada que es la dosis de mantenimiento. La dosis inicial puede administrarse una vez. La dosis inicial puede ser de entre 0,01 mg/kg y 0,025 mg/kg, es de entre 0,025 mg/kg y 0,05 mg/kg, es de entre 0,05 mg/kg y 0,1 mg/kg, es de entre 0,1 mg/kg y 0,5 mg/kg, entre 0,1 mg/kg y 0,6 mg/kg, entre 0,2 mg/kg y 0,7 mg/kg, entre 0,3 mg/kg y 0,8 mg/kg, entre

0,4 mg/kg y 0,8 mg/kg, entre 0,5 mg/kg y 0,9 mg/kg, o entre 0,6 mg/kg y 1. La dosis inicial puede administrarse mediante perfusión intravenosa a lo largo de 90 minutos. La dosis ajustada puede administrarse una vez cada aproximadamente 4 semanas. La dosis ajustada puede administrarse durante al menos 13, al menos 26 o como máximo 52 semanas. La dosis ajustada puede administrarse durante 52 semanas. La dosis ajustada puede ser de entre 0,01 mg/kg y 0,025 mg/kg, es de entre 0,025 mg/kg y 0,05 mg/kg, es de entre 0,05 mg/kg y 0,1 mg/kg, es de entre 0,1 mg/kg y 0,5 mg/kg, entre 0,1 mg/kg y 0,6 mg/kg, entre 0,2 mg/kg y 0,7 mg/kg, entre 0,3 mg/kg y 0,8 mg/kg, entre 0,4 mg/kg y 0,8 mg/kg, entre 0,5 mg/kg y 0,9 mg/kg, o entre 0,6 mg/kg y 1. La dosis ajustada puede administrarse mediante perfusión intravenosa a lo largo de 30 minutos. La dosis ajustada puede administrarse mediante perfusión intravenosa a lo largo de 30 a 90 minutos.

- Una molécula de unión biespecífica tal como se describe en la sección 0 para su uso con los métodos proporcionados en el presente documento puede administrarse 1, 2 o 3 veces a la semana, cada 1, 2, 3 o 4 semanas. La molécula de unión biespecífica puede administrarse según el siguiente régimen: (i) 1, 2 o 3 administraciones en una primera semana; (ii) 1, 2, 3 o 4 administraciones a la semana después de la primera semana; seguido de (iii) 1, 2 o 3 administraciones en una semana cada mes durante un total de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. La molécula de unión biespecífica puede administrarse según el siguiente régimen: (i) 3 administraciones en una primera semana; (ii) 3 administraciones a la semana después de la primera semana; seguido de (iii) 3 administraciones en una semana cada mes durante un total de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. La molécula de unión biespecífica puede administrarse según el siguiente régimen: (i) 3 administraciones en una primera semana; (ii) 2 administraciones a la semana después de la primera semana; seguido de (iii) 2 administraciones en una semana cada mes durante un total de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. La molécula de unión biespecífica puede administrarse según el siguiente régimen: (i) 3 administraciones en una primera semana; (ii) 1 administración a la semana después de la primera semana; seguido de (iii) 1 administración en una semana cada mes durante un total de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. La molécula de unión biespecífica puede administrarse según el siguiente régimen: (i) 2 administraciones en una primera semana; (ii) 2 administraciones a la semana después de la primera semana; seguido de (iii) 2 administraciones en una semana cada mes durante un total de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. La molécula de unión biespecífica puede administrarse según el siguiente régimen: (i) 2 administraciones en una primera semana; (ii) 1 administración a la semana después de la primera semana; seguido de (iii) 1 administración en una semana cada mes durante un total de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. La molécula de unión biespecífica puede administrarse según el siguiente régimen: (i) 1 administración en una primera semana; (ii) 1 administración a la semana después de la primera semana; seguido de (iii) 1 administración en una semana cada mes durante un total de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses.

Una molécula de unión biespecífica tal como se describe en la sección 0 puede administrarse a un sujeto según los métodos proporcionados en el presente documento en combinación con un segundo agente farmacéuticamente activo tal como se describe en la sección 0.

- La molécula de unión biespecífica puede administrarse por vía intratecal, por vía intraventricular en el cerebro, por vía intraparenquimatosa en el cerebro o por vía intraperitoneal.

5.9 TERAPIA DE COMBINACIÓN

- Una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, o un polinucleótido, vector o una célula que codifica para la molécula de unión biespecífica, puede administrarse en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales, por ejemplo, un agente quimioterapéutico contra el cáncer. Tal terapia de combinación puede lograrse mediante la dosificación simultánea, secuencial o independiente de los componentes individuales del tratamiento. La molécula de unión biespecífica o el polinucleótido, vector o la célula que codifica para la molécula de unión biespecífica y uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser sinérgicos, de tal manera que la dosis de uno cualquiera o de ambos componentes puede reducirse en comparación con la dosis de cualquiera de los componentes que se administre como monoterapia. Alternativamente, la molécula de unión biespecífica o el polinucleótido, vector o la célula que codifica para la molécula de unión biespecífica y el uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser aditivos, de tal manera que la dosis de la molécula de unión biespecífica y del uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales es similar o igual a la dosis de cualquiera de los componentes que se administre como monoterapia.
- Una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, o un polinucleótido, vector o una célula que codifica para la molécula de unión biespecífica puede administrarse el mismo día que uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. La molécula de unión biespecífica o el polinucleótido, vector o la célula que codifica para la molécula de unión biespecífica se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas antes que el uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. La molécula de unión biespecífica o el polinucleótido, vector o la célula que codifica para la molécula de unión biespecífica puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas después que el uno o más agentes farmacéuticamente activos. La molécula de unión biespecífica o el polinucleótido, vector o la célula que codifica para la molécula de unión biespecífica puede administrarse 1, 2, 3 o más días antes que el uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. La molécula de unión biespecífica o el polinucleótido, vector o la célula que codifica para la molécula de unión biespecífica puede administrarse 1, 2, 3 o más días después que el uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. La molécula de unión biespecífica o el polinucleótido, vector o la célula que codifica para la molécula de unión biespecífica puede administrarse 1, 2, 3, 4,

5 o 6 semanas antes que el uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. La molécula de unión biespecífica o el polinucleótido, vector o la célula que codifica para la molécula de unión biespecífica puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas después que el uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales.

5 El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser doxorubicina. El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser ciclofosfamida. El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser paclitaxel. El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser docetaxel. El uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser carboplatino.

El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser una citocina tal como, por ejemplo, IL15, complejo IL15R/IL15, IL2 o GMCSF.

10 El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser un agente que aumente la expresión celular de HER2 tal como, por ejemplo, radioterapia externa o radioinmunoterapia. Véase, por ejemplo, Wattenberg *et al.*, 2014, British Journal of Cancer, 110: 1472.

El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser un agente radioterapéutico.

15 El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser un agente que controle directamente la ruta de señalización de HER2, por ejemplo, lapatinib. Véase, por ejemplo, Scaltiri *et al.*, 2012, 28(6): 803-814.

El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser un agente que aumente la muerte celular, apoptosis, autofagia o necrosis de las células tumorales.

20 Puede administrarse una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, o un polinucleótido, vector o una célula que codifica para la molécula de unión biespecífica en combinación con dos agentes farmacéuticamente activos adicionales, por ejemplo, los usados en combinación con trastuzumab (véase, Trastuzumab [Highlights of Prescribing Information]. South San Francisco, CA: Genentech, Inc.; 2014). Los dos agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser doxorubicina y paclitaxel. Los dos agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser doxorubicina y docetaxel. Los dos agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser ciclofosfamida y paclitaxel. Los dos agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser ciclofosfamida y docetaxel. Los dos agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser docetaxel y carboplatino. Los dos agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser cisplatino y capecitabina. Los dos agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser cisplatino y 5-fluorouracilo.

30 Una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, o un polinucleótido, vector o una célula que codifica para la molécula de unión biespecífica puede administrarse como un único agente tras una terapia basada en antraciclina multimodal.

35 Una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, o un polinucleótido, vector o una célula que codifica para la molécula de unión biespecífica puede administrarse después de uno o más regímenes de quimioterapia para enfermedad metastásica, por ejemplo, metástasis cerebrales o peritoneales. Puede administrarse una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, o un polinucleótido, vector o una célula que codifica para la molécula de unión biespecífica en combinación con quimioterapia citorreductora. La administración puede realizarse después de tratar al sujeto con quimioterapia citorreductora.

40 Una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, un polinucleótido, vector o una célula que codifica para la molécula de unión biespecífica, o una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión biespecífica, puede administrarse en combinación con infusión de células T. La molécula de unión biespecífica puede no unirse a una célula T. La molécula de unión biespecífica puede unirse a una célula T. La unión de la molécula de unión biespecífica a la célula T puede ser no covalente. La administración de una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente documento, un polinucleótido, vector o una célula que codifica para la molécula de unión biespecífica, o una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión biespecífica, puede realizarse después de tratar al paciente con infusión de células T. La infusión de células T puede realizarse con células T que son autólogas para el sujeto al que se administran las células T. La infusión de células T puede realizarse con células T que son alogénicas para el sujeto al que se administran las células T. Las células T pueden unirse a moléculas idénticas a una molécula de unión biespecífica tal como se describe en el presente documento. En la unión de las células T a moléculas idénticas a la molécula de unión biespecífica puede ser no covalente. Las células T pueden ser células T humanas. Se conocen en la técnica métodos que pueden usarse para unir moléculas de unión biespecíficas a células T. Véanse, por ejemplo, Lum *et al.*, 2013, Biol Blood Marrow Transplant, 19:925-33, Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 5ª edición, Nueva York: Garland Science; Vaishampayan *et al.*, 2015, Prostate Cancer, 2015:285193 y Stromnes *et al.*, 2014, Immunol Rev. 257(1):145-164. Véase también, Vaishampayan *et al.*, 2015, Prostate Cancer, 2015:285193, que describe el siguiente método a modo de ejemplo, no limitativo, para unir moléculas de unión biespecíficas a células T:

55 Pueden recogerse células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para obtener linfocitos para la expansión de células T activadas a partir de 1 o 2 leucoféresis. Las PBMC pueden activarse con, por ejemplo, 20 ng/ml de OKT3 y se expanden en 100 UI/ml de IL-2 para generar 40-320 mil millones de células T activadas durante un

máximo de 14 días de cultivo en condiciones de BPF actuales tal como se describe en Ueda *et al.*, 1993, Transplantation, 56(2):351-356 y Uberti *et al.*, 1994, Clinical Immunology and Immunopathology, 70(3):234-240. Las células se cultivan en frascos con respiradero (bolsa de FEP tipo 750-CI, American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD) en medio RPMI 1640 (Lonza) complementado con suero humano inactivado por calor combinado al 2 %. Las células T activadas se dividen aproximadamente cada 2-3 días según el recuento de células. Después de 14 días, las células T activadas se cultivan con 50 ng de una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento por 10^6 células T activadas. A continuación, la mezcla se lava y se crioconserva.

6. Ejemplos

6.1 EJEMPLO 1

6.1.1 INTRODUCTION

Este ejemplo describe una molécula de unión biespecífica a HER2/CD3 (denominada en el presente documento "HER2-AcBs") basada en una plataforma de IgG1. Esta plataforma se utilizó para permitir: (1) un tamaño óptimo para maximizar la captación tumoral, (2) bivalencia hacia la diana tumoral para mantener la avidéz, (3) un andamiaje que se ensambla de manera natural como cualquier IgG (cadena pesada y cadena ligera) en células CHO, purificable mediante cromatografía de afinidad con proteína A convencional, (4) disposición estructural para hacer que el componente anti-CD3 sea funcionalmente monovalente, reduciendo así la activación espontánea de las células T, y (5) una plataforma con eficacia comprobada de direccionamiento tumoral en modelos animales. Esta molécula de unión biespecífica tiene la misma especificidad que el trastuzumab; pero también recluta y activa las células T CD3(+) rediriéndolas contra las células tumorales que expresan HER2, generando respuestas antitumorales robustas. Sin querer vincularse a ninguna teoría, la eficacia de este AcBs se centra en el aprovechamiento del potencial citotóxico de las células T policlonales y su capacidad única para seleccionar como diana células tumorales que expresan incluso niveles bajos de HER2, independientemente del estado de activación de la ruta de HER2.

6.1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.2.1 Análisis de diseño, producción y purificación de HER2-AcBs

Se diseñó el formato HER2-AcBs como una fusión de scFv de huOKT3 al extremo C-terminal de la cadena ligera de una IgG1 humana. El V_H era idéntico al de la IgG1 trastuzumab, excepto la mutación N297A en una región Fc de IgG1 humana convencional para la forma aglicosilada (SEQ ID NO: 62), mientras que se construye la cadena ligera como VL-C κ -(G₄S)₃-scFv (SEQ ID NO: 60). Las secuencias de nucleótidos que codifican para los dominios VH y VL de trastuzumab y el scFv de huOKT3 se sintetizaron mediante GenScript con sitios de enzimas de restricción flanqueantes apropiados, y se subclonaron en un vector de expresión de mamífero convencional. Se construyó el AcBs de control HER2-C825 (C825 es un anticuerpo de scFv murino con alta afinidad por complejos metálicos de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) con lantánidos incluyendo lutecio e itrio) de manera similar.

Se usó ADN de plásmido linealizado para transfectar células CHO-S (Invitrogen) para la producción estable de AcBs. Se transfectaron 2×10^6 células con 5 μ g de ADN de plásmido mediante Nucleofection (Lonza) y luego se recuperaron en medio CD OptiCHO complementado con L-glutamina 8 mM (Invitrogen) durante 2 días a 37 °C en placas de cultivo de 6 pocillos. Se seleccionaron combinaciones estables con higromicina 500 μ g/ml durante aproximadamente dos semanas y luego se seleccionaron clones individuales con dilución limitada. Se determinó el título de HER2-AcBs mediante ELISA de células AU565 HER2(+) y células Jurket CD3(+), respectivamente, y se seleccionaron los clones estables con la mayor expresión.

Se cultivó la línea productora de AcBs en medio OptiCHO y se recogió el sobrenadante maduro. Se preequilibró una columna de afinidad con proteína A (GE Healthcare) con tampón citrato de sodio 25 mM con NaCl 0,15 M, pH 8,2. Se eluyó el AcBs unido con tampón ácido cítrico/citrato de sodio 0,1 M, pH 3,9 y se neutralizó con citrato de sodio 25 mM, pH 8,5 (razón 1:10 v/v). Para el almacenamiento, se dializó AcBs en citrato de sodio 25 mM, NaCl 0,15 M, pH 8,2 y se congeló en alícuotas a -80 °C. Se analizaron dos microgramos de la proteína mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras usando el sistema Ready gel de Tris-glicina al 4-15 % (Bio-Rad). Se usó patrón preteñido SeeBlue Plus2 de Invitrogen como marcador de PM de proteína. Después de la electroforesis, se tiñó el gel usando Coomassie G-250 (reactivo de tinción azul GelCode; Pierce). También se evaluó la pureza de HER2-AcBs mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con exclusión molecular (SE-HPLC). Se inyectaron aproximadamente 20 μ g de proteína en una columna TSK-GEL G3000SWXL de 7,8 mm x 30 cm, 5 μ m (TOSOH Bioscience) con NaClO₄ 0,4 M, NaH₂PO₄ 0,05 M, tampón de pH 6,0 a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, y detección UV a 280 nm. Se analizaron diez microlitros de patrón de filtración en gel (Bio-Rad) en paralelo para los marcadores de MW.

6.1.2.2 Análisis mediante FACS

Se incubaron células con 5 μ g/ml de anticuerpo primario (trastuzumab, HER2-AcBs o cetuximab) durante treinta minutos a 4 °C en PBS, y se usó un anticuerpo secundario marcado con ficoeritrina específico para Fc humano después del lavado del anticuerpo primario en exceso. Se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 1 % antes

del análisis en el citómetro FACSCalibur (BD biosciences). Los controles fueron células con anticuerpo secundario solamente, para las cuales se estableció la intensidad de fluorescencia media (IFM) en 5. Los datos de FACS muestran la IFM en el panel superior derecho de cada representación gráfica.

6.1.2.3 Ensayo de liberación de ^{51}Cr

- 5 El ensayo de liberación de ^{51}Cr se realizó con células T efectoras cultivadas *in vitro* en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante aproximadamente 14 días. Todas las células tumorales diana se recogieron con EDTA 2 mM en PBS, se marcaron con ^{51}Cr (Amersham, Arlington Height, IL) a $100\ \mu\text{Ci}/10^6$ células a $37\ ^\circ\text{C}$ durante 1 h. Se mezclaron 5000 células diana/pocillo con 50.000 células efectoras (E:T = 10:1) y anticuerpos AcBs en placas de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos (BD Biosciences) hasta un volumen final de $250\ \mu\text{l}$ /pocillo. Se incubaron las
- 10 placas a 37°C durante 4 h. Se contó el ^{51}Cr liberado en el sobrenadante en un contador γ (Packed Instrument, Downers Grove, IL). El porcentaje de liberación específica se calculó usando la fórmula: $(\text{cpm experimental} - \text{cpm de fondo})/(\text{cpm total} - \text{cpm de fondo}) \times 100\ \%$, donde cpm representaba cuentas por minuto de ^{51}Cr liberado. La liberación total se evaluó mediante lisis con SDS al 10 % (Sigma, St Louis, Mo) y se midió la liberación de fondo en ausencia de células efectoras. Se calculó la CE50 usando el software SigmaPlot.

15 6.1.2.4 Ensayo de competencia

- Para evaluar la capacidad de trastuzumab y/o huOKT3 para interferir con la unión de HER2-AcBs, se incubó la línea celular SKOV3 positiva para HER2 durante treinta minutos a $4\ ^\circ\text{C}$ con PBS o con $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de trastuzumab o huOKT3. Posteriormente, se tiñeron las células con $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de HER2-AcBs conjugado con Alexa-Fluor 488 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se generó HER2-AcBs conjugado con Alexa-Fluor 488 con el kit de marcaje de IgG humana Zenon® Alexa Fluor® 488 (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 20

6.1.2.5 Ensayo de unión

Se realizaron ensayos de unión mediante resonancia de plasmón superficial usando Biacore T100 de manera similar a lo descrito en Okazaki *et al.*, 2004, J Mol Biol; 336(5):1239-1249.

6.1.2.6 Ensayo de avidez

- 25 Para comparar la avidez de HER2-AcBs y trastuzumab, se incubaron células SKOV3 positivas para HER2 con diluciones de 10 veces (desde 10 hasta $1 \times 10^{-5}\ \mu\text{g}/\text{ml}$) de trastuzumab o HER2-AcBs y se analizaron mediante citometría de flujo con anticuerpo específico de Fc humano marcado con FITC como anticuerpo secundario. Se representó gráficamente la IFM frente a la concentración de anticuerpo y se compararon las curvas.

6.1.2.7 Ensayo de proliferación

- 30 Para determinar los efectos antiproliferativos, se trataron células con anticuerpo monoclonal de control de isotipo, lapatinib $10\ \text{nM}$ (como control positivo), HER2-AcBs $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$, trastuzumab $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$, lapatinib $10\ \text{nM}$, erlotinib $10\ \text{nM}$, 10 nM neratinib o cetuximab $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ durante 72 horas y se sometió a ensayo la proliferación celular. Se determinó la proliferación celular usando un lector de placas de ELISA y el kit para WST-8 (Dojindo Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando la fórmula: % de tasa de supervivencia = $(\text{Muestra-fondo})/(\text{Control negativo-fondo})$. El lapatinib (farmacia de MSKCC) se molió usando una mano y un mortero y se suspendió en DMSO tal como se describió previamente. Para determinar la significación estadística, se analizaron los resultados usando ANOVA de un factor usando Prism 6.0.
- 35

6.1.2.8 qRT-PCR

- 40 Se extrajo ARN cuando las células tenían una confluencia del 70 % y se analizó el ADNc en un sistema de detección de secuencias Prism 7700 usando el kit Hs01001580_m1, disponible comercialmente, específico para HER2 de Applied Biosciences.

6.1.2.9 Animales y ensayos *in vivo*

- Para estudios *in vivo*, ratones BALB-Rag2-KO-IL-2R- γc -KO (DKO) (derivados de la colonia del Dr. Mamoru Ito, CIEA, Kawasaki, Japón). Véase, por ejemplo, Koo *et al.*, 2009, Expert Rev Vaccines, 8: 113-120 y Andrade *et al.*, 2011, Arthritis Rheum, 2011, 63: 2764-2773. Se mezclaron células MCF7 o HCC1954 en una razón 1:1 con PMBC (inactivadas, de capa leucocítica) y se implantaron en ratones DKO por vía subcutánea. Cuatro días tras la implantación, se trataron los ratones con PBS, $10\ \mu\text{g}$ de trastuzumab o $10\ \mu\text{g}$ de HER2-AcBs dos veces a la semana durante dos semanas. Se midió el tamaño tumoral en los días indicados tras la implantación. Se determinó el tamaño tumoral mediante calibres con la fórmula $V = 0,5$ (longitud x anchura x anchura), o usando el sistema óptico Peira TM900.
- 45
- 50

Para el modelo metastásico, se administraron células MCF7 que expresaban luciferasa a ratones DKO por vía intravenosa. Cuatro días tras la administración, se trataron los ratones con $100\ \mu\text{g}$ de HER2-AcBs, $20\ \mu\text{g}$ de HER2-AcBs, o $20\ \mu\text{g}$ de un HER2-AcBs que carece de direccionamiento a CD3 (HER2-C825) dos veces a la semana durante

tres semanas, con o sin administración intravenosa de 5×10^6 PBMC. Se cuantificó el tamaño tumoral en los puntos de tiempo indicados usando IVIS 200 (Xenogen) para cuantificar la bioluminiscencia de luciferina.

6.1.3 RESULTADOS

6.1.3.1 HER2-AcBs se une tanto a células tumorales como a células T.

5 Se generó el HER2-AcBs usando una variante de trastuzumab que comprende una mutación N297A en la región Fc de IgG1 humana para eliminar la glicosilación (SEQ ID NO: 62). Se generó el polipéptido de fusión de cadena ligera AcBs uniendo el fragmento Fv de cadena sencilla (ScFv) de OKT3 humanizado (huOKT3) anti-CD3 al extremo carboxilo de la cadena ligera de IgG1 trastuzumab a través de un ligador C-terminal $(G_4S)_3$ (figura 1A y SEQ ID NO: 60). Para evitar la agregación, se sustituyó una cisteína en la posición 105 de la cadena pesada variable de huOKT3 por serina. También se introdujo una mutación N297A en la región Fc de HER2-AcBs para eliminar la unión de HER2-AcBs a los receptores de Fc. Se ha demostrado previamente que esta mutación elimina la capacidad de unión de IgG1-Fc humana a los receptores de Fc CD16A (figura 1D) y CD32A (figura 1E).

15 Para producir el HER2-AcBs, se transfectó un vector de expresión de mamífero que codifica tanto para el polipéptido de fusión de cadena pesada como de cadena ligera en células CHO-S, se seleccionaron clones estables, se recogieron los sobrenadantes y se purificó el HER2-AcBs mediante cromatografía de afinidad con proteína A. El análisis de pureza bioquímica del AcBs se representa en la figura 1B y la figura 1C. En condiciones reductoras de SDS-PAGE, HER2-AcBs dio lugar a dos bandas a aproximadamente 50 kDa, ya que la fusión de scFv de huOKT3 con la cadena ligera de trastuzumab aumentó el PM hasta ~ 50 kDa. SEC-HPLC mostró un pico mayoritario (97 % mediante análisis de UV) con un PM aproximado de 210 kDa, así como un pico minoritario de multímeros retirables mediante filtración en gel. El HER2-AcBs fue estable mediante SDS-PAGE y SEC-HPLC después de múltiples ciclos de congelación y descongelación.

25 Se realizaron FACS e inmunotinción para evaluar la unión de HER2-AcBs tanto a células diana como a células efectoras. El trastuzumab y HER2-AcBs presentaron una unión comparable a la línea celular de carcinoma de mama positivo para HER2, AU565 (figura 2A). En cambio, HER2-AcBs demostró más de 20 veces menos unión a células T CD3+ que huOKT3 (figura 2B). Esto concuerda con la observación de que el scFv anclado en cadena ligera tenía menor avidez por las células T que la IgG1 huOKT3 normal, diseñada a propósito para minimizar la liberación de citoquinas en ausencia de células tumorales diana.

30 Se confirmó además la menor avidez de HER2-AcBs por las células T mediante el análisis de afinidad de unión de Biacore tal como se describe en Cheung *et al.* 2012, *Oncolmmunology*, 1:477-486. Para el antígeno CD3, HER2-AcBs tenía una k_{on} a $4,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, una k_{off} a $8,68 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una K_D global a 192 nM; comparable al huOKT3 IgG1-aGlico parental a la k_{off} ($1,09 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$), pero menos a la k_{on} ($1,68 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y K_D global (64,6 nM). En resumen, HER2-AcBs tenía una k_{on} mucho menor que su huOKT3-aGlico parental, lo que sugiere menos posibilidades de que AcBs se una a las células T y las active en las mismas condiciones, por tanto, menos liberación de citocinas.

6.1.3.2 HER2-AcBs redirigió la destrucción de células T de líneas de células tumorales humanas.

35 Para evaluar si HER2-AcBs podía redirigir células T para destruir células tumorales, se sometió a prueba la citotoxicidad de células T en células AU565 de cáncer de mama HER2(+) en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 horas convencional. Se observó una destrucción sustancial de las células tumorales en presencia de HER2-AcBs, con una CE50 a 300 fM (figura 3). Además, la destrucción fue eficaz para un amplio panel de líneas de células tumorales humanas incluyendo carcinoma de mama, carcinoma de ovario, melanoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma y neuroblastoma, en las que la potencia de destrucción se correlaciona con el nivel de expresión de HER2 en las células mediante FACS (figura 4).

6.1.3.3 HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T específicas de antígeno tumoral.

45 Para investigar la especificidad del antígeno tumoral de HER2-AcBs en la citotoxicidad de células T, se realizó un ensayo de citotoxicidad en las células UM SCC 47 positivas para HER2 (un modelo para cáncer de cabeza y cuello) y en las células HTB-132 negativas para HER2 (un modelo para el cáncer de mama). HER2-AcBs medió en la citotoxicidad de células T frente a las células UM-SCC47 positivas para HER2 (CE50 de 14,5 pM), pero no frente a las células HTB-132 negativas para HER2 (figura 5A).

50 Para investigar la especificidad de HER2-AcBs en la citotoxicidad de células T, primero se bloquearon células positivas para HER2 con huOKT3 o con trastuzumab. En ausencia de HER2-AcBs, las células T presentaron una citotoxicidad mínima, lo que garantiza que las células T por sí solas tienen una citotoxicidad inespecífica mínima. Tanto huOKT3 como trastuzumab bloquearon la capacidad de HER2-AcBs para inducir citotoxicidad de células T.

6.1.3.4 HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T frente a células positivas para HER2 por debajo del umbral de detección de HER2 mediante citometría de flujo.

55 Se usó la línea celular de carcinoma de ovario HER2+ SKOV3 en un ensayo de citotoxicidad de ^{51}Cr con diluciones de 10 veces de HER2-AcBs en presencia de células T. Estas mismas células se tiñeron usando HER2-AcBs a las

5 mismas concentraciones y se analizaron mediante citometría de flujo, se representó gráficamente la IFM sobre el mismo eje x que la citotoxicidad y se calculó la CE50 para ambas curvas. HER2-AcBs medió en la citotoxicidad de células T frente a células positivas para HER2 incluso cuando no se detectó la unión a HER2-AcBs mediante citometría de flujo (figura 6). La comparación de la CE50 para el ensayo de citotoxicidad (2 pM) frente a la CE50 para la curva de citometría de flujo (3,5 nM) sugiere que las células T en presencia de HER2-AcBs fueron 2500 veces más eficaces en la detección de células positivas para HER2 que la citometría de flujo.

6.1.3.5 HER2-AcBs tiene la misma especificidad, afinidad y efectos antiproliferativos que trastuzumab.

10 Antes del tratamiento con HER2-AcBs, se preincubaron células positivas para HER2 con trastuzumab para determinar si HER2-AcBs comparte la misma especificidad antigénica que trastuzumab. La preincubación con trastuzumab bloqueó la unión de HER2-AcBs a las células, lo que demuestra una especificidad compartida (figura 7A). Para comparar la afinidad de HER2-AcBs con trastuzumab, se incubaron células positivas para HER2 con diluciones de trastuzumab o HER2-AcBs y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la unión celular. La representación gráfica de IFM frente a la concentración de anticuerpo reveló curvas similares para trastuzumab y HER2-AcBs, lo que demuestra una afinidad de unión similar (figura 7B). Además, trastuzumab y HER2-AcBs demostraron efectos antiproliferativos similares frente a células positivas para HER2 (figura 7C).

6.1.3.6 HER2-AcBs medió en la citotoxicidad de células T frente a CCECC con una CE50 en el rango picomolar.

20 Se evaluaron mediante citometría de flujo con trastuzumab el nivel y la frecuencia de HER2 en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello caracterizadas previamente 93-VU-147T, PCI-30, UD-SCC2, SCC90, UMSCC47 y PCI-15B. También se sometieron a prueba las células para determinar la expresión de HER2 mediante qRT-PCR (figura 8). HER2 se expresó de manera comparable en el panel de líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. Finalmente, el nivel de citotoxicidad en presencia de células T y HER2-AcBs se correlacionó con el nivel de HER2 en las células, revelando que HER2-AcBs presenta una CE50 en el rango picomolar para estas líneas celulares de cabeza y cuello (figura 8).

6.1.3.7 HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T frente a CCECC resistente a otras terapias dirigidas a HER.

25 Para determinar el estado de EGFR y HER2 de la línea celular de CCECC PCI-30, se tiñeron las células con trastuzumab o cetuximab y se analizaron mediante citometría de flujo tal como se describió previamente (figura 9A). Un ensayo de proliferación demostró que estas células son resistentes a las terapias dirigidas específicas de HER, trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib y el inhibidor de pan-HER neratinib (figura 9B). Sin embargo, las células PCI-30 fueron sensibles al tratamiento con HER2-AcBs usando tres ensayos de citotoxicidad diferentes (figura 9C). HER2-AcBs generó potentes respuestas citotóxicas frente a PCI-30 independientemente de su sensibilidad a otras terapias dirigidas a HER, incluso cuando estos fármacos se dirigen a más de uno de estos receptores. Estos ensayos sugieren que HER2-AcBs pudo generar potentes respuestas citotóxicas, independientemente de la sensibilidad de las células diana a las terapias dirigidas a EGFR o HER2.

35 6.1.3.8 HER2-AcBs medió en la citotoxicidad de células T frente a líneas celulares de osteosarcoma con una CE50 en el rango picomolar.

40 Se evaluaron las líneas celulares de osteosarcoma caracterizadas previamente, RG-160, CRL 1427 y U2OS, para determinar su expresión de HER2 mediante citometría de flujo con trastuzumab (figura 10) y mediante qRT-PCR, y los niveles de HER2 se correlacionaron con la citotoxicidad en presencia de células T y HER2-AcBs (figura 10). Todas las líneas celulares sometidas a prueba fueron positivas para HER2, aunque el nivel de expresión varió. Además, todas las células positivas para HER2 eran sensibles a la citotoxicidad de células T mediada por HER2-AcBs, con una CE50 en el intervalo de 11-25 pM.

6.1.3.9 HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T frente a líneas celulares de osteosarcoma resistentes a la terapia dirigida a HER.

45 Las células U2OS son una línea celular de osteosarcoma positiva para HER2, positiva para EGFR (figura 11A). Se analizó la sensibilidad de las células U2OS a trastuzumab, cetuximab, lapatinib y al inhibidor de pan-HER neratinib mediante un ensayo de proliferación en presencia de cada uno de los inhibidores. Estas células eran resistentes a cetuximab y trastuzumab con una sensibilidad mínima a lapatinib, erlotinib y neratinib (figura 11B). Se sometió a prueba la sensibilidad de estas mismas células para las respuestas citotóxicas de células T mediadas por HER2-AcBs. HER2-AcBs generó potentes respuestas citotóxicas frente a células U2OS usando tres ensayos de citotoxicidad diferentes, independientemente de su sensibilidad a otras terapias dirigidas a HER (figura 11C).

50 6.1.3.10 HER2-AcBs media en la citotoxicidad de células T frente a células HeLa de cáncer de cuello uterino resistentes a la terapia dirigida a HER.

55 Las células HeLa son una línea celular de carcinoma de cuello uterino positivo para HER2 y positivo para EGFR (figura 12A). Se analizó la sensibilidad de las células HeLa a los inhibidores de tirosina cinasa de la familia HER, erlotinib, lapatinib o neratinib, o a los anticuerpos específicos de HER, cetuximab o trastuzumab. Estos resultados demostraron que las células HeLa son pan-resistentes a estas terapias (figura 12B). Sin embargo, se sometieron a prueba estas

mismas células para determinar la sensibilidad de las respuestas citotóxicas de células T mediadas por HER2-AcBs. HER2-AcBs generó potentes respuestas citotóxicas frente a células HeLa usando tres ensayos de citotoxicidad diferentes, independientemente de su sensibilidad a otras terapias dirigidas a HER (figura 12C). Curiosamente, el pretratamiento con lapatinib aumentó la sensibilidad a la citotoxicidad mediada por HER2-AcBs, incluso cuando el lapatinib solo no tuvo ningún efecto sobre la proliferación celular.

6.1.3.11 HER2-AcBs es eficaz frente al cáncer de mama humano en ratones humanizados.

Para estudios de terapia *in vivo*, se usaron ratones BALB-*Rag2*-KO-IL-2R- γ -KO (DKO) (derivados de la colonia del Dr. Mamoru Ito, CIEA, Kawasaki, Japón). Véanse, por ejemplo, Koo *et al.* 2009, Expert Rev Vaccines 8:113-120 y Andrade *et al.* 2011, Arthritis Rheum 63: 2764-2773. Se mezclaron células de cáncer de mama MCF7-luciferasa con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se implantaron por vía subcutánea. Cuatro días tras la implantación celular, se trataron los ratones con HER2-AcBs o con trastuzumab y se analizó el tamaño tumoral a lo largo del tiempo (figura 13). HER2-AcBs demostró una supresión significativa de la progresión tumoral. HER2-AcBs también fue eficaz frente a la progresión tumoral cuando se implantaron las células de cáncer de mama HCC1954 resistentes a trastuzumab (véase, por ejemplo, Huang *et al.*, 2011, Breast Cancer Research, 13: R84) por vía subcutánea con PBMC (figura 14).

Para evaluar un modelo de tumor metastásico, se inocularon por vía intravenosa células MCF7-luciferasa. Se administró HER2-AcBs y posteriormente en combinación con PBMC. La señal de bioluminiscencia de luciferina tumoral demostró que HER2-AcBs más PBMC mostraba una supresión completa de la progresión tumoral (figura 15, figura 16A, figura 16B, figura 16C y figura 16D).

6.1.4 CONCLUSIONES

El HER2-AcBs aglicosilado permitió minimizar las funciones de Fc y evitar una tormenta de citocinas y eliminar toda activación del complemento, la adherencia inmunitaria mediada por el complemento y por el receptor del complemento. Además, a pesar de la bivalencia de huOKT3 en la plataforma de IgG-scFv, la unión a CD3 fue funcionalmente monovalente; por tanto, no hubo activación espontánea de células T en ausencia de la diana tumoral. HER2-AcBs presentó una potente citotoxicidad frente a células tumorales positivas para HER2 *in vitro*, incluso frente a células con baja expresión de antígeno o células resistentes a trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib o el inhibidor de pan-HER neratinib. HER2-AcBs también presentó una potente citotoxicidad frente al cáncer de mama, cáncer de ovario, CCECC, osteosarcomas y sarcomas. Finalmente, HER2-AcBs presentó una fuerte eficacia *in vivo* frente a xenoinjertos tumorales, sustancialmente mejor que la del homólogo de hlgG1 trastuzumab.

6.2 EJEMPLO 2

Este ejemplo proporciona (a) una descripción más detallada de algunos de los experimentos descritos en el ejemplo 1 (sección 0); y (b) experimentos adicionales en comparación con el ejemplo 1 (sección 0).

6.2.1 INTRODUCCIÓN

El trastuzumab ha mejorado significativamente los desenlaces de los pacientes con cáncer de mama y también ha sido clave en el diseño y la implementación de otras terapias dirigidas (Singh *et al.*, 2014, Br J Cancer 111:1888-98). Sin embargo, la expresión de HER2 no garantiza una respuesta clínica al trastuzumab u otras terapias dirigidas a HER2 (Gajria *et al.*, 2011, Expert Review of Anticancer Therapy, 11(2):263-75; Lipton *et al.*, 2013, Breast Cancer Research and Treatment, 141(1):43-53). Menos del 35 % de los pacientes con cáncer de mama positivo para HER2 responden inicialmente al trastuzumab y el 70 % de los que responden inicialmente progresarán en última instancia a enfermedad metastásica en un año (Vu y Claret., 2011, Frontiers in Oncology 2:62). En el osteosarcoma y el sarcoma de Ewing, en los que los altos niveles de expresión de HER2 se asocian con una disminución de la supervivencia (Gorlick *et al.*, 1999, Journal of Clinical Oncology: Official Journal of The American Society of Clinical Oncology 17:2781-2788), el trastuzumab no ha mostrado ningún beneficio ni siquiera cuando se usa junto con quimioterapia citotóxica (Ebb *et al.*, 2012, Journal of Clinical Oncology: Official Journal of The American Society of Clinical Oncology 30:2545-2551). Además, el trastuzumab, al igual que otras terapias dirigidas a HER, ha mostrado un beneficio moderado o nulo contra el cáncer de cabeza y cuello positivo para HER2 (Pollock *et al.*, 2014, Clinical Cancer Research, 21(3):526-33).

Las motivos para estos fracasos son complejos y sólo se comprenden parcialmente. La diversidad genómica y la constante evolución de las neoplasias malignas las hacen menos propensas a la adicción oncogénica, un requisito para el éxito de la terapia dirigida. Además, incluso cuando está presente adicción oncogénica, puede surgir resistencia de la presión de selección inducida por el uso de terapias dirigidas (Lipton *et al.*, 2013, Breast Cancer Research and Treatment, 141(1):43-53). De hecho, a pesar del entusiasmo inicial recibido, la mayoría de las terapias dirigidas no han producido un beneficio significativo en la cura global de los pacientes que las reciben (Nathanson *et al.*, 2014, Science, 343:72-76). Puede ser beneficioso un enfoque diferente, uno que se dirija selectivamente a las células malignas que sobreexpresan los receptores de la familia HER y que pueda generar respuestas antitumorales citotóxicas independientemente del estado de activación del receptor.

Blinatumomab: se aprobó un AcBs CD19/CD3 en 2014 para el tratamiento de la leucemia linfoplásica aguda (Sanford,

2015, *Drugs* 75:321-7). Sin embargo, a pesar de sus resultados prometedores, la PK desfavorable de estas moléculas de pequeño tamaño requiere infusiones prolongadas, lo que complica su administración (Shalaby *et al.*, 1995, *Clin Immunol Immunopathol* 74:185-92, 1995; Portell *et al.*, 2013, *Clin Pharmacol* 5:5-11). Además, el síndrome de liberación de citocinas (SLC) resultante todavía presenta complicaciones costosas y, a menudo, potencialmente mortales. Es importante destacar que, a pesar de la capacidad de los anticuerpos biespecíficos para activar células T, las mismas rutas inhibitoras que regulan la función clásica de las células T podrían limitar su eficacia. Por ejemplo, el diseño heterodimérico de un anticuerpo biespecífico HER2/CD3 de unión monovalente fue inhibido por el eje inhibidor PD-1/PD-L1 (Junttila *et al.*, 2014, *Cancer Res* 74:5561-71).

El presente ejemplo proporciona una molécula de unión biespecífica (denominada en el presente documento "HER2-AcBs") que ofrece dos ventajas distintas con respecto a las tecnologías existentes: (1) se basa en el AcM IgG1 específico de HER2 completamente humanizado, trastuzumab, conservando sus ventajas farmacológicas (Wittrup *et al.*, 2012, *Methods Enzymol* 503:255-68) y unión bivalente a HER2; maximizando la avidéz tumoral; y (2) su unión a CD3 es funcionalmente monovalente a través del scFv derivado de la secuencia de AcM de huOKT3 humanizado. Por tanto, HER2-AcBs se basa en dos AcM con amplios registros de seguridad clínica. Además, esta es una plataforma con su función Fc delecionada para eliminar todas las actividades de citotoxicidad mediada por células (ADCC) y CMC dependientes de anticuerpos con el fin de reducir el síndrome de liberación de citocinas.

Los datos presentados en este ejemplo demuestran la capacidad de HER2-AcBs para producir potentes respuestas antitumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*, frente a las células tumorales que son resistentes a la terapia dirigida a HER2 o al trastuzumab.

6.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.2.1 Líneas celulares

Todas las líneas celulares se adquirieron de ATCC (Manassas VA) excepto: UM-SCC47, obtenida del Dr. Carey en la Universidad de Michigan; SCC-90, PCI-30 y PCI-15B, obtenidas del Dr. Robert Ferris en la Universidad de Pittsburgh; HCC1954, obtenida del Dr. Sarat Chandarlapaty del Centro Oncológico Memorial Sloan Kettering; 93-VU-147T y HeLa, obtenidas del Dr. Luc Morris; y UD-SCC2, obtenida de Henning Bier en Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik. Todas las células se autenticaron mediante obtención de perfiles de repeticiones cortas en tándem usando el sistema PowerPlex 1.2 (Promega) y se sometieron a prueba periódicamente para detectar micoplasmas usando un kit comercial (Lonza). Las líneas de células tumorales marcadas con luciferasa MCF7-Luc se generaron mediante infección retroviral con un vector SFG-GFLuc.

6.2.2.2 Diseño y expresión de HER2-AcBs en células CHO-S

En el formato HER2-AcBs IgG-scFv (figura 17A, "HER2-AcBs"), el V_H era idéntico al del V_H de IgG1 trastuzumab, excepto que se introdujo una mutación N297A en la región Fc en el HER2-AcBs para eliminar la glicosilación, reduciendo de ese modo la función de Fc (SEQ ID NO: 62). Se construyó el polipéptido de fusión de cadena ligera extendiendo la cadena ligera de IgG1 trastuzumab con un ligador C-terminal (G₄S)₃ seguido de scFv de huOKT3 (SEQ ID NO: 60). Se insertó el ADN que codificaba tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera en un vector de expresión de mamífero, se transfeció en células CHO-S y se seleccionaron los clones estables de la mayor expresión. Se recogieron los sobrenadantes de frascos de agitación y se purificó el HER2-AcBs mediante cromatografía de afinidad con proteína A. El AcBs de control, HER2-C825 (compuesto por las SEQ ID NOS: 71 y 72), se generó tal como se describió previamente (Xu *et al.*, 2015, *Cancer Immunol Res* 3:266-77; Cheal *et al.*, 2014, *Mol Cancer Ther* 13:1803-12).

6.2.2.3 Otros anticuerpos y moléculas pequeñas

Se generó HER2-AcBs marcado con fluoróforo con el kit de marcaje de IgG humana Zenon® Alexa Fluor® 488 de Life Technologies siguiendo las instrucciones del fabricante. Se adquirieron pembrolizumab, cetuximab, trastuzumab, erlotinib, lapatinib y neratinib de la farmacia del Centro Oncológico Memorial Sloan Kettering. Se resuspendieron moléculas pequeñas en DMSO. Los anticuerpos CD4, CD8, CD16 y CD56 se adquirieron de BD Biosciences (San Jose CA). El AcM 10F.9G2 específico para PD-L1 marcado con PE disponible comercialmente se adquirió de BioLegend.

6.2.2.4 Ensayos de proliferación celular

Para los ensayos de proliferación celular, se sembraron en placa 5.000 células tumorales usando RPMI-1640 complementado con FBS al 10 % en una placa de 96 pocillos durante 36 horas antes de tratarse con lapatinib o los anticuerpos a las concentraciones especificadas. Se determinó la proliferación celular usando un lector de placas de ELISA y el kit para WST-8 (Dojindo Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando la fórmula: % de tasa de supervivencia = (Muestra-fondo)/(Control negativo-fondo). El lapatinib (farmacia del Centro Oncológico Memorial Sloan Kettering) se molió con una mano y un mortero y se suspendió en DMSO tal como se describió previamente (Chen *et al.*, 2012, *Molecular cancer therapeutics* 11:660-669). Para determinar la significación estadística, se analizaron los resultados usando ANOVA de un factor usando Prism 6.0.

6.2.2.5 Ensayos de citotoxicidad (ensayo de liberación de ^{51}Cr)

Se sometió a ensayo la citotoxicidad celular mediante liberación de ^{51}Cr tal como se describió previamente (Xu *et al.*, 2015, Cancer Immunol Res 3:266-77), y se calculó la CE50 usando el software SigmaPlot. Se purificaron células T efectoras a partir de PBMC humanas usando el kit de aislamiento de células Pan T (Miltenyi Biotec), y luego se activaron y expandieron con perlas Dynabeads CD3/CD28 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante.

6.2.2.6 Expresión de PD-1/PD-L1

Para sobreexpresar PD-L1 en células HEK293, se cultivaron las células en DMEM (Cellgro) complementado con FBS inactivado por calor al 10 % y penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). El día (-1), se tripsinizaron células HEK293, se contaron y se sembraron en placas de 6 pocillos a 0,5 M células/pocillo y se mantuvieron en 2 ml de medio fresco. El día de la transfección, día (0), se intercambió el medio por 2 ml de medio fresco. Se prepararon los reactivos de transfección tal como sigue para los plásmidos de hPD-L1 y de control: se diluyeron 2,5 µg de ADN en 250 µl de DMEM sin complementar (sin suero). Se diluyeron 5 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en 250 µl de DMEM por separado (sin suero) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de 5 minutos, se combinó el ADN diluido con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) diluido y se incubó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadió gota a gota la reacción completa de 500 µl a un único pocillo de células HEK293. Se hizo oscilar la placa hacia atrás y hacia adelante brevemente para ayudar a mezclar los reactivos. Para el control no transfectado, se añadieron a un pocillo 500 µl de DMEM no complementado sin ADN o Lipofectamine 2000. Se incubaron las células a 37 °C durante 24-48 horas antes de la recogida. El día (1) o el día (2), se extrajeron las células de la placa usando EDTA 2 mM en PBS y se contaron. Se usaron 100.000-200.000 células para el análisis mediante FACS y el resto se usó para los ensayos de destrucción.

Para inducir la expresión de PD-1 de células T activadas (ATC), se incubaron células efectoras en una razón de 3:1 durante 24 horas con la línea celular de carcinoma de mama HCC1954 con un nivel alto de HER2 después de que estas células diana se incubaron con HER2-AcBs a una concentración de 10 µg/ml durante 30 minutos y se eliminó el exceso de anticuerpo. Se recogieron las células y se usaron en ensayos de citotoxicidad tal como se describió previamente frente a las células HEK293 transfectadas con PD-L1.

6.2.2.7 *In vivo* experimentos

Para estudios de terapia *in vivo*, se usaron ratones BALB-Rag2-/-IL-2R-γc-KO ("DKO") (derivados de la colonia del Dr. Mamoru Ito, CIEA, Kawasaki, Japón; véase, por ejemplo, Koo *et al.*, 2009, Expert Rev Vaccines 8:113-20 y Andrade *et al.*, 2011, Arthritis Rheum 63:2764-73). Se usaron tres modelos de xenoinjerto de ratón humanizado: (1) tumor intravenoso más células efectoras intravenosas; (2) tumor subcutáneo más células efectoras subcutáneas; y (3) tumor subcutáneo más células efectoras intravenosas. Se crearon xenoinjertos subcutáneos con 5×10^6 células suspendidas en Matrigel (Corning Corp, Tewksbury MA) y se implantaron en el flanco de ratones DKO. Se purificaron células efectoras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de capas leucocíticas adquiridas en el New York Blood Center. Antes de cada procedimiento experimental, se analizaron las PBMC para determinar su porcentaje de células CD3, CD4, CD8 y CD56 para garantizar la coherencia. Se inyectó HER2-AcBs por vía intravenosa dos veces a la semana a 100 µg/inyección, comenzando dos días antes que las células efectoras durante tres semanas, administrado como $5-10 \times 10^6$ PBMC por inyección, una vez a la semana durante 2 semanas. Se midió el tamaño tumoral usando (1) un escáner de mano TM900 (Pieira, Bruselas, BE); (2) calibres; o (3) bioluminiscencia. Se llevó a cabo la obtención de imágenes de bioluminiscencia usando el sistema de obtención de imágenes Xenogen *In Vivo* (IVIS) 200 (Caliper LifeSciences). En resumen, se inyectó a los ratones por vía intravenosa 0,1 ml de disolución de D-luciferina (Gold Biotechnology; disolución madre 30 mg/ml en PBS). Se capturaron imágenes de 1 a 2 minutos después de la inyección usando los siguientes parámetros: un tiempo de exposición de 10 a 60 segundos, agrupación (*binning*) media y 8 de número f. El análisis de imágenes de bioluminiscencia se realizó usando Living Image 2.6 (Caliper LifeSciences).

6.2.3 RESULTADOS

6.2.3.1 HER2-AcBs

Se diseñó HER2-AcBs usando un formato IgG-scFv (figura 17A). El V_H era idéntico al de IgG1 trastuzumab, excepto por la mutación N297A en la región Fc de HER2-AcBs para eliminar la glicosilación (SEQ ID NO: 62). Se construyó el polipéptido de fusión de cadena ligera extendiendo la cadena ligera de IgG1 trastuzumab con un ligador C-terminal $(G_4S)_3$ seguido de scFv de huOKT3 (Xu *et al.*, 2015, Cancer Immunol Res 3:266-77) (SEQ ID NO:60). Se insertaron los ADN que codificaban tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera en un vector de expresión de mamífero, se transfectaron en células CHO-S y se seleccionaron los clones estables de la mayor expresión. Se recogieron los sobrenadantes de frascos de agitación y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

Se muestran SEC-HPLC y SDS-PAGE de HER2-AcBs en la figura 17B y la figura 17C, respectivamente. En condiciones reductoras de SDS-PAGE, HER2-AcBs dio lugar a dos bandas a alrededor de 50 kDa, puesto que la fusión de scFv de huOKT3 con la cadena ligera de trastuzumab aumentó el peso molecular hasta aproximadamente

50 kDa. SEC-HPLC mostró un pico mayoritario (97 % mediante análisis de UV) con un peso molecular aproximado de 200 kDa, así como un pico minoritario de multímeros retirables mediante filtración en gel. El AcBs permaneció estable mediante SDS-PAGE y SEC-HPLC después de múltiples ciclos de congelación y descongelación.

6.2.3.2 HER2-AcBs retuvo la especificidad, afinidad y efectos antiproliferativos de trastuzumab

- 5 Para determinar si HER2-AcBs retuvo la especificidad y los efectos antiproliferativos de trastuzumab, se preincubó la línea celular de carcinoma de ovario SKOV3 de alta positividad para HER2 con 10 µg/ml de trastuzumab durante 30 minutos y luego se sometió a inmunotinción usando HER2-AcBs marcado con Alexa 488 (figura 18A). La incubación con trastuzumab impidió la unión de HER2-AcBs a las células SKOV3, lo que demuestra que estos anticuerpos compartían la misma especificidad. Para comparar la avidéz de HER2-AcBs para trastuzumab, se incubó la misma
- 10 línea celular con diluciones descendentes 10 veces (desde 10 µg/ml hasta 1×10^{-5} µg/ml) de trastuzumab o HER2-AcBs y se analizó mediante citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (IFM) se representó gráficamente frente a la concentración de anticuerpo en µM. La similitud en las curvas de unión confirmó que trastuzumab y HER2-AcBs tenían avidéces de unión similares para su diana HER2 común (figura 18B).

- 15 Finalmente, se trató la línea celular de carcinoma de mama sensible a trastuzumab SKBR3 con AcM de control de isotipo, lapatinib 10 mM (como control positivo), HER2-AcBs 10 µg/ml o trastuzumab 10 µg/ml durante 72 horas y se sometió a ensayo la proliferación celular. Tal como se muestra en la figura 18C, trastuzumab y HER2-AcBs tuvieron efectos antiproliferativos similares que fueron significativos en comparación con el control negativo. Como era de esperar, lapatinib mostró la mayor inhibición de la proliferación celular.

6.2.3.3 La citotoxicidad de células T redirigidas a HER2-AcBs era específica de HER2 y dependía de CD3

- 20 Para establecer la especificidad de las respuestas citotóxicas de células T en presencia de HER2-AcBs; se sometieron a ensayo líneas celulares negativas para HER2 y positivas para HER2 en ensayos de citotoxicidad usando ATC (razón efector:célula T ("E:T") de 10:1) y HER2-AcBs a concentraciones decrecientes (figura 19A y figura 20). No hubo citotoxicidad para las líneas celulares negativas para HER2. Para demostrar la dependencia de la citotoxicidad de CD3, se sometió a prueba la citotoxicidad de HER2-AcBs en presencia del AcM de bloqueo específico de CD3, OKT3
- 25 (figura 19B). La preincubación con o bien trastuzumab o bien OKT3 impidió la citotoxicidad mediada por células T de HER2-AcBs.

6.2.3.4 HER2-AcBs medió en la citotoxicidad frente a líneas celulares positivas para HER2 que eran resistentes a otras terapias dirigidas a HER2.

- 30 Varias líneas celulares de diferentes sistemas tumorales (por ejemplo, cabeza y cuello, mama y sarcoma) se caracterizaron por su nivel de expresión de HER2 mediante citometría de flujo (figura 20). En este panel, el 75 % de estas células fueron positivas en la prueba de la expresión de HER2 mediante citometría de flujo. Se sometieron a ensayo líneas celulares representativas para determinar su sensibilidad a inhibidores de tirosina cinasa (por ejemplo, erlotinib, lapatinib y neratinib), o anticuerpos contra HER (por ejemplo, trastuzumab y cetuximab), así como la citotoxicidad de células T mediada por HER2-AcBs. La figura 21 muestra ejemplos representativos de estos
- 35 experimentos de tres líneas diferentes de tres sistemas tumorales diferentes. Tal como se muestra, la expresión de HER2, incluso en pequeñas cantidades, fue suficiente para mediar en la citotoxicidad de células T en presencia de ATC y HER2-AcBs en líneas celulares que de otro modo serían resistentes *in vitro* a las terapias dirigidas a HER. Cuando se evaluó la citotoxicidad de estas líneas celulares en presencia de ATC y HER2-AcBs, la sensibilidad a HER2-AcBs, expresada como CE50, se correlacionó fuertemente con la expresión de HER2 en la superficie (figura
- 40 22).

6.2.3.5 La citotoxicidad de células T mediada por HER2-AcBs fue relativamente insensible a la expresión de PD-L1 en la diana tumoral o la expresión de PD-1 en células T.

- Se sabe que la activación de CTL específicos del tumor en el microentorno tumoral fomenta la expresión de PD-1/PD-L1, lo que conduce al agotamiento o la supresión de las células T, un fenómeno denominado "resistencia inmunitaria adaptativa" (Tumeh *et al.*, 2014, Nature 515:568-71). También se ha informado de que la presencia de la ruta de PD-1/PD-L1 limita los efectos antitumorales de los anticuerpos biespecíficos que atacan a las células T (Junttila *et al.*, 2014, Cancer Res 74:5561-71). Para determinar si HER2-AcBs tenía las mismas limitaciones, se usaron ATC positivos para PD-1 frente a la línea celular de carcinoma de mama HCC1954 positiva para HER2 y positiva para PD-L1, con o sin el AcM específico de PD-1, pembrolizumab. Tal como se muestra en la figura 23A, la figura 23B y la figura 23C,
- 50 las células T positivas para PD-1 generaron respuestas citotóxicas similares en presencia de HER2-AcBs, independientemente de la presencia de pembrolizumab. Cuando se transfectaron células renales embrionarias humanas positivas para HER2 (HEK-293) con la secuencia completa de PD-L1 y se usaron como dianas, la citotoxicidad frente a las células que expresan PD-L1 no fue significativamente diferente de la citotoxicidad observada en células HEK-293 no transfectadas (aunque la citotoxicidad máxima fue ligeramente menor con HEK-293 positivas para PD-L1 frente a HEK-293 negativas para PD-L1) (La figura 24A y la figura 24B muestran el promedio de seis experimentos, y las barras de error representan el error estándar).
- 55

6.2.3.6 HER2-AcBs fue eficaz frente a xenoinjertos positivos para HER2

Para determinar el *in vivo* eficacia de HER2-AcBs, se usaron las líneas celulares de carcinoma de mama HCC1954 (HER2-high) y MCF-7 (HER2-low) en modelos de xenoinjerto en ratones DKO. Se usaron tres modelos tumorales que difieren en las ubicaciones tumorales y en las rutas efectoras: (1) células tumorales intravenosas y PBMC efectoras intravenosas; (2) células tumorales subcutáneas y PBMC s.c.; y (3) células tumorales subcutáneas y PBMC intravenosas. La figura 25 resume los resultados de estos experimentos. Las células MCF-7-luc HER2-low (portadoras de indicador de luciferasa) se inocularon mediante inyección en la vena de la cola en DKO. Cuando se confirmó la presencia de tumor mediante bioluminiscencia, se trataron los ratones con seis dosis de HER2-AcBs intravenoso o AcBs de control dos veces a la semana durante 3 semanas. Se administraron PBMC efectoras intravenosas 48 horas después de la primera dosis de HER2-AcBs, y de nuevo (una semana después). Se evaluó la carga tumoral de los ratones usando bioluminiscencia de luciferina cada semana. En este modelo de enfermedad hematológica, las células MCF-7 se erradicaron completamente sin progresión de la enfermedad (figura 25B). Esta misma línea celular se implantó por vía subcutánea mezclada con PBMC efectoras por vía subcutánea y se trató con cuatro inyecciones de HER2-AcBs dos veces a la semana durante 2 semanas (totalizando 4 inyecciones en el primer experimento) o dos veces a la semana durante 3 semanas (totalizando 6 inyecciones en el segundo experimento). En ambos experimentos, HER2-AcBs provocó un retardo significativo en la progresión tumoral mientras que PBMC + trastuzumab o PBMC solas fueron ineficaces (figura 25A). En otros dos experimentos independientes, se mezcló la línea celular de carcinoma de mama subcutánea positiva para HER2, HCC1954, con PBMC subcutáneas. De nuevo, tanto 4 como 6 inyecciones de HER2-AcBs dieron como resultado una supresión completa del crecimiento tumoral, mientras que el trastuzumab o el AcBs de control HER2-C825 no tuvieron ningún efecto (figura 25C). En el tercer modelo, en el que se trataron xenoinjertos subcutáneos de HCC1954 con PBMC intravenosas (una vez a la semana durante 3 semanas) y HER2-AcBs intravenoso dos veces a la semana durante 3 semanas, se retardó sustancialmente el crecimiento tumoral (en 2 experimentos independientes), en contraste con sólo efectos moderados para trastuzumab + huOKT3 + PBMC, anticuerpo de control (HER2-C825) + PBMC, huOKT3 + PBMC o HER2-AcBs solo sin PBMC (figura 25D). Se hizo la siguiente observación: cuando se mezclaron las PBMC efectoras con células tumorales por vía subcutánea, se observó una regresión tumoral completa sin recurrencia en los ratones durante 90 días tras la implantación tumoral. Cuando se administraron PBMC efectoras por vía intravenosa, hubo una reducción significativa del tamaño de los tumores, pero sólo se observó una regresión completa en un subconjunto de animales.

6.2.4 CONCLUSIONES

Este ejemplo describe un AcBs específico de HER2 que ha demostrado tener una potente actividad antitumoral mediada por células T *in vitro* e *in vivo*, la ablación de tumores o el retardo del crecimiento tumoral en 3 modelos de tumores independientes en presencia de PBMC humanas. A diferencia de los anticuerpos biespecíficos monovalentes, este HER2-AcBs tenía una capacidad antiproliferativa idéntica a la del trastuzumab. Además, la semivida en suero y el área bajo la curva de HER2-AcBs fueron similares a las de IgG. A diferencia de otros anticuerpos biespecíficos, que tendían a agregarse, HER2-AcBs se mantuvo estable a -20 °C y 37 °C, a pesar del almacenamiento a largo plazo. Más importante aún, la citotoxicidad mediada por células T que indujo fue relativamente insensible a la inhibición por la ruta de PD-1/PD-L1.

En comparación con las plataformas existentes que se seleccionan como diana HER2, HER2-AcBs ofrece ventajas. El formato F(ab) x F(ab), aunque eficaz *in vitro*, era de tamaño similar a blinatumomab (Sanford, 2015, Drugs, 75:321-7.) y se esperaba que compartiera perfiles farmacocinéticos y de toxicidad similares (Shalaby *et al.*, 1995, Clin Immunol Immunopathol 74:185-92, 1995), que tuviese una semivida corta, por lo que requeriría infusiones diarias, una posible fuga al sistema nervioso central (SNC), una posible toxicidad para el SNC y un posible síndrome de liberación de citocinas significativo. Además, la capacidad antiproliferativa de este sistema univalente F(ab) x F(ab) fue 10 veces menor que la de trastuzumab. El conjugado químico IgG x IgG entre trastuzumab y OKT3 fue útil para armar células T *ex vivo*, pero no fue útil como producto inyectable, probablemente debido a las impurezas asociadas con los conjugados químicos (Lum y Thakur, 2011, BioDrugs 25:365-79; Lum *et al.*, Clin Cancer Res 21:2305, 2015); en cambio, el HER2-AcBs proporcionado en el presente documento se tolera como producto inyectable. Recientemente se describió un formato de heterodímero usando un sistema monovalente (Junttila *et al.*, 2014, Cancer Res 74:5561-71) que no conserva los efectos antiproliferativos de trastuzumab retenidos en HER2-AcBs.

Hay otras características de diseño que distinguen a HER2-AcBs de otros candidatos conocidos de esta clase. A diferencia de la mayoría de los anticuerpos biespecíficos, la unión bivalente de HER2-AcBs a la diana de HER2 se conservó, proporcionando una actividad antiproliferativa similar a la de IgG1 trastuzumab. A diferencia de F(ab) x F(ab) (Shalaby *et al.*, 1995, Clin Immunol Immunopathol 74:185-92) o constructos de scFv en tándem (Sanford, 2015, Drugs, 75:321-7), HER2-AcBs tenía un peso molecular lo suficientemente alto como para comportarse en análisis farmacocinéticos como una IgG silvestre. A diferencia de otros anticuerpos biespecíficos bivalentes (Reusch *et al.*, MAbs, 7:584, 2015), la reacción de HER2-AcBs con CD3 fue funcionalmente monovalente. HER2-AcBs también difería de los anticuerpos biespecíficos heterodiméricos del hombre en su Fc modificado, en el que la aglicosilación eliminó las funciones de ADCC y CMC, reduciendo de ese modo el síndrome de liberación de citocinas sin afectar la farmacocinética sérica ni comprometer la activación de células T. La otra ventaja es la capacidad de fabricación; se produjo HER2-AcBs en células CHO y se purificó usando procedimientos convencionales para IgG, sin agregación significativa a pesar de la incubación prolongada a 37 °C. HER2-AcBs es una opción de rescate importante para los pacientes que progresan con las terapias basadas en HER2 convencional, o un reemplazo del trastuzumab dadas sus propiedades duales antiproliferativas y de redireccionamiento de células T.

Lista de secuencias

<110> Centro Oncológico Memorial Sloan Kettering
 <120> Moléculas de unión a HER2 y CD3 biespecíficas
 <130> 104846PCEP

5 <140> 15750184.2
 <141> 24-07-2015
 <150> Documento US 62/029.342
 <151> 25-07-2014
 <160> 72

10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 4664
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <300>
 <308> NM_004448.3
 <309> 26-05-2014
 <313> (1)..(4664)
 <400> 1

gcttgctccc aatcacagga gaaggaggag gtggaggagg agggctgctt gaggaagtat	60
aagaatgaag ttgtgaagct gagattcccc tccattggga ccggagaaac caggggagcc	120
ccccgggcag ccgcgcgcgc cttcccacgg ggccctttac tgcgcgcgcg gcccgcccc	180
caccctcgc agcaccgcgc gccccgcgcg ctcccagccg ggtccagccg gagccatggg	240
gccggagccg cagtgaagcag catggagctg gcggccttgt gccgctgggg gctcctcctc	300
gccctcttgc cccccggagc cgcgagcacc caagtgtgca ccggcacaga catgaagctg	360
cggctccctg ccagtccga gaccacctg gacatgctcc gccacctcta ccagggtgc	420
caggtggtgc agggaaacct ggaactcacc tacctgccca ccaatgccag cctgtccttc	480
ctgcaggata tccaggaggt gcagggctac gtgctcatcg ctcaacaacca agtgaggcag	540
gtcccactgc agaggctgcg gattgtgcga ggcaccagc tctttgagga caactatgcc	600
ctggccgtgc tagacaatgg agaccgctg aacaatacca ccctgtcac aggggcctcc	660
ccaggaggcc tgcgggagct gcagcttcga agcctcacag agatcttgaa aggaggggtc	720
ttgatccagc ggaaccccc gctctgtac caggacacga ttttgtggaa ggacatcttc	780
cacaagaaca accagctggc tctcacactg atagacacca accgctctcg ggctgccac	840
ccctgttctc cgatgtgtaa gggctccgcg tgctggggag agagttctga ggattgtcag	900
agcctgacgc gcactgtctg tgccgggtggc tgtgcccgct gcaaggggcc actgccact	960
gactgctgcc atgagcagtg tgctgccggc tgcacgggcc ccaagcactc tgactgcctg	1020

20

ES 2 832 704 T3

gcctgcctcc	acttcaacca	cagtggcatc	tgtgagctgc	actgcccagc	cctggtcacc	1080
tacaacacag	acacgtttga	gtccatgccc	aatccccagg	gccggtatac	attcggcgcc	1140
agctgtgtga	ctgcctgtcc	ctacaactac	ctttctacgg	acgtgggatac	ctgcaccctc	1200
gtctgcccc	tgcacaacca	agaggtgaca	gcagaggatg	gaacacagcg	gtgtgagaag	1260
tgcagcaagc	cctgtgcccc	agtgtgctat	ggtctgggca	tggagcactt	gcgagagggtg	1320
agggcagtta	ccagtgccaa	tatccaggag	tttgctggct	gcaagaagat	ctttgggagc	1380
ctggcatttc	tgccggagag	ctttgatggg	gacccagcct	ccaacactgc	cccgtccag	1440
ccagagcagc	tccaagtgtt	tgagactctg	gaagagatca	caggttacct	atacatctca	1500
gcattggccg	acagcctgcc	tgacctcagc	gtcttccaga	acctgcaagt	aatccgggga	1560
cgaattctgc	acaatggcgc	ctactcgctg	accctgcaag	ggctgggcat	cagctggctg	1620
gggctgcgct	cactgaggga	actgggcagt	ggactggccc	tcatccacca	taacacccac	1680
ctctgcttcg	tgcacacggg	gccctgggac	cagctctttc	ggaacccgca	ccaagctctg	1740
ctccacactg	ccaaccggcc	agaggacgag	tgtgtgggcg	agggcctggc	ctgccaccag	1800
ctgtgcgccc	gagggcactg	ctgggggtcca	gggcccaccc	agtgtgtcaa	ctgcagccag	1860
ttccttcggg	gccaggagtg	cgtggaggaa	tgccgagtac	tgcaggggct	ccccagggag	1920
tatgtgaatg	ccaggcactg	tttgccgtgc	caccctgagt	gtcagcccca	gaatgggtca	1980
gtgacctgtt	ttggaccgga	ggctgaccag	tgtgtggcct	gtgccacta	taaggaccct	2040
cccttctgcg	tggcccgtcg	ccccagcggg	gtgaaacctg	acctctccta	catgcccatac	2100
tggaaagtttc	cagatgagga	gggcgcatgc	cagccttgcc	ccatcaactg	caccactcc	2160
tgtgtggacc	tggatgacaa	gggctgcccc	gccgagcaga	gagccagccc	tctgacgtcc	2220
atcatctctg	cgggtggttg	cattctgctg	gtcgtggtct	tgggggtggt	ctttgggatac	2280
ctcatcaagc	gacggcagca	gaagatccgg	aagtacacga	tgcggagact	gctgcaggaa	2340
acggagctgg	tggagccgct	gacacctagc	ggagcgatgc	ccaaccaggc	gcagatgcgg	2400
atcctgaaag	agacggagct	gaggaagggtg	aagggtgctt	gatctggcgc	ttttggcaca	2460
gtctacaagg	gcatctggat	ccctgatggg	gagaatgtga	aaattccagt	ggccatcaaa	2520
gtgttgaggg	aaaacacatc	ccccaaagcc	aacaaagaaa	tcttagacga	agcatacgtg	2580
atggctgggtg	tgggctcccc	atatgtctcc	cgccttctgg	gcatctgcct	gacatccacg	2640
gtgcagctgg	tgacacagct	tatgccctat	ggctgcctct	tagaccatgt	ccgggaaaac	2700
cgcggacgcc	tgggctccca	ggacctgctg	aactgggtga	tgcagattgc	caaggggatg	2760
agctacctgg	aggatgtgcg	gctcgtacac	agggacttgg	ccgctcggaa	cgtgctggtc	2820
aagagtccca	accatgtcaa	aattacagac	ttcgggctgg	ctcggctgct	ggacattgac	2880
gagacagagt	accatgcaga	tgggggcaag	gtgcccatac	agtggatggc	gctggagtcc	2940

ES 2 832 704 T3

```

attctccgcc gccggttcac ccaccagagt gatgtgtgga gttatggtgt gactgtgtgg 3000
gagctgatga ctttttggggc caaaccttac gatgggatcc cagcccggga gatccctgac 3060
ctgctggaaa agggggagcg gctgccccag cccccatct gcaccattga tgtctacatg 3120
atcatggtca aatgttggat gattgactct gaatgtcggc caagattccg ggagttggtg 3180
tctgaattct cccgcatggc cagggacccc cagcgccttg tggcatcca gaatgaggac 3240
ttgggcccag ccagtccctt ggacagcacc ttctaccgct cactgctgga ggacgatgac 3300
atgggggacc tgggtggatgc tgaggagtat ctggtacccc agcagggctt cttctgtcca 3360
gaccctgccc cgggcgctgg gggcatggtc caccacaggc accgcagctc atctaccagg 3420
agtggcggtg gggacctgac actagggctg gagccctctg aagaggaggc cccaggtct 3480
ccactggcac cctccgaagg ggctggctcc gatgtatttg atggtgacct gggaatgggg 3540
gcagccaagg ggtgcaaag cctccccaca catgaccca gccctctaca gcggtacagt 3600
gaggacccca cagtaccctt gccctctgag actgatggct acgttgcccc cctgacctgc 3660
agccccagc ctgaatatgt gaaccagcca gatgttcggc cccagccccc ttgccccga 3720
gagggccctc tgcctgctgc ccgacctgct ggtgccactc tggaaaggcc caagactctc 3780
tccccaggga agaatggggt cgtcaaagac gtttttgcct ttgggggtgc cgtggagaac 3840
cccgagtact tgacacccca gggaggagct gccctcagc cccaccctcc tctgccttc 3900
agcccagcct tcgacaacct ctattactgg gaccaggacc caccagagcg gggggctcca 3960
cccagcacct tcaaagggac acctacggca gagaacccag agtacctggg tctggacgtg 4020
ccagtgtgaa ccagaaggcc aagtccgcag aagccctgat gtgtcctcag ggagcagggg 4080
aggcctgact tctgctggca tcaagaggtg ggagggccct ccgaccactt ccaggggaac 4140
ctgccatgcc aggaacctgt cctaaggaa cttccttcct gcttgagttc ccagatggct 4200
ggaaggggtc cagcctcgtt ggaagaggaa cagcactggg gagtctttgt ggattctgag 4260
gccctgcca atgagactct aggggtccagt ggatgccaca gccagcttg gccctttcct 4320
tccagatcct ggttactgaa agccttaggg aagctggcct gagaggggaa gcggccctaa 4380
gggagtgtct aagaacaaaa gcgaccatt cagagactgt ccctgaaacc tagtactgcc 4440
cccatgagg aaggaacagc aatgggtgtca gtatccaggc tttgtacaga gtgcttttct 4500
gtttagtttt tacttttttt gttttgtttt tttaaagatg aaataaagac ccagggggag 4560
aatgggtgtt gtatggggag gcaagtgtgg ggggtccttc tccacacca ctttgtccat 4620
ttgcaaatat attttggaaa acagctaaaa aaaaaaaaaa aaaa 4664

```

<210> 2

<211> 1255

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<300>

<308> NP_004439.2

<309> 26-05-2014

ES 2 832 704 T3

<313> (1)..(1255)

<400> 2

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

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

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

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

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

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

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

ES 2 832 704 T3

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

ES 2 832 704 T3

465		470		475		480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr						
		485		490		495
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His						
		500		505		510
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys						
		515		520		525
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys						
		530		535		540
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys						
		545		550		555
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys						
		565		570		575
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp						
		580		585		590
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu						
		595		600		605
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln						
		610		615		620
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys						
		625		630		635
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser						
		645		650		655
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly						
		660		665		670
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg						
		675		680		685
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly						
		690		695		700
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu						
		705		710		715
						720

ES 2 832 704 T3

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750
 Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780
 Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800
 Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815
 Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830
 Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845
 Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860
 Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880
 Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895
 Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 900 905 910
 Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925
 Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 930 935 940
 Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960
 Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
 965 970 975

ES 2 832 704 T3

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
 1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
 1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
 1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
 1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
 1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
 1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
 1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
 1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

<210> 3

<211> 3780

<212> ADN

<213> Cánido

5 <300>

<308> NM_001003217.1

<309> 23-02-2014

<313> (1)..(3780)

<400> 3

atggagctgg	cggcctggtg	cagctggggg	ctccttctcg	ccctcctgcc	ctccggagcc	60
gcgggcaccc	aagtgtgcac	cggcacagac	atgaagctcc	ggctcccggc	cagtcccag	120
accacactgg	atatgctccg	ccacctgtac	cagggctgtc	aagtgggtaca	ggggaacctg	180
gagctcactt	acctgcctgc	caatgccagc	ctgtccttcc	tgcaggatat	ccaggaggtg	240
cagggctatg	tgtcatttgc	tcacagccaa	gtgaggcaga	tcccactgca	gaggctacga	300
atttgtcgag	gcacccagct	ctttgaggac	aactacgccc	tggccgtgct	ggacaatgga	360
gacccgctgg	aggggtggcat	ccctgcacca	ggggcgggcc	aaggagggct	gcgggagctg	420
cagcttcgaa	gcctcacaga	gatcctgaag	ggaggggtct	tgattcagcg	gagcccgag	480
ctctgccacc	aggacacgat	tttatggaag	gacgtcttcc	ataagaacaa	ccagctggcc	540
ctcacgctga	tagacaccaa	cgccttttcg	gcctgccgcg	cctgttctcc	agcttgtaaa	600
gacgcccact	gctggggggc	cagctccggg	gactgtcaga	gcttgacgcg	gactgtctgt	660
gccgggggct	gtgcccgctg	caagggccca	caaccacccg	actgctgcca	cgagcagtgt	720
gctgctgggt	gcacggggcc	caagcactct	gactgcctgg	cctgccttca	cttcaaccac	780
agtggcatct	gtgagctgca	ctgccagacc	ctggtcacct	acaacacgga	caccttcgaa	840
tccatgccca	accctgaggg	cgatataacc	ttcggggcca	gctgtgtgac	ctcctgtccc	900
tacaactacc	tgtctacgga	tgtgggatcc	tgcaccctgg	tctgtcccct	gaacaaccaa	960
gaggtgacgg	ctgaggatgg	gacacagcgg	tgcgagaaat	gcagcaagcc	ctgtgcccga	1020
gtgtgctacg	gtctgggcat	ggagcacctg	cgagaggtga	gagcgggtcac	cagtgcgaac	1080
atccaggagt	ttgccggctg	caagaagatc	tttgaagcc	tggcattttt	gccagagagc	1140

10

ES 2 832 704 T3

tttgatgggg	accagcctc	caacactgcc	cccctacagc	ctgagcagct	cagagtgttt	1200
gaggctctgg	aggagatcac	aggttacctg	tacatctcag	cgtggccaga	cagcctgcct	1260
aacctcagtg	tcttccagaa	cctgcgagta	atccggggac	gagttctgca	tgatgggtgcc	1320
tactcgctga	ccctgcaagg	gctgggcatac	agctggctgg	ggctgcgcctc	gctgcgggaa	1380
ctgggcagtg	ggctggccct	catccaccgc	aacgcccgcc	tttgcttcgt	gcacacggtg	1440
ccctgggacc	agctcttccg	gaacccccac	caggccctgc	tccatagtgc	caaccggcca	1500
gaggaggagt	gcgtgggcga	gggectggcc	tgtaccctct	gtgcccatgg	gcactgctgg	1560
ggtccagggc	ccaccagtg	cgtcaactgc	agccaattcc	tccggggcca	ggagtgcgtg	1620
gaggaatgcc	gagtactgca	ggggctgccc	cagagtatg	tgaaggacag	gtactgtcta	1680
ccgtgccact	cagagtgtca	gccccagaat	ggctcagtga	cctgtttcgg	atcggaggct	1740
gaccagtgtg	tggcctgcgc	ccactacaag	gacctccct	tctgtgtggc	tcgtgcccc	1800
agtgtgtga	aacctgacct	gtccttcattg	cccatctgga	agttcgcaga	tgaggagggc	1860
acttgccagc	cgtgccccat	caactgcacc	cactcctgtg	cggacctgga	cgagaagggc	1920
tgtcccgccg	agcagagagc	cagccctgtg	acatccatca	ttgccgctgt	ggtgggcatt	1980
ctgctggctg	tggctgtggg	gctggtcctc	ggcatcctga	tcaagcgaag	gcggcagaag	2040
atccggaagt	acactatgcg	gaggctgctg	caggaaaccg	agctggtgga	gccgctgacg	2100
cctagtggag	cgatgcccaa	ccaggctcag	atgcggatcc	tgaagagagc	agagctgagg	2160
aaggtgaagg	tgcttggtatc	cggagctttt	ggcacagtct	acaagggcat	ctggatccct	2220
gatggggaaa	atgtgaaaat	cccagtggcc	atcaaagtgt	tgagggaaaa	cacatctccc	2280
aaagccaaca	aagaaatctt	ggacgaagca	tatgtgatgg	ctggagtggg	ctccccgtat	2340
gtgtcccgcc	tcctgggcat	ctgcctgaca	tccacggtgc	agctggtgac	acagcttatg	2400
ccctacggct	gcctcttaga	ccatgtccga	gaacaccgtg	ggcgccctgg	ctcccaggac	2460
ttgctgaact	gggtgtgtgca	gattgccaag	gggatgagct	acttgaggga	tgtccggctg	2520
gtgcacaggg	acctggctgc	cgggaatgtg	ctgggtcaaga	gtcccaacca	tgtcaagatt	2580
acagatttctg	ggctggctcg	gttgctggac	atcgacgaga	cagagtacca	tgcggatggg	2640
ggcaagggtgc	ccatcaagtg	gatggcgctg	gagtcattc	ctccgcggcg	gttcacccac	2700
cagagtgatg	tgtggagcta	tgggtgtgact	gtgtgggaac	tgatgacttt	tggggccaaa	2760
ccttatgatg	ggatcccagc	cggggagatc	cctgacctgc	tggagaaggg	ggaacggctg	2820
ccccagcccc	ccatctgcac	cattgatgtc	tacatgatca	tgggtcaagtg	ctggatgata	2880
gactctgaat	gccgaccccg	gttccgggag	ttgggtggccg	aattctcacg	tatggccagg	2940
gacccccagc	gctttgtggg	cattcagaat	gaagacttgg	gccccgccag	ccccttgga	3000
agcaccttct	accgttcact	actggaagat	gatgacatgg	gggacctggg	ggatgctgag	3060

ES 2 832 704 T3

gagtacctgg taccacagca gggtttcttc tgcccagaac ctacccagc ggctgggggc 3120
 actgcccacc gacggcaccg cagctcatcc accaggaatg gcggtggtga gctgactcta 3180
 ggactggagc cctccgagga ggagcccccc aagtctccac tggcaccctc agagggcgct 3240
 ggctctgacg tgtttgatgg tgacttgga atgggggcag ccaaggggct gcagagcctt 3300
 ccctcacagg accccagccc tctccagcgg tacagtgagg accctacggt acccttgccc 3360
 cctgagactg atggttaagg tgccccctg acctgcagcc cccagcctga atatgtgaac 3420
 cagccagaag tttggccgca gccccccctt gccctagaag gccctttgcc tccttccga 3480
 ccggctggtg ccactctgga aaggcccaag actctgtccc ccaagactct ctcccctggc 3540
 aagaatgggg tttgcaaaga cgtttttgcc tttgggagtg ctgtggagaa tccggagtac 3600
 ctggcaccac ggggcagagc tgcccctcag cccaccctc ctccagcctt cagcccagcc 3660
 tttgacaacc tgtattactg ggaccaggat ccatcagagc ggggctctcc acccagcacc 3720
 tttgaaggga ccctacagc agagaaccg gagtacctgg ggctggacgt gccagtgtga 3780

<210> 4

<211> 1259

<212> PRT

5 <213> Cánido

<300>

<308> NP_001003217.1

<309> 23-02-2014

<313> (1)..(1259)

10 <400> 4

Met Glu Leu Ala Ala Trp Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

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

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60

Leu Pro Ala Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Ser Gln Val Arg Gln Ile Pro Leu
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr

ES 2 832 704 T3

100					105					110					
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Gly	Gly	Ile	Pro
		115					120					125			
Ala	Pro	Gly	Ala	Ala	Gln	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser
		130					135					140			
Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Ser	Pro	Gln
		145			150							155			
Leu	Cys	His	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Val	Phe	His	Lys	Asn
				165					170					175	
Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Phe	Ser	Ala	Cys
				180					185					190	
Pro	Pro	Cys	Ser	Pro	Ala	Cys	Lys	Asp	Ala	His	Cys	Trp	Gly	Ala	Ser
		195					200					205			
Ser	Gly	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys
		210					215					220			
Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Gln	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys
		225					230					235			
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu
				245							250			255	
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val
				260					265					270	
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg
		275					280							285	
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ser	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu
		290					295					300			
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	Asn	Asn	Gln
		305					310					315			320
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys
				325											335
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu
				340					345					350	

ES 2 832 704 T3

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Arg Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Ala Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 Asp Ser Leu Pro Asn Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Arg Val Ile Arg
 420 425 430
 Gly Arg Val Leu His Asp Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460
 Leu Ala Leu Ile His Arg Asn Ala Arg Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Ser
 485 490 495
 Ala Asn Arg Pro Glu Glu Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys Tyr
 500 505 510
 Pro Cys Ala His Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val
 515 520 525
 Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg
 530 535 540
 Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Lys Asp Arg Tyr Cys Leu
 545 550 555 560
 Pro Cys His Ser Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe
 565 570 575
 Gly Ser Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro
 580 585 590
 Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser
 595 600 605

ES 2 832 704 T3

Phe Met Pro Ile Trp Lys Phe Ala Asp Glu Glu Gly Thr Cys Gln Pro
 610 615 620
 Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Ala Asp Leu Asp Glu Lys Gly
 625 630 635 640
 Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Val Thr Ser Ile Ile Ala Ala
 645 650 655
 Val Val Gly Ile Leu Leu Ala Val Val Val Gly Leu Val Leu Gly Ile
 660 665 670
 Leu Ile Lys Arg Arg Arg Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg
 675 680 685
 Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala
 690 695 700
 Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg
 705 710 715 720
 Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly
 725 730 735
 Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys
 740 745 750
 Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp
 755 760 765
 Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu
 770 775 780
 Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met
 785 790 795 800
 Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu His Arg Gly Arg Leu
 805 810 815
 Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met
 820 825 830
 Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg
 835 840 845
 Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly
 850 855 860

ES 2 832 704 T3

Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly
 865 870 875 880
 Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Pro Pro Arg
 885 890 895
 Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp
 900 905 910
 Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg
 915 920 925
 Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro
 930 935 940
 Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile
 945 950 955 960
 Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ala Glu Phe Ser
 965 970 975
 Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp
 980 985 990
 Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu
 995 1000 1005
 Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu
 1010 1015 1020
 Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Glu Pro Thr Pro Gly Ala
 1025 1030 1035
 Gly Gly Thr Ala His Arg Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Asn
 1040 1045 1050
 Gly Gly Gly Glu Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu
 1055 1060 1065
 Pro Pro Lys Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp
 1070 1075 1080
 Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln
 1085 1090 1095
 Ser Leu Pro Ser Gln Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu

ES 2 832 704 T3

1100 1105 1110
 Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Pro Glu Thr Asp Gly Lys Val Ala
 1115 1120 1125
 Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Glu
 1130 1135 1140
 Val Trp Pro Gln Pro Pro Leu Ala Leu Glu Gly Pro Leu Pro Pro
 1145 1150 1155
 Ser Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu Ser
 1160 1165 1170
 Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val
 1175 1180 1185
 Phe Ala Phe Gly Ser Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Ala Pro
 1190 1195 1200
 Arg Gly Arg Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser
 1205 1210 1215
 Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Ser Glu
 1220 1225 1230
 Arg Gly Ser Pro Pro Ser Thr Phe Glu Gly Thr Pro Thr Ala Glu
 1235 1240 1245
 Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

<210> 5

<211> 1311

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<300>

<308> NM_000073.2

<309> 03-05-2014

<313> (1)..(1311)

10 <400> 5

agtctagctg ctgcacaggc tggctggctg gctggctgct aagggtgct ccacgctttt	60
gccggaggac agagactgac atggaacagg ggaaggcct ggctgtcctc atcctggcta	120
tcattcttct tcaaggtact ttggcccagt caatcaaagg aaaccacttg gttaaggtgt	180
atgactatca agaagatggt tcggtacttc tgacttgtga tgcagaagcc aaaaatatca	240
catggtttaa agatgggaag atgatcggct tcctaactga agataaaaaa aaatggaatc	300

ES 2 832 704 T3

```

tggaagtaa tgccaaggac cctcgaggga tgtatcagtg taaaggatca cagaacaagt 360
caaaaccact ccaagtgtat tacagaatgt gtcagaactg cattgaacta aatgcagcca 420
ccatatctgg ctttctcttt gctgaaatcg tcagcatttt cgtccttgct gttggggctct 480
acttcattgc tggacaggat ggagttcgcc agtcgagagc ttcagacaag cagactctgt 540
tgcccaatga ccagctctac cagcccctca aggatcgaga agatgaccag tacagccacc 600
ttcaaggaaa ccagttgagg aggaattgaa ctcaggactc agagtagtcc aggtgttctc 660
ctcctattca gttcccagaa tcaaagcaat gcattttgga aagctcctag cagagagact 720
ttcagcccta aatctagact caaggttccc agagatgaca aatggagaag aaaggccatc 780
agagcaaatt tggggggttc tcaaataaaa taaaaataaa aacaaatact gtgtttcaga 840
agcgccacct attggggaaa attgtaaaag aaaaatgaaa agatcaaata accccctgga 900
tttgaatata attttttgtg ttgtaatttt tatttcgttt ttgtataggt tataattcac 960
atggctcaaa tattcagtga aagctctccc tccaccgcca tcccctgcta cccagtgacc 1020
ctgttgccct cttcagagac aaattagttt ctcttttttt tttttttttt tttttttttg 1080
agacagtctg gctctgtcac ccaggctgaa atgcagtggc accatctcgg ctactgcaa 1140
cctctgcctc ctgggttcaa gcgattctcc tgcctcagcc tcccgggcag ctgggattac 1200
aggcacacac taccacacct ggctaatttt tgtattttta gtagagacag ggttttgctc 1260
tgttggccaa gctggtctcg aactcctgac ctcaagtgat ccgcccgcct c 1311

```

<210> 6

<211> 182

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<300>

<308> NP_000064.1

<309> 03-05-2014

<313> (1)..(182)

10 <400> 6

```

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1          5          10          15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
          20          25          30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
          35          40          45

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

```

ES 2 832 704 T3

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 7

<211> 771

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<300>

<308> NM_000732.4

<309> 03-05-2014

<313> (1)..(771)

10 <400> 7

agagaagcag	acatcttcta	gttcctcccc	cactctcttc	tttccggtac	ctgtgagtca	60
gctaggggag	ggcagctctc	accaggtctg	atagttcggt	gacctggctt	tatctactgg	120
atgagttccg	ctgggagatg	gaacatagca	cgtttctctc	tggcctggta	ctggctaccc	180
ttctctcgca	agtgagcccc	ttcaagatac	ctatagagga	acttgaggac	agagtgtttg	240
tgaattgcaa	taccagcatc	acatgggtag	agggaacggt	gggaacactg	ctctcagaca	300
ttacaagact	ggacctggga	aaacgcatcc	tggacccacg	aggaatatat	aggtgtaatg	360
ggacagatat	atacaaggac	aaagaatcta	ccgtgcaagt	tcattatcga	atgtgccaga	420
gctgtgtgga	gctggatcca	gccaccgtgg	ctggcatcat	tgctactgat	gtcattgcca	480
ctctgtctct	tgctttggga	gtcttctgct	ttgctggaca	tgagactgga	aggctgtctg	540
gggctgccga	cacacaagct	ctgttgagga	atgaccaggt	ctatcagccc	ctccgagatc	600

gagatgatgc tcagtagcgc caccttggag gaaactgggc tcggaacaag tgaacctgag 660
 actggtggct tctagaagca gccattacca actgtacctt cccttcttgc tcagccaata 720
 aatatatcct ctttcactca gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 771

<210> 8

<211> 171

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<300>

<308> NP_000723.1

<309> 03-05-2014

<313> (1)..(171)

10 <400> 8

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
 20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
 35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
 50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
 65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
 85 90 95

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

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
 115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
 130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
 145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
 165 170

<210> 9

<211> 1534

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<300>

<308> NM_000733.3

<309> 03-05-2014

5 <313> (1)..(1534)

<400> 9

tattgtcaga gtcctcttgt ttggccttct aggaaggctg tgggacccag ctttcttcaa	60
ccagtccagg tggaggcctc tgccttgaac gtttccaagt gaggtaaaac ccgcaggccc	120
agaggcctct ctacttcctg tgtgggggtc agaaaccctc ctcccctccc agcctcaggt	180
gcctgcttca gaaaatgaag tagtaagtct gctggcctcc gccatcttag taaagtaaca	240
gtcccatgaa acaaagatgc agtcgggcac tctactggaga gttctgggcc tctgcctctt	300
atcagttggc gtttgggggc aagatggtaa tgaagaaatg ggtggtatta cacagacacc	360
atataaagtc tccatctctg gaaccacagt aatattgaca tgccctcagt atcctggatc	420
tgaaatacta tggcaacaca atgataaaaa cataggcggg gatgaggatg ataaaaacat	480
aggcagtgat gaggatcacc tgtcactgaa ggaattttca gaattggagc aaagtggtta	540
ttatgtctgc taccacagag gaagcaaacc agaagatgcg aacttttatc tctacctgag	600
ggcaagagtg tgtgagaact gcatggagat ggatgtgatg tcggtggcca caattgtcat	660
agtggacatc tgcactcactg ggggcttgct gctgctgggt tactactgga gcaagaatag	720
aaaggccaag gccaagcctg tgacacgagg agcgggtgct ggccggcaggc aaaggggaca	780
aaacaaggag aggccaccac ctgttcccaa cccagactat gagcccatcc ggaaaggcca	840
gcgggacctg tattctggcc tgaatcagag acgcatctga ccctctggag aacactgcct	900
cccgtggtgc cagggtctct ctccagtcct cctgcgactc cctgtttcct gggctagtct	960
tggaccccac gagagagaat cgttcctcag cctcatggtg aactcgcgcc ctccagcctg	1020
atcccccgct ccctcctccc tgccttctct gctggtacct agtcctaaaa tattgctgct	1080
tcctcttctt ttgaagcatc atcagtagtc acaccctcac agctggcctg ccctcttgcc	1140
aggatattta tttgtgctat tcaactccct ccctttggat gtaacttctc cgttcagttc	1200
cctccttttc ttgcatgtaa gttgtccccc atcccaaagt attccatcta cttttctatc	1260
gccgtccctt tttgcagccc tctctgggga tggactgggt aaatgttgac agaggccctg	1320
ccccgttcac agatcctggc cctgagccag ccctgtgctc ctccctcccc caaactctcc	1380
taccaacccc ctaatccctt actccctcca cccccctcc actgtaggcc actggatggt	1440
catttgcatc tccgtaaagt tgctctgctc ctgagctgag agagaaaaaa ataaactgta	1500
tttggctgca agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	1534

<210> 10

<211> 207

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<300>

<308> NP_000724.1

<309> 03-05-2014

<313> (1)..(207)

5 <400> 10

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

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

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 11

<211> 1436

10 <212> ADN

<213> Cánico

<300>

<308> NM_001003379.1

<309> 22-02-2014

<313> (1)..(1436)

<400> 11

ataaacgtta gttactat	ttatcaggac tcctgggacc cctatctcac taatttcctt	60
aaagacagta taatacagca gctcacacag actttcggat tcagaaaaac agttgtgtcg		120
ggccttgggt aaattatgta aggcaagcct cagtttgctc agcggtaaaa cgaggaaagt		180
aataagccac ccgcctccgc cattttgggt agaataaggg tgcattccagt gagagaagga		240
tgcagtcgag gaacctctgg agaattctgg gactctgtct cttatcagtt ggtgcttggg		300
ggcaggacga ggatttcaaa gcttctgatg acttgacaag tatatctcca gagaaacggt		360
ttaagggtctc catctctgga accgaggtag tgggtgacatg ccctgatgtt tttggatatg		420
ataatataaa atgggaaaaa aatgataacc ttgtggaagg tgctagtaac agagagctat		480
ctcagaagga gttttcagaa gtggacgaca gtggttatta tgcttgctat gcagattcca		540
taaaggagaa gagctatctc tacctgagag caagagtgtg tgcaaaactgc atagaggtga		600
atctgatggc agtggtcaca atcattgtag ctgacatctg ccttactctg ggggttctgc		660
tgatggtgta ttactggagc aagactagaa aggccaatgc caagcctgtg atgagaggaa		720
cagggtgccg cagcaggccc aggggacaaa acaaggagaa gccaccacct gttccaatc		780
cagactacga gcccatccg aaaggccagc aggacctgta ttctggcctg aatcagagag		840
gcatctgacg gctcctgagg acacggcctc cccagggcc aggtcttgggt gtctccagg		900
cctgctactc ccagtaccct gggtaaactc tgaaccccag aagagaatta ttcctctgcc		960
ttctggagaa ctaactccca gcctgcagcc ttatcccag caccctccaa cccgccttct		1020
ctgctggcac ttggtcctgc aatatcacct cctcatcatg gccactcacc gccccccac		1080
cagccagact gccctctggt cggggtat	tttctgtta ccctgacgcc cccaccatca	1140
ccaattcctt cctacccttc agaggtatcc ttgctccctt ccgtaccct ctcccggaca		1200
gaacctgccc ccataccctta ctatcccacc tacctttccg tttttccagc tctctctttg		1260
gtgaccctct gtggggatgg actaggtaac tctggtagag gtccctgccc atccatgacc		1320
ttggcccaga gccaccctct gccagcaggc ccctggatga tcatttgcat tcttaca	aat	1380
5 gtgctaggct ccttgacagc tagagagaaa ataataaagt gtatttggtt gaaaaa		1436

<210> 12

<211> 202

<212> PRT

<213> Cánido

10 <300>

<308> NP_001003379.1

<309> 22-02-2014

<313> (1)..(202)

ES 2 832 704 T3

<400> 12

```

Met  Gln  Ser  Arg  Asn  Leu  Trp  Arg  Ile  Leu  Gly  Leu  Cys  Leu  Leu  Ser
 1              5              10              15

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

Thr  Ser  Ile  Ser  Pro  Glu  Lys  Arg  Phe  Lys  Val  Ser  Ile  Ser  Gly  Thr
          35              40              45

Glu  Val  Val  Val  Thr  Cys  Pro  Asp  Val  Phe  Gly  Tyr  Asp  Asn  Ile  Lys
 50              55              60

Trp  Glu  Lys  Asn  Asp  Asn  Leu  Val  Glu  Gly  Ala  Ser  Asn  Arg  Glu  Leu
65              70              75              80

Ser  Gln  Lys  Glu  Phe  Ser  Glu  Val  Asp  Asp  Ser  Gly  Tyr  Tyr  Ala  Cys
          85              90              95

Tyr  Ala  Asp  Ser  Ile  Lys  Glu  Lys  Ser  Tyr  Leu  Tyr  Leu  Arg  Ala  Arg
          100              105              110

Val  Cys  Ala  Asn  Cys  Ile  Glu  Val  Asn  Leu  Met  Ala  Val  Val  Thr  Ile
          115              120              125

Ile  Val  Ala  Asp  Ile  Cys  Leu  Thr  Leu  Gly  Leu  Leu  Leu  Met  Val  Tyr
130              135              140

Tyr  Trp  Ser  Lys  Thr  Arg  Lys  Ala  Asn  Ala  Lys  Pro  Val  Met  Arg  Gly
145              150              155              160

Thr  Gly  Ala  Gly  Ser  Arg  Pro  Arg  Gly  Gln  Asn  Lys  Glu  Lys  Pro  Pro
          165              170              175

Pro  Val  Pro  Asn  Pro  Asp  Tyr  Glu  Pro  Ile  Arg  Lys  Gly  Gln  Gln  Asp
          180              185              190

Leu  Tyr  Ser  Gly  Leu  Asn  Gln  Arg  Gly  Ile
          195              200

```

<210> 13

<211> 45

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligador peptídico (G4S)3

<400> 13

ggcggcggag gatctggcgg aggtggaagt gggggaggcg gatct

45

<210> 14

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Ligador peptídico (G4S)3
 <400> 14
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 119
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH de OKT3
 <400> 15
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 15 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VL de OKT3
 <400> 16

ES 2 832 704 T3

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

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

Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
100 105

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> C105S de VH de OKT3

<400> 17

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 18

<211> 723

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> C105S de scFv de OKT3

<400> 18

caggtgcagc tgggtgcagag tgggtggcggg gtggtgcagc ctggcagatc cctgagactg	60
tcttgcaagg ccagcgggcta caccttcacc cggtagacca tgcactgggt gcgacaggcc	120
cctggcaagg gcctggaatg gatcggctac atcaaccctt cccggggcta caccaactac	180
aaccagaagt tcaaggaccg gtccaccatc agccgggaca actccaagaa caccgccttt	240
ctgcagatgg actccctgcg gcctgaggat accggcgtgt acttttgcgc ccggtactac	300
gacgaccact actctctgga ctactggggc caggggaacc ctgtgacagt gtctagcgga	360
gggggaggtt caggtggcgg tggatcaggg ggcggaggct ctgatatcca gatgaccag	420
tccccctcca gcctgtctgc ctctgtggga gacagagtga caattacatg ctccgccagc	480
tccagcgtgt cctacatgaa ttggtatcag cagaccctg gcaaggctcc caagcgtgg	540
atctacgaca cctccaagct ggcctccggc gtgccctcca gatcttctgg cagcggctcc	600
ggcacagact atacctttac aatcagctcc ctgcagcccg aagatatcgc cacctactac	660
tgccagcagt ggtcctccaa ccccttcacc tttggccagg ggacaaaact gcagatcacc	720
aga	723

<210> 19

10 <211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> C105S de scFv de OKT3

15 <400> 19

ES 2 832 704 T3

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

Arg

<210> 20

<211> 1350

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 832 704 T3

<223> N297A de cadena pesada a modo de ejemplo

<400> 20

gaggtgcagc	tggtggaatc	tggcggagga	ctggtgcagc	ctggcggctc	tctgagactg	60
tcttgtgccg	cctccggctt	caacatcaag	gacacctaca	tccactgggt	gcgacaggcc	120
cctggcaagg	gactggaatg	ggtggccaga	atctacccca	ccaacggcta	caccagatac	180
gccgactctg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccgccgaca	cctccaagaa	caccgcctac	240
ctgcagatga	actccctgcg	ggccgaggac	accgccgtgt	actactgtag	tagatgggga	300
ggcgacggct	tctacgccat	ggactattgg	ggccagggca	ccctcgtgac	cgtgtcctct	360
gcttctacca	agggcccctc	tgtgtttcct	ctggccccct	ccagcaagtc	cacctctggt	420
ggaacagccg	ccctgggctg	cctcgtgaag	gactactttc	ccgagcccgt	gaccgtgtcc	480
tggaaactctg	gcgctctgac	ctctggcgtg	cacaccttcc	ctgctgtgct	gcagtctagc	540
ggcctgtact	ccctgtcctc	cgtcgtgaca	gtgccctcca	gctctctggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaacca	caagccctcc	aataccaagg	tggacaagcg	ggtggaaccc	660
aagtccctcg	acaagaccca	cacctgtccc	ccttgtcctg	cccctgaact	gctgggcgga	720
ccttccgtgt	tcctgttccc	cccaaagccc	aaggacaccc	tgatgatctc	ccggaccccc	780
gaagtgacct	gcgtgggtgt	ggatgtgtcc	cacgaggacc	ctgaagtgaa	gttcaattgg	840
tacgtggacg	gcgtggaagt	gcacaacgcc	aagaccaagc	ctagagagga	acagtacgcc	900
tccacctacc	gggtgggtgtc	cgtgctgaca	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaaa	960
gagtacaagt	gcaaagtgtc	caacaaggcc	ctgcctgccc	ccatcgaaaa	gaccatctcc	1020
aaggccaagg	gccagccccg	ggaaccccag	gtgtacacac	tgccccctag	cagggacgag	1080
ctgaccaaga	accagggtgtc	cctgacctgt	ctcgtgaaag	gcttctaccc	ctccgatatc	1140
gccgtggaat	gggagtccaa	cggccagcct	gagaacaact	acaagaccac	ccccctgtg	1200
ctggactccg	acggtcatt	cttcctgtac	agcaagctga	ccgtggacaa	gtcccgtgg	1260
cagcagggca	acgtgttctc	ctgctccgtg	atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	1320
cagaagtccc	tgtccctgag	ccccggcaaa				1350

<210> 21

5 <211> 1350

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> K322A de cadena pesada a modo de ejemplo

10 <400> 21

ES 2 832 704 T3

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60
tcttgtgccg cctccggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccaga atctaccca ccaacggcta caccagatac 180
gccgactctg tgaagggccg gttcaccatc tccgccgaca cctccaagaa caccgcctac 240
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtag tagatgggga 300
ggcgacggct tctacgccat ggactattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcctct 360
gcttctacca agggccctc tgtgtttcct ctggccccct ccagcaagtc cacctctggt 420
ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactactttc ccgagcccggt gaccgtgtcc 480
tggaactctg gcgctctgac ctctggcgtg cacaccttcc ctgctgtgct gcagtctagc 540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctcca gctctctggg caccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aataccaagg tggacaagcg ggtggaaccc 660
aagtcctgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaact gctgggcgga 720
ccttccgtgt tctcgttccc cccaaagccc aaggacacc tgatgatctc ccggaccccc 780
gaagtgacct gcgtgggtgt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtga gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ctagagagga acagtacaac 900
tccacctacc ggggtgtgtc cgtcgtgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gagtacaagt gcgccgtgtc caacaaggcc ctgcctgcc ccatcgaaaa gaccatctcc 1020
aaggccaagg gccagccccg ggaaccccag gtgtacacac tgccccctag cagggacgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctcgtgaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140
gccgtggaat gggagtccaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1200
ctggactccg acggctcatt ctctcgttac agcaagctga ccgtggacaa gtcccgtgtg 1260
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgtccctgag ccccgcaaa 1350

<210> 22

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada a modo de ejemplo

<400> 22

ES 2 832 704 T3

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60
tcttgtgccg cctccggcctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccaga atctacccca ccaacggcta caccagatac 180
gccgactctg tgaagggccg gttcaccatc tccgccgaca cctccaagaa caccgcctac 240
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtag tagatgggga 300
ggcgacggct tctacgccat ggactattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcctct 360
gcttctacca agggccctc tgtgtttcct ctggcccccct ccagcaagtc cacctctggt 420
ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactactttc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaactctg gcgctctgac ctctggcgtg cacaccttcc ctgctgtgct gcagtctagc 540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctcca gctctctggg caccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aataccaagg tggacaagcg ggtggaaccc 660
aagtcctgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaact gctgggcgga 720
ccttccgtgt tctcgttccc cccaaagccc aaggacacc tgatgatctc ccggaccccc 780
gaagtgacct gcgtgggtgt ggatgtgtcc cagcaggacc ctgaagtga gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ctagagagga acagtacaac 900
tccacctacc ggggtggtgc cgtgctgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gagtacaagt gcaaagtgtc caacaaggcc ctgcctgcc ccatcgaaaa gaccatctcc 1020
aaggccaagg gccagccccg ggaaccccag gtgtacacac tgccccctag cagggacgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctctgtaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140
gccgtggaat gggagtccaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1200
ctggactccg acggctcatt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtcccgtgtg 1260
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgtccctgag ccccgcaaa 1350

<210> 23

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada a modo de ejemplo

<400> 23

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

ES 2 832 704 T3

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

ES 2 832 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 24

<211> 642

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de HER2-AcBs

<400> 24

gacatccaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggcctccca ggacgtgaac accgccgtgg cttggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactcc gcctccttcc tgtactccgg cgtgccctcc 180

ES 2 832 704 T3

agattctccg gcagcagatc tggcaccgac tttaccctga ccatctccag cctgcagccc 240
gaggacttgc ccacctacta ctgccagcag cactacacca cccccccac ctttgccag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa gcggaccgtg gccgctccct ccgtgttcat cttcccacct 360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgct tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 420
ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgcc tgcagtccgg caactcccag 480
gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600
ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 25

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de HER2-AcBs

<400> 25

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

ES 2 832 704 T3

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser
210 215

<210> 26

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de HER2-AcBs

<400> 26

gaggtgcagc	tggtggaatc	tggcggagga	ctggtgcagc	ctggcggctc	tctgagactg	60
tcttgtgccg	cctccggctt	caacatcaag	gacacctaca	tccactgggt	gcgacaggcc	120
cctggcaagg	gactggaatg	ggtggccaga	atctaccca	ccaacggcta	caccagatac	180
gccgactctg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccgccgaca	cctccaagaa	caccgcctac	240
ctgcagatga	actccctgcg	ggccgaggac	accgccgtgt	actactgtag	tagatgggga	300
ggcgacggct	tctacgccat	ggactattgg	ggccagggca	ccctcgtgac	cgtgtcctct	360
gcttctacca	agggcccctc	tgtgtttcct	ctggccccct	ccagcaagtc	cacctctggt	420
ggaacagccg	ccctgggctg	cctcgtgaag	gactactttc	ccgagcccgt	gaccgtgtcc	480
tggaactctg	gcgctctgac	ctctggcgtg	cacaccttcc	ctgctgtgct	gcagtctagc	540
ggcctgtact	ccctgtcctc	cgtcgtgaca	gtgccctcca	gctctctggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaacca	caagccctcc	aataccaagg	tggacaagcg	ggtggaaccc	660
aagtcctgcg	acaagaccca	cacctgtccc	ccttgtcctg	cccctgaact	gctgggcgga	720
ccttccgtgt	tcctgttccc	cccaaagccc	aaggacaccc	tgatgatctc	ccggaccccc	780
gaagtgacct	gcgtgggtgt	ggatgtgtcc	cacgaggacc	ctgaagtgaa	gttcaattgg	840
tacgtggacg	gcgtggaagt	gcacaacgcc	aagaccaagc	ctagagagga	acagtacgcc	900
tccacctacc	gggtgggtgtc	cgtgctgaca	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaaa	960
gagtacaagt	gcgccgtgtc	caacaaggcc	ctgcctgccc	ccatcgaaaa	gaccatctcc	1020

ES 2 832 704 T3

aaggccaagg gccagcccg ggaacccag gtgtacacac tgcccctag caggacgag 1080
 ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctcgtgaaag gcttctaccc ctccgatata 1140
 gccgtggaat gggagtccaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1200
 ctggactccg acggctcatt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtcccgtgg 1260
 cagcaggga acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagtccc tgtccctgag ccccgcaaa 1350

<210> 27

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de HER2-AcBs

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 832 704 T3

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 28

<211> 1416

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs

<400> 28

gacatccaga tgacccagag cccttccagc ctgtccgcct ctgtgggcga cagagtgacc	60
atcacctgtc gggcctccca ggacgtgaac accgccgtgg cttggtatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactcc gcctccttcc tgtactccgg cgtgccctcc	180
agattctccg gcagcagatc tggcaccgac tttaccctga ccatctccag cctgcagccc	240
gaggacttgc ccacctacta ctgccagcag cactacacca cccccccac ctttggccag	300
ggcaccaagg tggaaatcaa ggggaccgtg gccgctccct ccgtgttcat cttcccacct	360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgct tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaagtg gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag	480
gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc caccctgacc	540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtga ccaccagggc	600
ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gcactagtgg cggcgaggga	660
tctggcggag gtggaagtgg gggaggcgga tctcaggtgc agctggtgca gagtgggtggc	720
ggagtgggtc agcctggcag atccctgaga ctgtcttgca aggccagcgg ctacaccttc	780
acccggtaca ccatgcactg ggtgcgacag gccctggca agggcctgga atggatcggc	840
tacatcaacc cctcccgggg ctacaccaac tacaaccaga agttcaagga ccggttcacc	900
atcagccggg acaactccaa gaacaccgcc tttctgcaga tggactccct gcggcctgag	960
gataccggcg tgtacttttg cggccgttac tacgacgacc actactctct ggactactgg	1020
ggccagggaa cccctgtgac agtgtctagc ggagggggag gttcaggtgg cgggtgatca	1080
gggggcggag gctctgatat ccagatgacc cagtccccct ccagcctgtc tgcctctgtg	1140
ggagacagag tgacaattac atgctccgcc agctccagcg tgcctacat gaattggtat	1200
cagcagaccc ctggcaaggc tccaagcgg tggatctacg acacctccaa gctggcctcc	1260
ggcgtgccct ccagattttc tggcagcggc tccggcacag actatacctt tacaatcagc	1320
tccctgcagc ccgaagatat cgccacctac tactgccagc agtggtcctc caacccttc	1380
acctttggcc aggggacaaa actgcagatc accaga	1416

10 <210> 29

<211> 472

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs

<400> 29

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

ES 2 832 704 T3

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 325 330 335
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 340 345 350
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 355 360 365
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 370 375 380
 Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
 385 390 395 400
 Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 420 425 430
 Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
 435 440 445
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln
 450 455 460
 Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
 465 470

<210> 30

<211> 462

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 5 aa)

<400> 30

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

ES 2 832 704 T3

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 325 330 335
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 340 345 350
 Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 355 360 365
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 370 375 380
 Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg
 385 390 395 400
 Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 405 410 415
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu
 420 425 430
 Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
 435 440 445
 Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
 450 455 460

<210> 31

<211> 467

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 10 aa)

<400> 31

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

ES 2 832 704 T3

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 325 330 335
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 340 345 350
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 355 360 365
 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
 370 375 380
 Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly
 385 390 395 400
 Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly
 405 410 415

ES 2 832 704 T3

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe
420 425 430

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
435 440 445

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln
450 455 460

Ile Thr Arg
465

<210> 32

<211> 477

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 20 aa)

<400> 32

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

ES 2 832 704 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 325 330 335
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 340 345 350
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 355 360 365
 Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 370 375 380
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
 385 390 395 400

ES 2 832 704 T3

Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp
405 410 415

Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
420 425 430

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
435 440 445

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
450 455 460

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
465 470 475

<210> 33

<211> 482

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 25 aa)

<400> 33

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

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

ES 2 832 704 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 325 330 335
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 340 345 350
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 355 360 365
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 370 375 380

ES 2 832 704 T3

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
385 390 395 400

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys
405 410 415

Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
420 425 430

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr
435 440 445

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
450 455 460

Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile
465 470 475 480

Thr Arg

<210> 34

<211> 487

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 30 aa)

<400> 34

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

ES 2 832 704 T3

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala		
			100					105					110				
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly		
		115					120					125					
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala		
	130					135					140						
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln		
145					150					155					160		
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser		
			165						170					175			
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr		
		180						185					190				
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser		
		195					200					205					
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
	210					215					220						
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly		
225					230					235					240		
Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser		
			245						250				255				
Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro		
		260						265					270				
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr		
	275						280				285						
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp		
	290					295					300						
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Phe	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu		
305					310					315					320		
Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser		
			325						330					335			
Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly		
			340					345					350				

ES 2 832 704 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
370 375 380

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

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln
405 410 415

Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys
420 425 430

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
435 440 445

Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr
450 455 460

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
465 470 475 480

Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
485

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligador T(G4S)3

<400> 35

Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser

10 <210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Ligador G4S

<400> 36

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Ligador (G4S)2
 <400> 37
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 38

10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ligador (G4S)3
 <400> 38
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 39
 <211> 20
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ligador (G4S)4
 <400> 39
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20

25 <210> 40
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> Ligador (G4S)5
 <400> 40

ES 2 832 704 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligador (G4S)6

<400> 41

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

10 <210> 42

<211> 462

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 5 aa) + mut. disulfuro

<400> 42

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

ES 2 832 704 T3

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 325 330 335
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 340 345 350
 Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

ES 2 832 704 T3

355 360 365

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
370 375 380

Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg
385 390 395 400

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
405 410 415

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu
420 425 430

Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
435 440 445

Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
450 455 460

<210> 43

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 10 aa) + mut. disulfuro

<400> 43

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

ES 2 832 704 T3

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
	210	215
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly		
225	230	235
Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser		
	245	250
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro		
	260	265
Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr		
	275	280
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp		
	290	295
Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu		
305	310	315
Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser		
	325	330
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly		
	340	345
		350

ES 2 832 704 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
355 360 365

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
370 375 380

Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly
385 390 395 400

Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly
405 410 415

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe
420 425 430

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
435 440 445

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Gln
450 455 460

Ile Thr Arg
465

<210> 44

<211> 472

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 15 aa) + mut. disulfuro

<400> 44

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

ES 2 832 704 T3

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
 325 330 335

ES 2 832 704 T3

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
355 360 365

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
370 375 380

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
385 390 395 400

Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
405 410 415

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
420 425 430

Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
435 440 445

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Cys
450 455 460

Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
465 470

<210> 45

<211> 477

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 20 aa) + mut. disulfuro

<400> 45

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

ES 2 832 704 T3

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270
 Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 305 310 315 320

ES 2 832 704 T3

Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
325 330 335

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
370 375 380

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
385 390 395 400

Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp
405 410 415

Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
420 425 430

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
435 440 445

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
450 455 460

Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
465 470 475

<210> 46

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 25 aa) + mut. disulfuro

<400> 46

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

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

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

ES 2 832 704 T3

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

ES 2 832 704 T3

290

295

300

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
305 310 315 320

Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
325 330 335

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
370 375 380

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
385 390 395 400

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys
405 410 415

Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
420 425 430

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr
435 440 445

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
450 455 460

Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Cys Gly Thr Lys Leu Gln
465 470 475 480

Ile Thr Arg

<210> 47

<211> 487

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs (ligador de scFv de 30 aa) + mut. disulfuro

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

ES 2 832 704 T3

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

ES 2 832 704 T3

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
260 265 270

Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
275 280 285

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
290 295 300

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
305 310 315 320

Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser
325 330 335

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
370 375 380

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

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln
405 410 415

Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys
420 425 430

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
435 440 445

Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr
450 455 460

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly
465 470 475 480

Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
485

<210> 48

<211> 231

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) (ligador de scFv de 5 aa)

<400> 48

ES 2 832 704 T3

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

<210> 49

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) (ligador de scFv de 10 aa)

<400> 49

ES 2 832 704 T3

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
130 135 140

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
145 150 155 160

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile
165 170 175

Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
180 185 190

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
195 200 205

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe
210 215 220

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
225 230 235

<210> 50

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) (ligador de scFv de 20 aa)

ES 2 832 704 T3

<400> 50

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

<210> 51

5 <211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) (ligador de scFv de 25 aa)

<400> 51

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

5

<210> 52

<211> 256

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) (ligador de scFv de 30 aa)

5 <400> 52

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
145 150 155 160

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
165 170 175

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

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
210 215 220

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
225 230 235 240

Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
245 250 255

<210> 53

<211> 231

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) + mut. disulfuro (ligador de scFv de 5 aa)

<400> 53

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

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

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

ES 2 832 704 T3

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

<210> 54

<211> 236

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) + mut. disulfuro (ligador de scFv de 10 aa)

<400> 54

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

ES 2 832 704 T3

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

<210> 55

<211> 241

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) + mut. disulfuro (ligador de scFv de 15 aa)

<400> 55

ES 2 832 704 T3

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

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

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala
165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
180 185 190

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile
195 200 205

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
210 215 220

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
225 230 235 240

Arg

<210> 56

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 832 704 T3

<223> scFv de huOKT3 (C105S) + mut. disulfuro (ligador de scFv de 20 aa)

<400> 56

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

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

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
145 150 155 160

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu
180 185 190

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
195 200 205

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

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Gln Ile Thr Arg
245

5 <210> 57

<211> 252

<212> PRT

ES 2 832 704 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 (C105S) + mut. disulfuro (ligador de scFv de 25 aa)

<400> 57

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

5 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
145 150 155 160

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
165 170 175

Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
180 185 190

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
195 200 205

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

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
225 230 235 240

Phe Gly Gln Cys Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
245 250

<210> 58

<211> 256

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> scFv de huOKT3 (C105S) + mut. disulfuro (ligador de scFv de 30 aa)

<400> 58

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

ES 2 832 704 T3

100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
145 150 155 160

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
165 170 175

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

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
210 215 220

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
225 230 235 240

Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
245 250 255

<210> 59

<211> 241

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv de huOKT3 + mut. disulfuro (ligador de scFv de 15 aa)

<400> 59

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

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

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

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

ES 2 832 704 T3

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

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

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala
165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
180 185 190

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile
195 200 205

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
210 215 220

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

Arg

<210> 60

<211> 472

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión de cadena ligera de HER2-AcBs

<400> 60

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

ES 2 832 704 T3

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

ES 2 832 704 T3

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
275 280 285

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
290 295 300

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
305 310 315 320

Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
325 330 335

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
355 360 365

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
370 375 380

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
385 390 395 400

Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
405 410 415

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
420 425 430

Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
435 440 445

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln
450 455 460

Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
465 470

<210> 61

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cadena ligera de HER2-AcBs

<400> 61

ES 2 832 704 T3

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 62

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cadena pesada de HER2-AcBs

<400> 62

ES 2 832 704 T3

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

ES 2 832 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 63

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> K322A de cadena pesada de trastuzumab

<400> 63

ES 2 832 704 T3

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

ES 2 832 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 64

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> C105S de VH de huOKT3 + VH44

<400> 64

ES 2 832 704 T3

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de huOKT3 + VL100

<400> 65

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

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

Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
100 105

10

<210> 66

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> scFv de huOKT3; ligador de 15 aa

<400> 66

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

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

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

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

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

Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys
			85						90					95	

Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		

Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			

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

Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
145					150					155					160

Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Ala
				165					170					175	

ES 2 832 704 T3

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
180 185 190

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile
195 200 205

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
210 215 220

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

Arg

<210> 67

<211> 1416

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante de ADN de SEQ ID NO: 60

<400> 67

gatattcaga tgactcagtc tccctcttcc ctgtccgctt cagtcggcga tcgggtcact	60
attacttgctc gggcttcaca ggatgtcaac acagccgtgg cttggtacca gcagaagccc	120
gggaaagcac ctaagctgct gatctactct gccagtttcc tgtattctgg cgtcccaagt	180
aggttttcag gctcccgag cggaactgac ttcaccctga caatttccag cctgcagccc	240
gaggattttg ctacctacta ttgccagcag cattatacta ccccccaac attcggccag	300
ggcacaaaag tcgaaatcaa gcggaccgtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc	360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgcc tgcagtccgg caactcccag	480
gagtcctgta ccgagcagga ctccaaggac tccacctact ccctgtcctc caccctgacc	540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
ctgtcctccc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gcactagtgg aggaggaggt	660
agcggaggag gaggttctgg cggagggggt tcccaggtgc agctggtgca gagcggagga	720
ggagtgtgac agccaggaag gagcctgcga ctgtcttgca aggctagtgg ctacaccttc	780
acacgatata ctatgcactg ggtgaggcag gcacctggtg aaggcctgga gtggatcggc	840
tacattaacc cctctagggg atacaccaac tataatcaga agttcaaaga caggttcacc	900
atctcacgag ataactccaa gaataccgcc ttctgcaga tggactccct gcggcccgaa	960
gatacaggcg tgtatttttg cgctagatac tatgacgatac attactgtct ggactattgg	1020

ES 2 832 704 T3

ggacagggga cccctgtgac agtgtccagc ggtggaggag ggtcaggtgg aggagggagc 1080
 ggtggcggag ggtctgacat ccagatgacc cagtcccat ctagtctgag cgcctctgtg 1140
 ggcgatagag tgactattac ctgcagtgt tcatccagcg tgagctacat gaactggtat 1200
 cagcagacac ccggaaaggc acctaaacgc tggatctacg atactagcaa gctggcctct 1260
 ggcgtgcccc gtcgattcag tggttcaggc tccggaaccg actatacctt caccatctct 1320
 agtctgcagc ctgaggatat tgccacatac tattgtcagc agtggtcatc caatccattc 1380
 acttttgggc agggtagcaa actgcagatt acaagg 1416

<210> 68

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante de ADN de SEQ ID NO: 62

<400> 68

gaagtgcagc tggtcgagag cggaggagggt ctggtgcagc ccggagggttc cctgagactg 60
 tcctgtgccg catctgggtt taatatcaag gacacataca tccactgggt gagacaggca 120
 cccggcaaag gactggagtg ggtcgccagg atctacccta ccaacgggta cacaagatat 180
 gctgactctg tgaagggccg gtccaccatc tccgccgata ctagcaaaaa caccgcttac 240
 ctgcagatga attccctgag ggcagaagat accgctgtct actactgttc aagatggggg 300
 ggggatgggtt tttagcgtat ggattattgg ggccagggca ccctggtgac cgtgtcctcc 360
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 480
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggccgtcct acagtctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacgcc 900
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

ES 2 832 704 T3

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 69

<211> 1410

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de HER2-C825

<400> 69

gatattcaga tgactcagtc tccctcttcc ctgtccgctt cagtcggcga tcgggtcact 60
attacttgtc gggcttcaca ggatgtcaac acagccgtgg cttggtacca gcagaagccc 120
gggaaagcac ctaagctgct gatctactct gccagtttcc tgtattcttg cgtcccaagt 180
aggttttcag gctcccgag cggaactgac ttcaccctga caatttccag cctgcagccc 240
gaggattttg ctacctacta ttgccagcag cattatacta ccccccaac attcggccag 300
ggcacaaaag tcgaaatcaa gcggaccgtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc 360
tccgacgagc agtgaaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag 480
gagtcctgta ccgagcagga ctccaaggac tccacctact ccctgtcctc caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtcctccc ccgtgaccaa gtccctcaac cggggcgagt gcggtggttg tggtagcggc 660
ggcggtgga ggcacatccc tgtgaaactg caggaaagcg gccaggtct ggtccagcca 720
tcccagtcct tgagcctgac atgcaactgt agcggattct ctctgacaga ctatggggtg 780
cactgggtca gacagagtcc aggaaagggg ctggagtggc tgggcgtcat ctggtcaggc 840
ggagggactg cttataacac cgcactgatc agcagactga atatctaccg cgacaactct 900
aaaaatcagg tgttcctgga gatgaacagt ctgcaggccg aagataccgc tatgtactat 960
tgcgccaggc ggggcagcta cccttataat tactttgacg cttgggggtg tggcaccaca 1020
gtgacagtct ccagcgggtg agggaggagt ggtggaggag ggtcaggttg agggagggtcc 1080
caggcagtggt tcattcagga gtctgccctg actaccccc ctggagaaac cgtgacactg 1140
acttgcggat ctagtacagg ggcagtgact gcctccaact atgcaaattg ggtccaggaa 1200
aagcctgatc actgtttcac tggcctgatc ggtggccata acaatcgacc acccgagtg 1260
ccagctaggt ttccaggttc cctgatcggc gacaaagccg ctctgaccat tgctggcacc 1320
cagacagagg atgaagcaat ctacttttgt gccctgtggt attccgatca ctgggtcatt 1380
10 ggggggggga cacgtctgac tgtgctgggg 1410

<210> 70

<211> 1350

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cadena pesada de HER2-C825

<400> 70

gaagtgcagc tggctcgagag cggaggaggt ctggtgcagc ccggagggtc cctgagactg	60
tcctgtgccg catctgggtt taatatcaag gacacataca tccactgggt gagacaggca	120
cccggcaaaag gactggagtg ggtcgccagg atctacccta ccaacgggta cacaagatat	180
gctgactctg tgaagggccg gttcaccatc tccgcccata ctagcaaaaa caccgcttac	240
ctgcagatga attccctgag ggcagaagat accgctgtct actactgttc aagatggggg	300
ggggatggtt ttacgctat ggattattgg ggccagggca ccctggtgac cgtgtcctcc	360
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	480
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggccgtcct acagtctca	540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	660
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcattgatctc ccggaccct	780
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacgcc	900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag	960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag	1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	1200
ctggactccg acggtctctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	1350

<210> 71

<211> 470

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cadena ligera de HER2-C825

<400> 71

ES 2 832 704 T3

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

ES 2 832 704 T3

225	230								235					240			
Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr		
				245					250					255			
Asp	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu		
				260					265					270			
Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Tyr	Asn	Thr	Ala		
				275					280					285			
Leu	Ile	Ser	Arg	Leu	Asn	Ile	Tyr	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Val		
				290					295					300			
Phe	Leu	Glu	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr		
				305					310					315			
Cys	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ala	Trp	Gly		
				325					330					335			
Cys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly		
				340					345					350			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Ile	Gln	Glu	Ser		
				355					360					365			
Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser		
				370					375					380			
Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Ala	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu		
				385					390					395			
Lys	Pro	Asp	His	Cys	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	His	Asn	Asn	Arg		
				405					410					415			
Pro	Pro	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Asp	Lys		
				420					425					430			
Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Ala	Gly	Thr	Gln	Thr	Glu	Asp	Glu	Ala	Ile	Tyr		
				435					440					445			
Phe	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asp	His	Trp	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	Thr		
				450					455					460			
Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Gly												
				465					470								

<210> 72

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de cadena pesada de HER2-C825

ES 2 832 704 T3

<400> 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 832 704 T3

210		215		220	
Lys Thr His Thr Cys	Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235		240	
Pro Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile			
	245	250	255		
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	Val Val Val Asp Val Ser His Glu				
	260	265	270		
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	Val Glu Val His				
	275	280	285		
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg					
	290	295	300		
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys					
	305	310	315		320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu					
	325	330	335		
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr					
	340	345	350		
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu					
	355	360	365		
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp					
	370	375	380		
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val					
	385	390	395	400	
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp					
	405	410	415		
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His					
	420	425	430		
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro					
	435	440	445		
Gly Lys					
450					

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión biespecífica que comprende un anticuerpo monoclonal que es una inmunoglobulina que se une a HER2, comprendiendo dicha inmunoglobulina dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, siendo dichas cadenas ligeras una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en la que la primera cadena ligera se fusiona a un primer fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de un ligador peptídico, para crear un primer polipéptido de fusión de cadena ligera, y en la que la segunda cadena ligera se fusiona a un segundo scFv, a través de un ligador peptídico, para crear un segundo polipéptido de fusión de cadena ligera, en la que los scFv primero y segundo (i) son idénticos, y (ii) se unen a CD3, y en la que los polipéptidos de fusión de cadena ligera primero y segundo son idénticos,
 - 5 en la que las cadenas pesadas se mutan para destruir un sitio de glicosilación,
 - 10 en la que las cadenas pesadas comprenden un dominio V_H presente en cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 62 o 63;
 - en la que las cadenas ligeras comprenden un dominio V_L presente en SEQ ID NO: 25;
 - 15 en la que los scFv primero y segundo comprenden un dominio V_H que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15, 17 y 64, y un dominio V_L que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16 y 65; y
 - en la que el primer scFv se fusiona al extremo carboxilo de la primera cadena ligera, y en la que el segundo scFv se fusiona al extremo carboxilo de la segunda cadena ligera.
2. La molécula de unión biespecífica según la reivindicación 1, en la que:
 - 20 (a) la secuencia de cada cadena pesada es SEQ ID NO: 27 o 62;
 - (b) la secuencia de cada cadena ligera es SEQ ID NO: 25;
 - (c) la secuencia del ligador peptídico es una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 y 35-41; y/o
 - (d) la secuencia de un ligador peptídico intra-scFv entre el dominio V_H y el dominio V_L en el primer scFv es una cualquiera de las SEQ ID NO: 14 y 35-41.
- 25 3. La molécula de unión biespecífica según la reivindicación 1 o 2, en la que (a) la secuencia del scFv es una cualquiera de las SEQ ID NO: 19 y 48-59, o (b) la secuencia del primer polipéptido de fusión de cadena ligera es una cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 34, 42-47 y 60.
4. La molécula de unión biespecífica según la reivindicación 1, en la que la secuencia de cada cadena pesada es SEQ ID NO: 27, y en la que la secuencia de la primera cadena ligera es SEQ ID NO: 25.
- 30 5. La molécula de unión biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el ligador peptídico tiene 5-30, 5-25, 5-15, 10-30, 10-20, 10-15, 15-30, o 15-25 aminoácidos de longitud.
6. La molécula de unión biespecífica según la reivindicación 1, en la que la secuencia de la cadena pesada es SEQ ID NO: 62 y en la que la secuencia de cada polipéptido de fusión de cadena ligera es SEQ ID NO: 60.
- 35 7. La molécula de unión biespecífica según la reivindicación 1, en la que la secuencia de cada cadena pesada es SEQ ID NO: 27, en la que la secuencia de la primera cadena ligera es SEQ ID NO: 25, y en la que la secuencia del primer scFv es SEQ ID NO: 52.
8. La molécula de unión biespecífica según la reivindicación 1, en la que la secuencia de cada cadena pesada es SEQ ID NO: 27 y en la que la secuencia del primer polipéptido de fusión de cadena ligera es SEQ ID NO: 34.
- 40 9. La molécula de unión biespecífica según la reivindicación 1, en la que el sitio de glicosilación destruido está presente en una región Fc de la cadena pesada.
10. La molécula de unión biespecífica según la reivindicación 9, en la que el sitio de glicosilación es un sitio de glicosilación de unión a N, preferiblemente N297.
- 45 11. Un polinucleótido que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para un polipéptido de fusión de cadena ligera que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina fusionada a un scFv, a través de un ligador peptídico, en el que el scFv se fusiona al extremo C-terminal de la cadena ligera;
 - en el que la cadena ligera se une a HER2 y comprende un dominio V_L presente en SEQ ID NO: 25; y
 - en el que el scFv se une a CD3 y comprende un dominio V_H que tiene una secuencia seleccionada del grupo

que consiste en las SEQ ID NO: 15, 17 y 64, y un dominio V_L que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16 y 65; y;

en el que opcionalmente:

- 5 (a) la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena ligera es SEQ ID NO: 24;
- (b) la secuencia del scFv es SEQ ID NO: 52;
- (c) la secuencia del scFv es SEQ ID NO: 19, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para el scFv es SEQ ID NO: 18;
- (d) la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25, y la secuencia del scFv es SEQ ID NO: 52;
- 10 (e) la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25, y la secuencia del scFv es SEQ ID NO: 19, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena ligera es SEQ ID NO: 24, y la secuencia de nucleótidos que codifica para el scFv es SEQ ID NO: 18;
- 15 (f) el ligador peptídico tiene 5-30, 5-25, 5-15, 10-30, 10-20, 10-15, 15-30, o 15-25 aminoácidos de longitud, en el que opcionalmente la secuencia del ligador peptídico es SEQ ID NO: 14, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para el ligador peptídico es SEQ ID NO: 13; o
- (g) la secuencia del polipéptido de fusión de cadena ligera es SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 29, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de fusión de cadena ligera de SEQ ID NO: 29 es SEQ ID NO: 28.
12. Un vector que comprende
- 20 (i) un primer polinucleótido según la reivindicación 11 operativamente unido a un primer promotor, y
- (ii) un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada de inmunoglobulina que se une a HER2 operativamente unido a un segundo promotor.
13. Una mezcla de polinucleótidos, que comprende
- (i) un primer polinucleótido según la reivindicación 11 operativamente unido a un primer promotor, y
- 25 (ii) un segundo polinucleótido que codifica para una cadena pesada de inmunoglobulina que se une a HER2 operativamente unido a un segundo promotor.
14. Una célula *ex vivo* que comprende el vector según la reivindicación 12 o la mezcla de polinucleótidos según la reivindicación 13.
15. Un método de producción de una molécula de unión biespecífica, que comprende
- 30 (i) cultivar la célula según la reivindicación 14 para expresar los polinucleótidos primero y segundo de tal manera que se produzca una molécula de unión biespecífica que comprende dicho polipéptido de fusión de cadena ligera y dicha cadena pesada de inmunoglobulina, y
- (ii) recuperar la molécula de unión biespecífica.
16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de:
- 35 (a) la molécula de unión biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador farmacéuticamente aceptable;
- (b) el vector según la reivindicación 12; o
- (c) la mezcla de polinucleótidos según la reivindicación 13.
17. Una composición farmacéutica según la reivindicación 16, para su uso en un método de tratamiento de un
- 40 cáncer positivo para HER2 en un sujeto que lo necesita.
18. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 17, en la que el cáncer positivo para HER2 es cáncer de mama, cáncer gástrico, un osteosarcoma, cáncer desmoplásico de células redondas pequeñas, carcinoma de células escamosas de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, adenocarcinoma de la unión gástrica, adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, cáncer de cuello uterino, cáncer de glándulas salivales, sarcoma de tejidos blandos,
- 45 leucemia, melanoma, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma o cualquier otro tejido neoplásico

que exprese el receptor HER2; en la que opcionalmente el cáncer positivo para HER2 es un tumor primario o un tumor metastásico; y en la que opcionalmente la composición farmacéutica es para administración intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intraventricular en el cerebro o intraparenquimatosa en el cerebro.

- 5 19. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 17 o 18, en la que la composición farmacéutica es para su uso en combinación con:
 - (a) doxorubicina, ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel y/o carboplatino;
 - (b) radioterapia;
 - (c) terapia multimodal basada en antraciclinas;
 - (d) radioterapia externa o radioinmunoterapia; y/o
- 10 (e) células T que se unen a la molécula de unión biespecífica o no se unen a la molécula de unión biespecífica cuando se administra la composición farmacéutica al sujeto.
20. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en la que el cáncer positivo para HER2 es resistente al tratamiento con trastuzumab, cetuximab, lapatinib, erlotinib o cualquier otra molécula pequeña o anticuerpo que se dirija a la familia HER de receptores.
- 15 21. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en la que la molécula de unión biespecífica no se une a una célula T cuando se administra la composición farmacéutica al sujeto.
22. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en la que el sujeto es un ser humano o un cánido.
- 20 23. Un composición farmacéutica que comprende células T unidas a la molécula de unión biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.
24. Un método *ex vivo* para producir una célula T terapéutica, que comprende unir la molécula de unión biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 a una célula T, en el que la célula T es opcionalmente una célula T humana, y en el que la unión es no covalente.

25

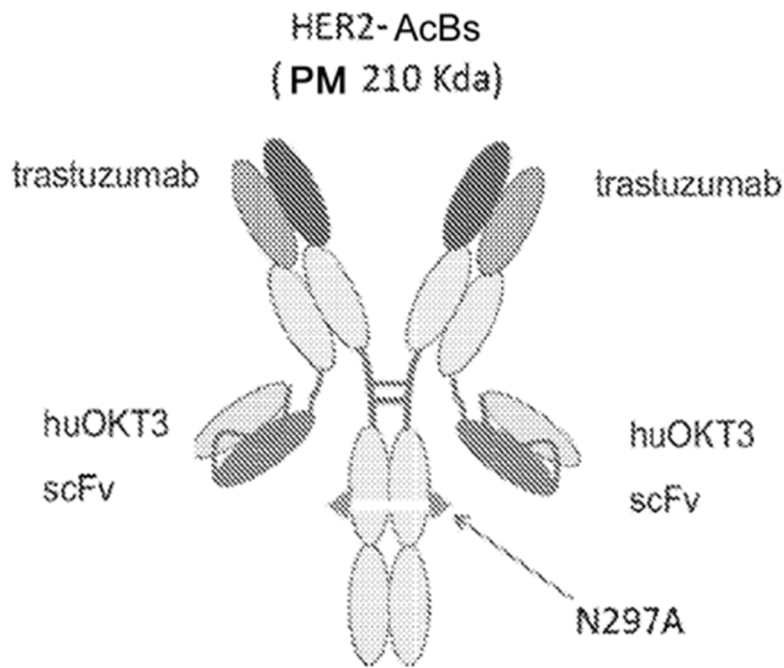


Fig. 1A

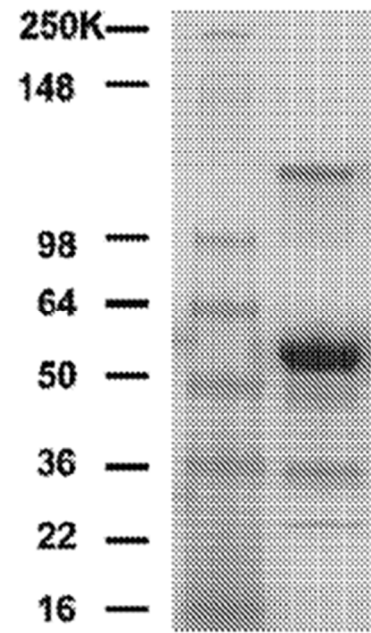


Fig. 1B

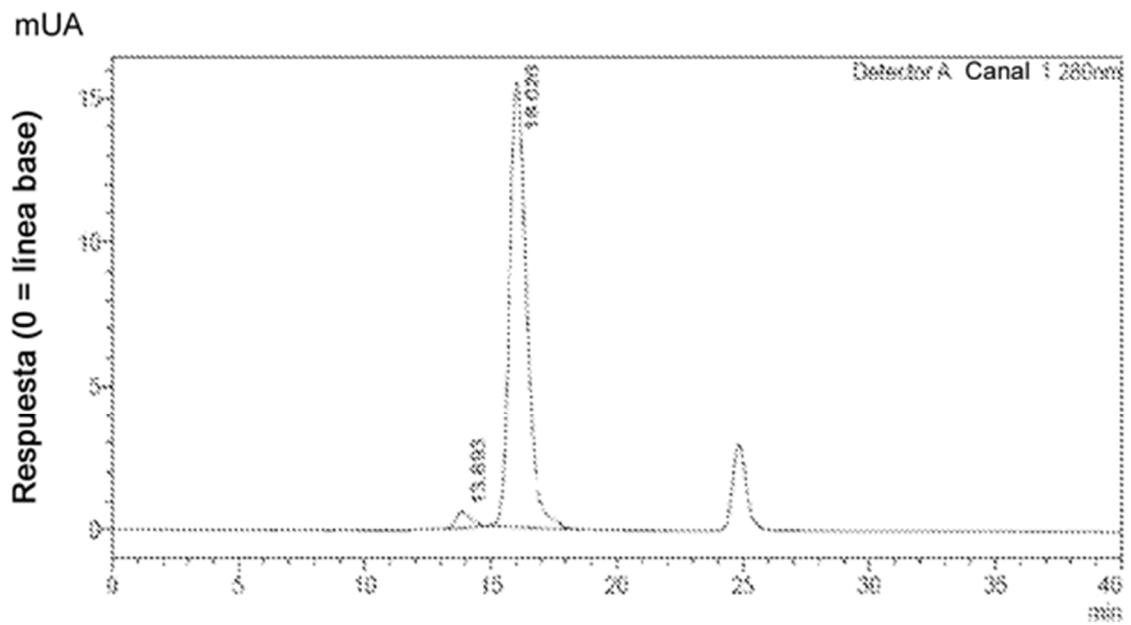


Fig. 1C

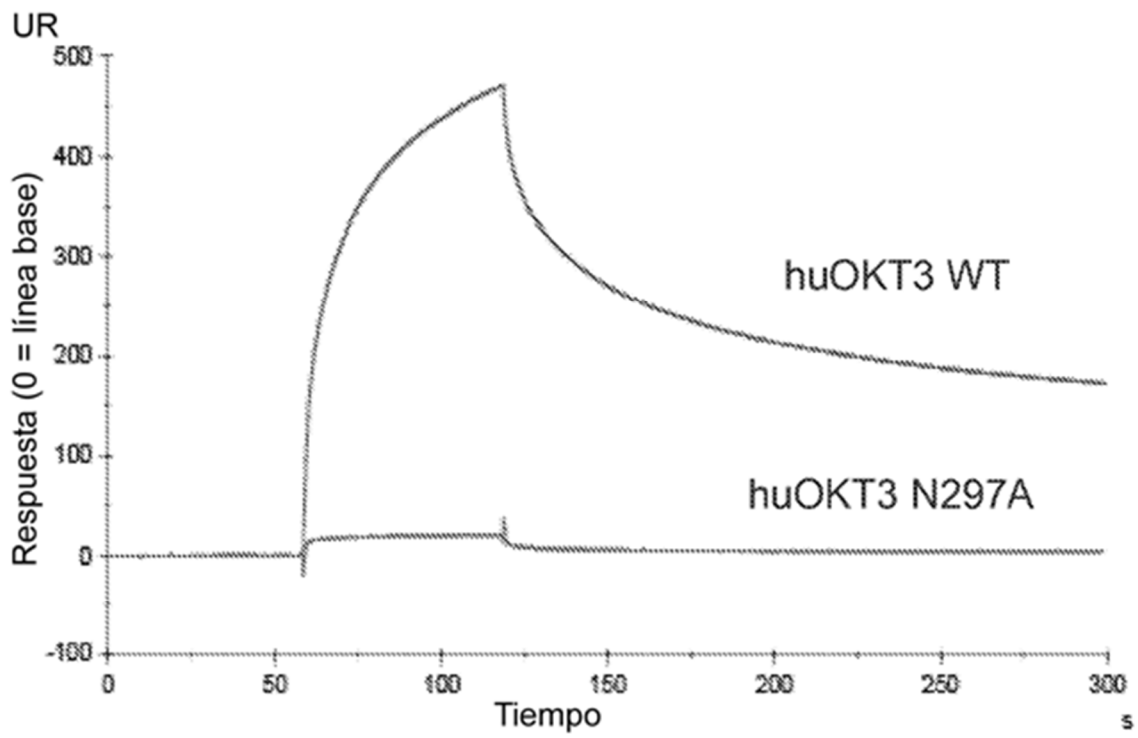


Fig. 1D

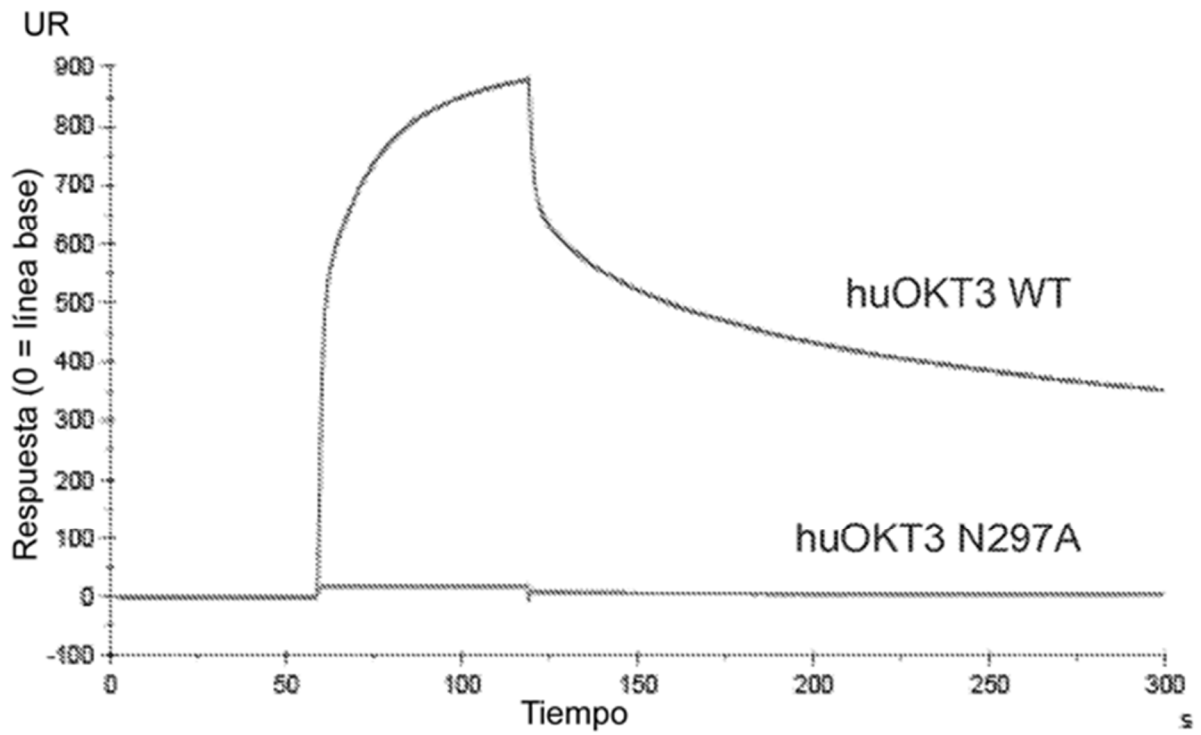


Fig. 1E

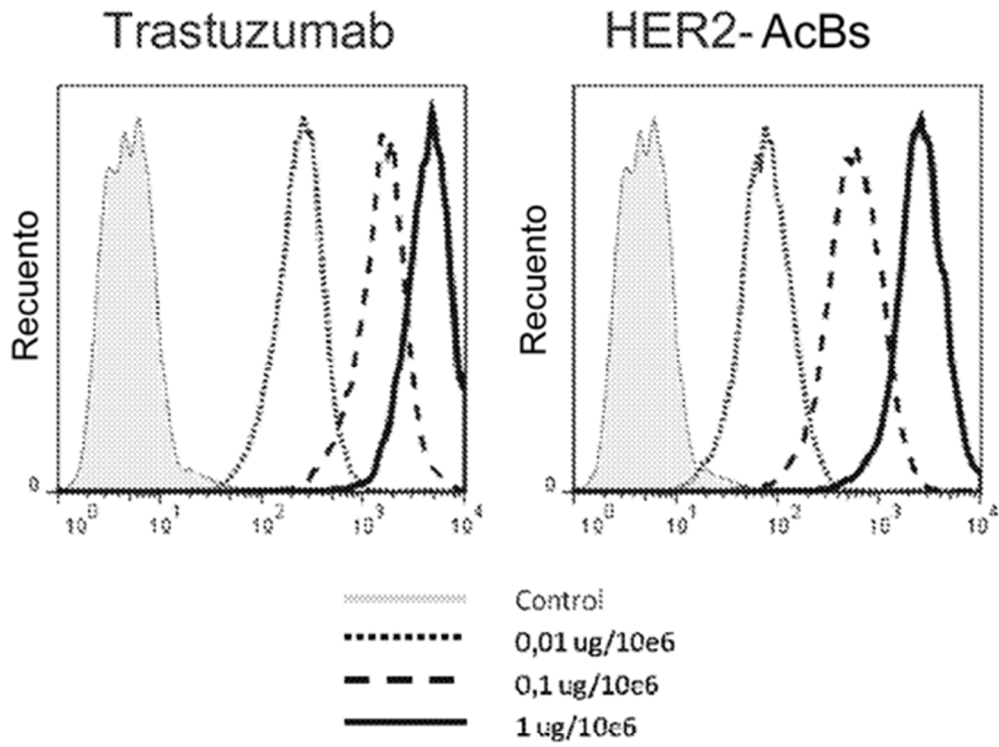


Fig. 2A

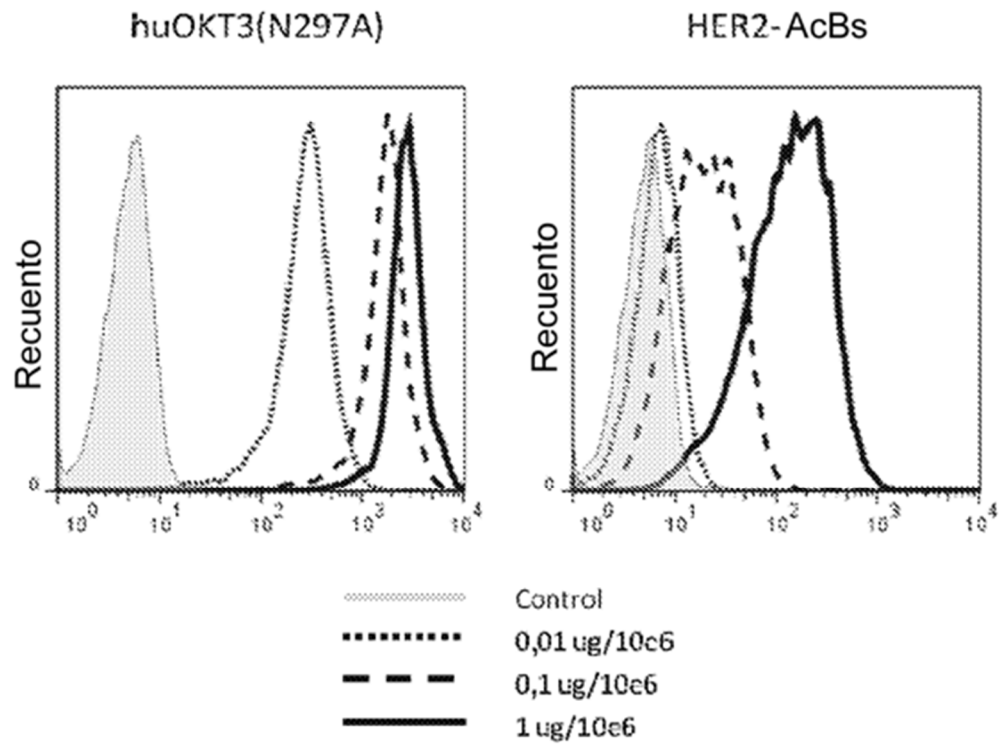


Fig. 2B

Ensayo de CLT con AU565 (E:T @ 10:1)

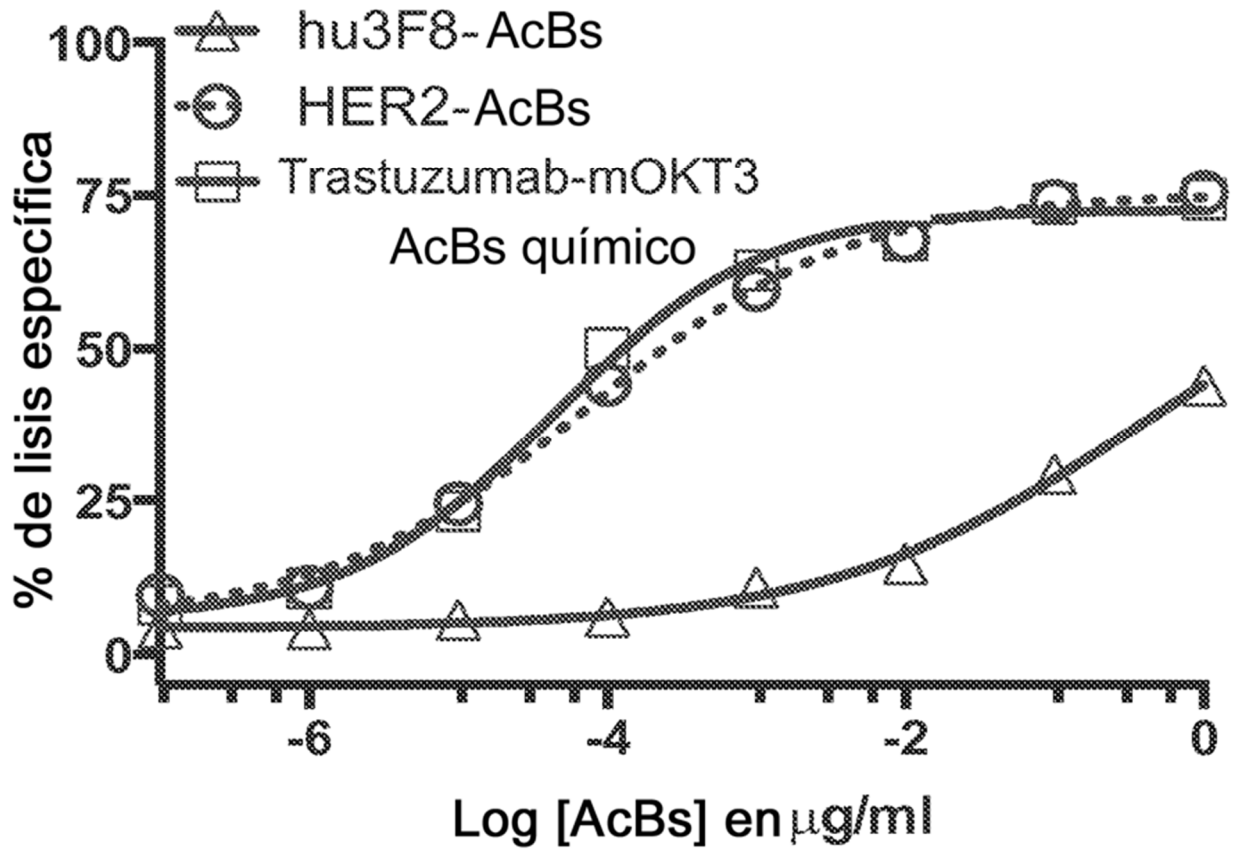


Fig. 3

Tipo de tumor	Nombre de línea celular	Expresión de HER2 (IFM)	CE50 (ng/ml)	CE50 (pM)
Carcinoma de mama	AU565	1175	0,06	0,3
Carcinoma de mama	SKBR3	760	0,2	1
Carcinoma de mama	MCF7	296	0,32	1,6
Carcinoma de ovario	OVCAR3	183	0,36	1,8
Carcinoma de mama	MDA-MB-361 (HTB27)	777	0,5	2,5
Melanoma	SKMEL28	190	0,6	3
Osteosarcoma	CRL1427	108	2	10
Sarcoma de Ewing	SKEAW	246	2	10
Rabdomiosarcoma	HTB82	204	2	10
Melanoma	HT-144 (HTB63)	156	3	15
Neuroblastoma	NB5	66	3,1	15,5
Carcinoma de mama	MDA-MB-231 (HTB26)	68	4	20
Osteosarcoma	U2OS	90	4,5	22,5
Sarcoma de Ewing	SKES-1	146	10	50
Melanoma	M14	57	26	130
Neuroblastoma	NMB7	12	>1000	>5000
Neuroblastoma	IMR32	6	>1000	>5000
Cáncer de pulmón de células pequeñas	NCI-H524	14	>1000	>5000
Neuroblastoma	SKNBE(1)N	3	>1000	>5000
Neuroblastoma	SKNBE(2)C	8	>1000	>5000
Cáncer de pulmón de células pequeñas	NCI-H69	10	>1000	>5000
Neuroblastoma	SKNBE(2)S	4	>1000	>5000
Cáncer de pulmón de células pequeñas	NCI-H345	6	>1000	>5000
Carcinoma de mama	MDA-MB-468 (HTB132)	6	>1000	>5000

Fig. 4

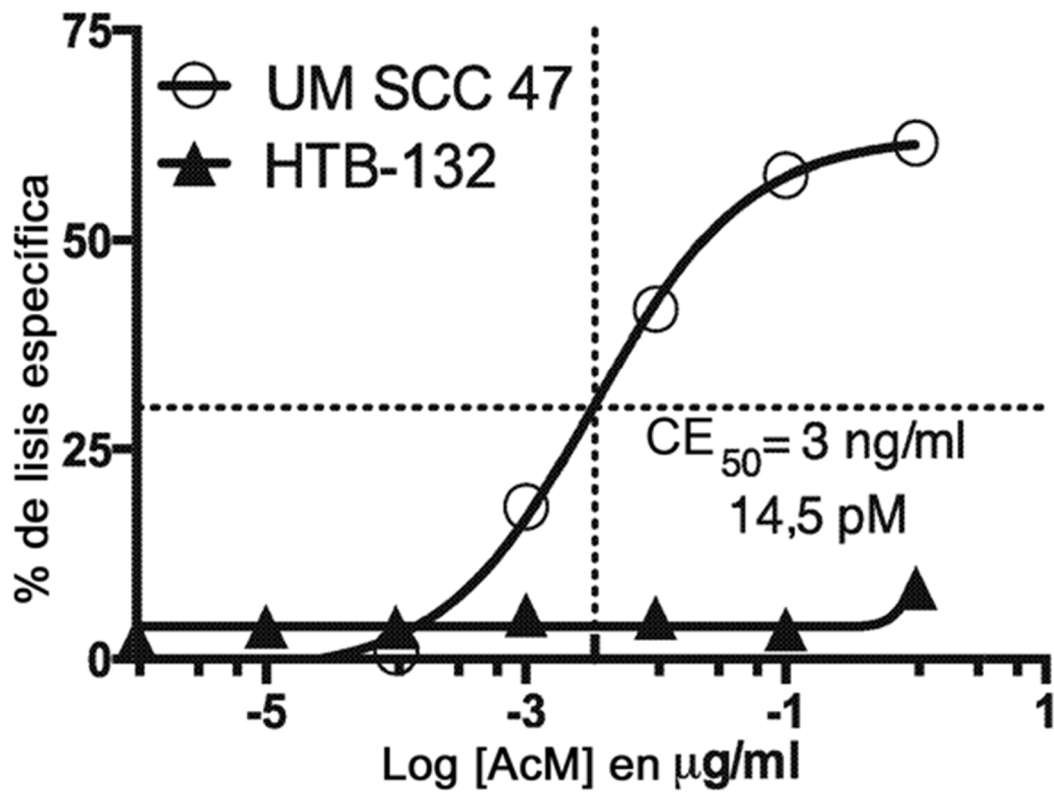


Fig. 5A

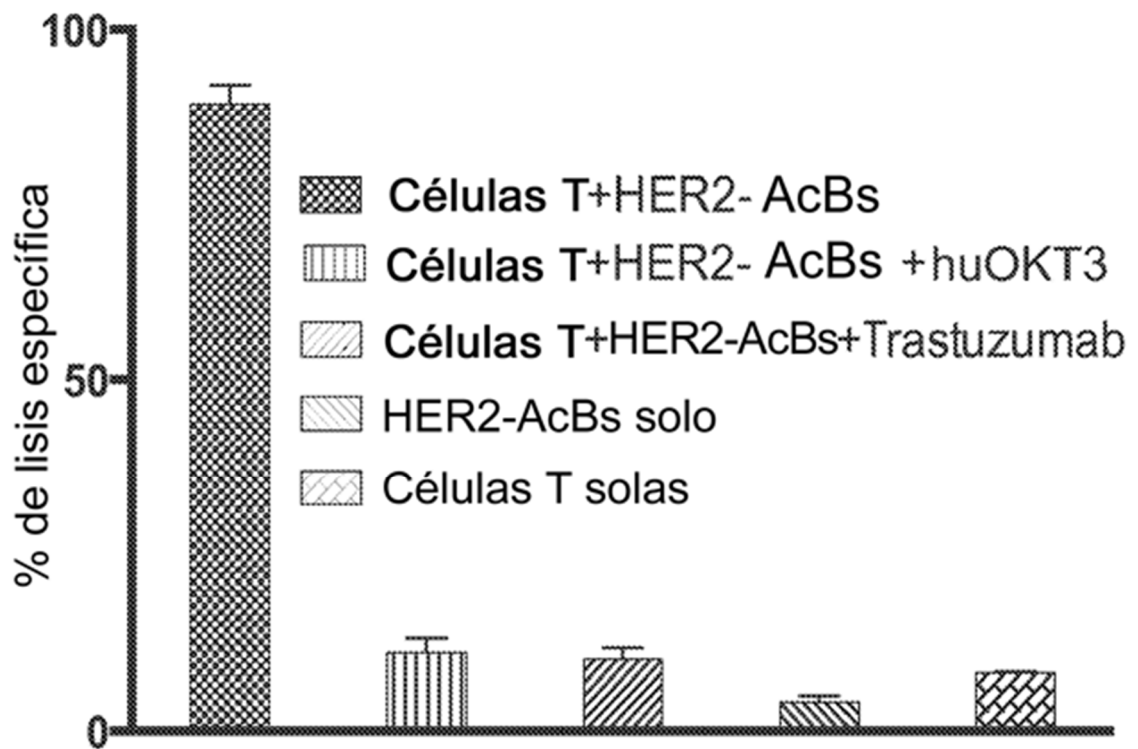


Fig. 5B

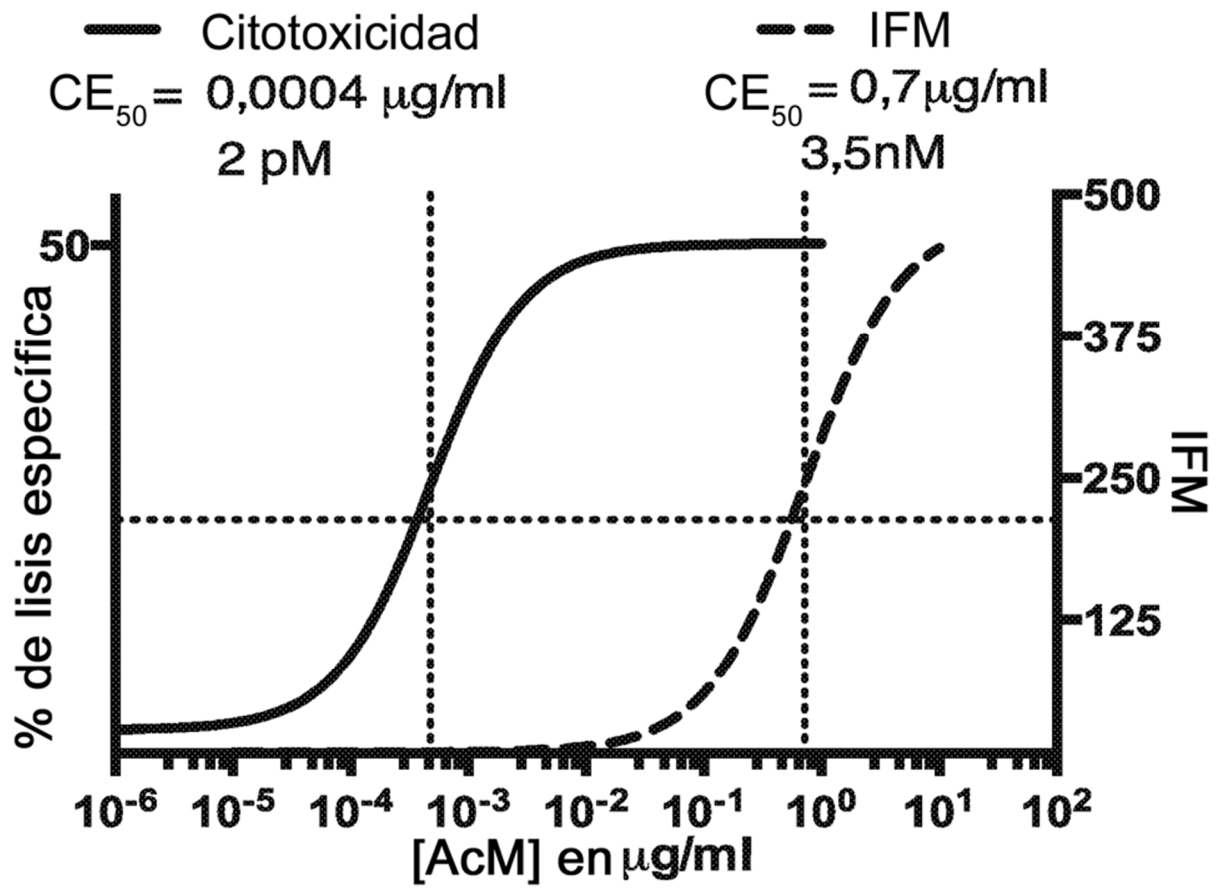
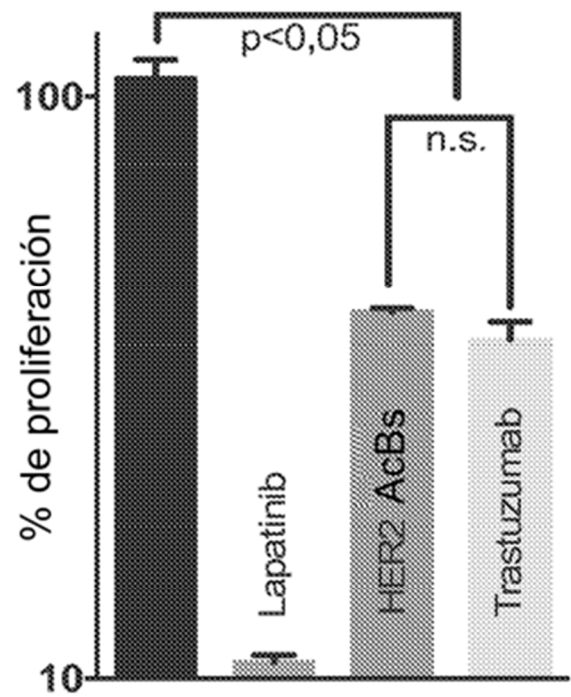
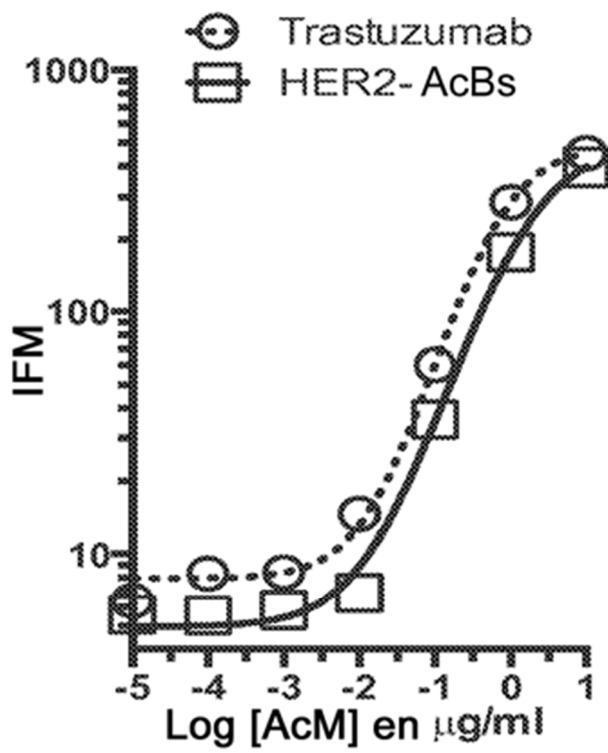
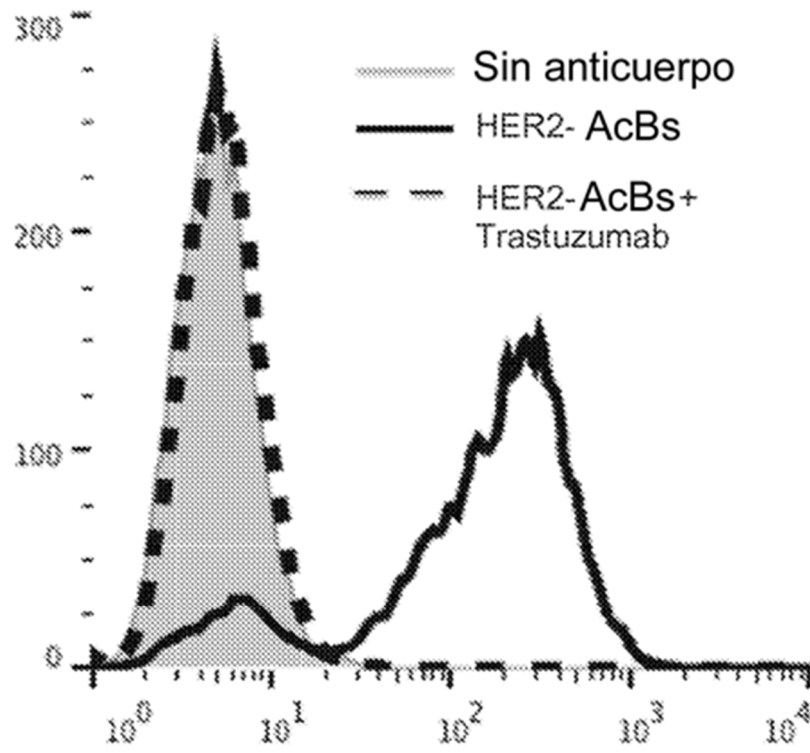


Fig. 6



Líneas celulares de CCECC	% de lisis máx.	HER2 en flujo (IFM)	qPCR (con rela- ción a MCF7)	Número de experimentos	CE50 ng/ml	CE50 pM
15B	47	305	121	2	13	63
93VU147T	45	127	151	3	6	32
PCI-30	53	359	237	3	2	12
SCC90	46	274	578	3	1	6
UDSCC2	42	178	139	5	5	27
UMSCC47	57	302	49	3	4	20

Fig. 8

Fig. 9A

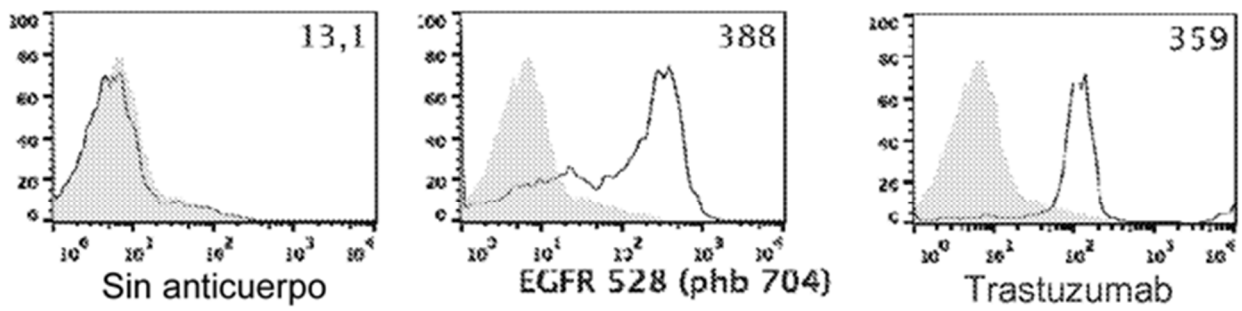


Fig. 9B

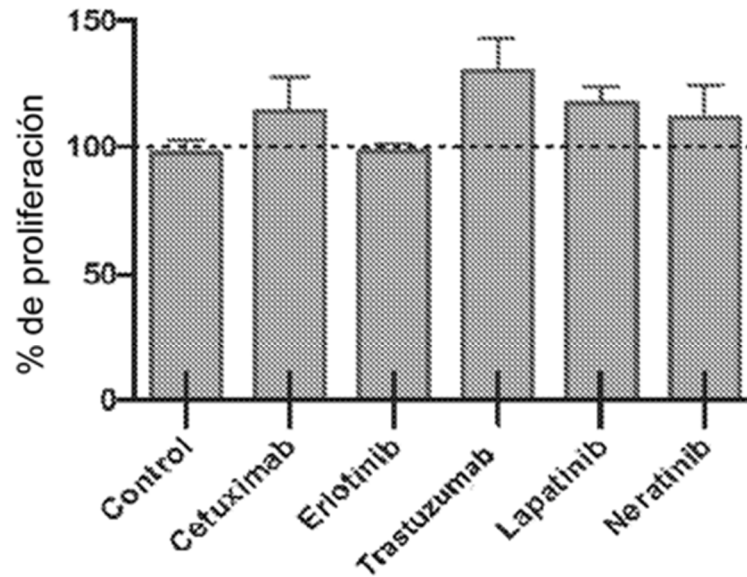
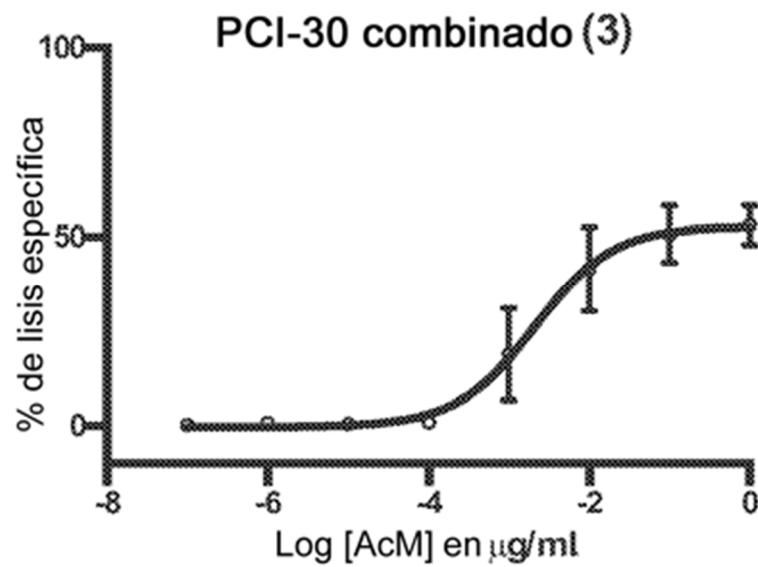


Fig. 9C



Líneas celulares de osteosarcoma	% de lisis máx.	HER2 en flujo (IFM)	qPCR (con rela- ción a MCF7)	Número de experimentos	CE50 ng/ml (promedio)	CE50 pM
U2OS	49	53	713	3	5	25
RG 160	62	563	1881	3	2	11
RG 164	68	439	5510	4	4	18
CRL 1427	46	81	52	2	3	16

Fig. 10

Fig. 11A

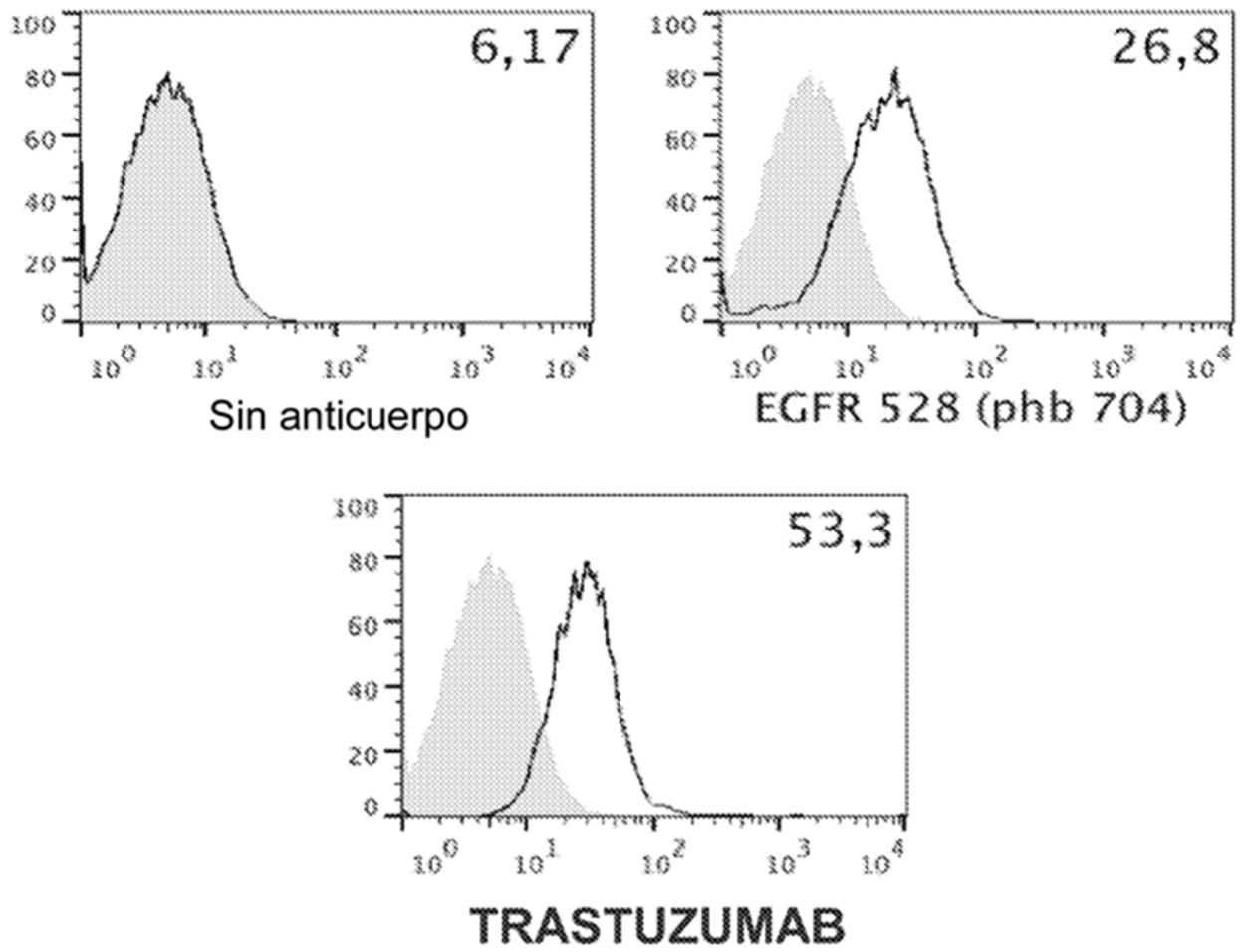


Fig. 11B

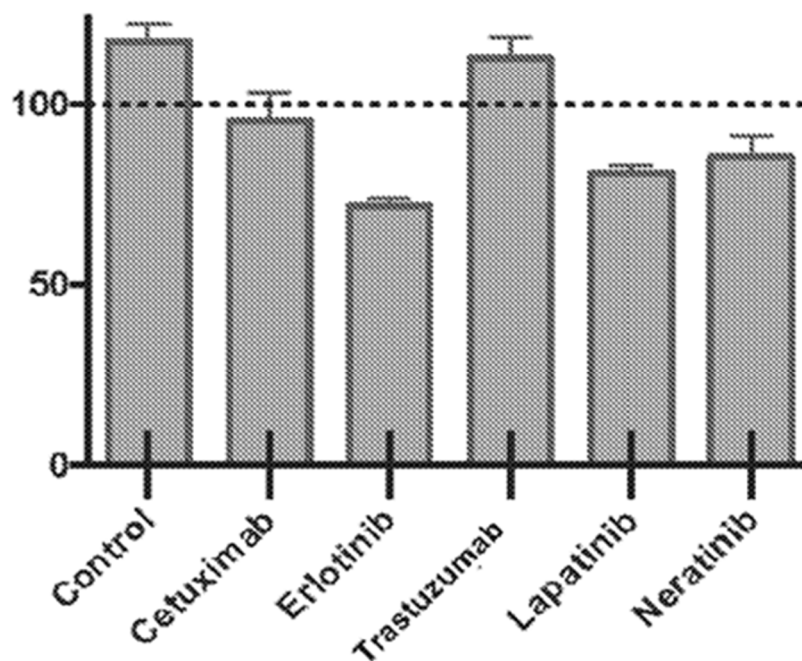
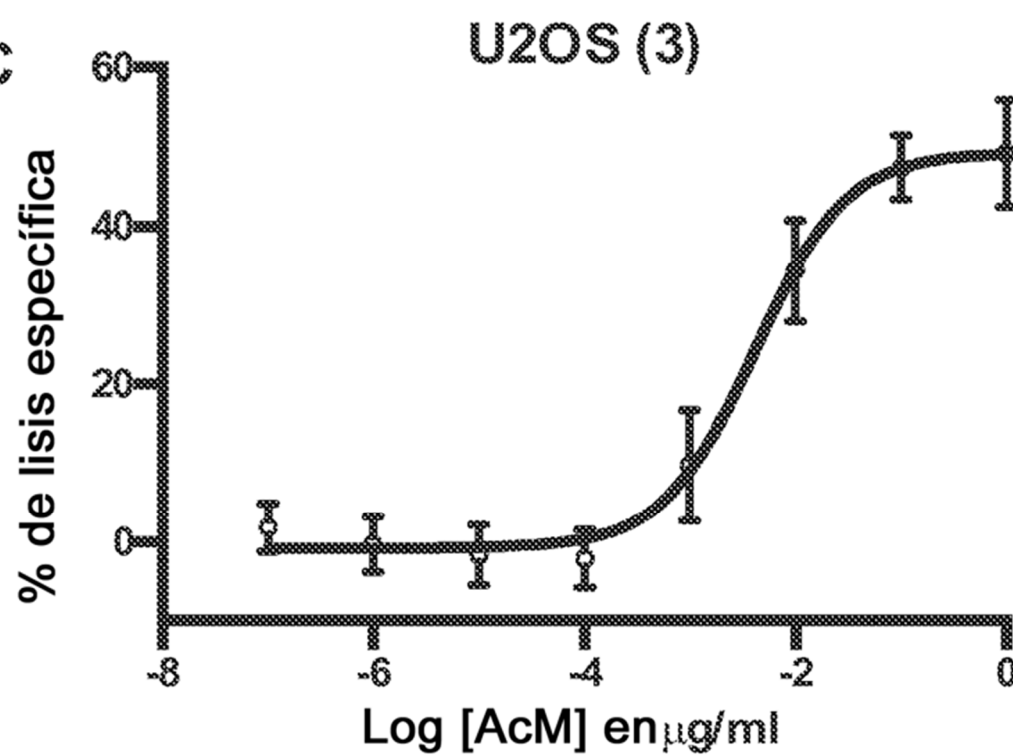


Fig. 11C



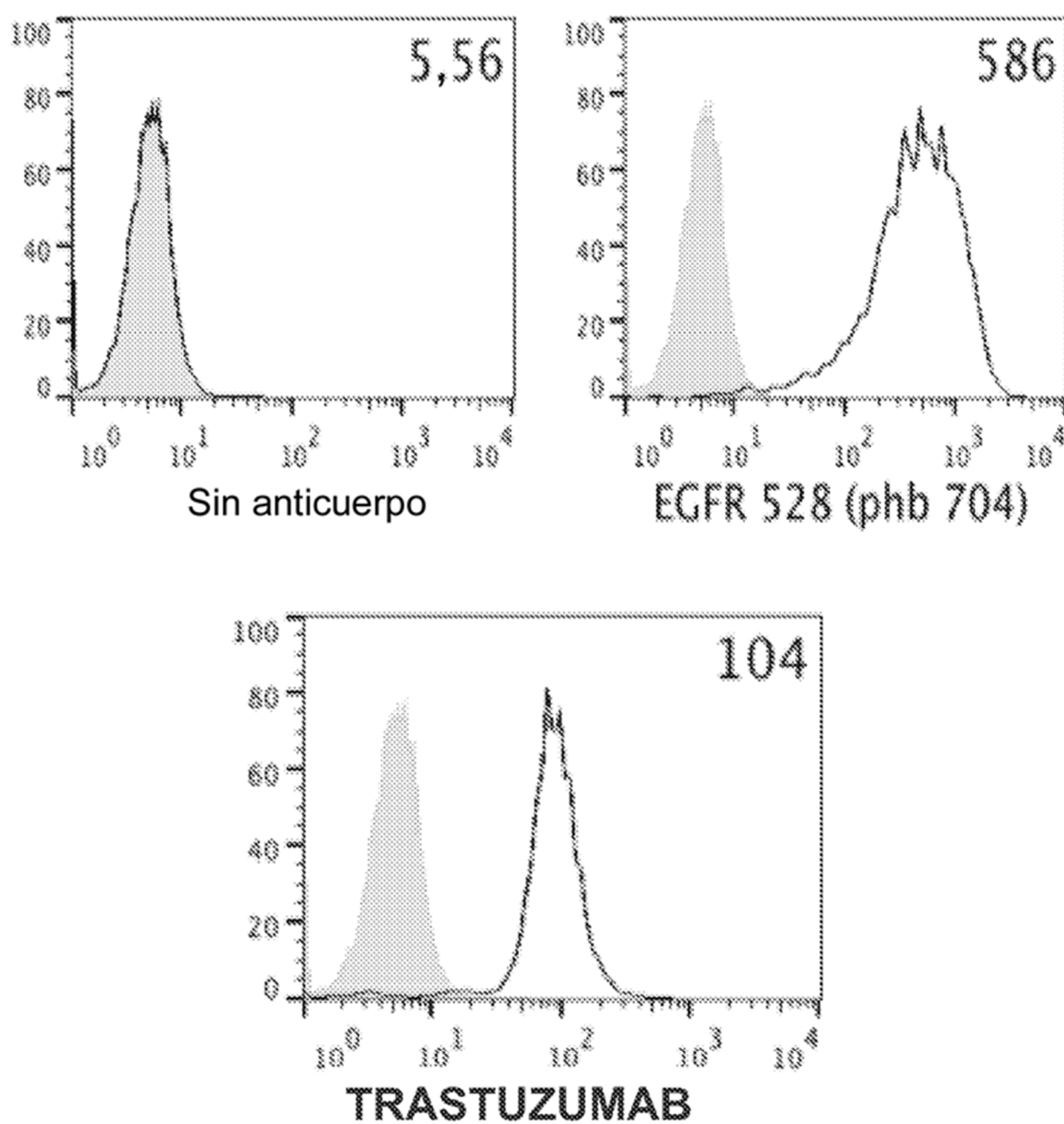


Fig. 12A

Fig. 12B

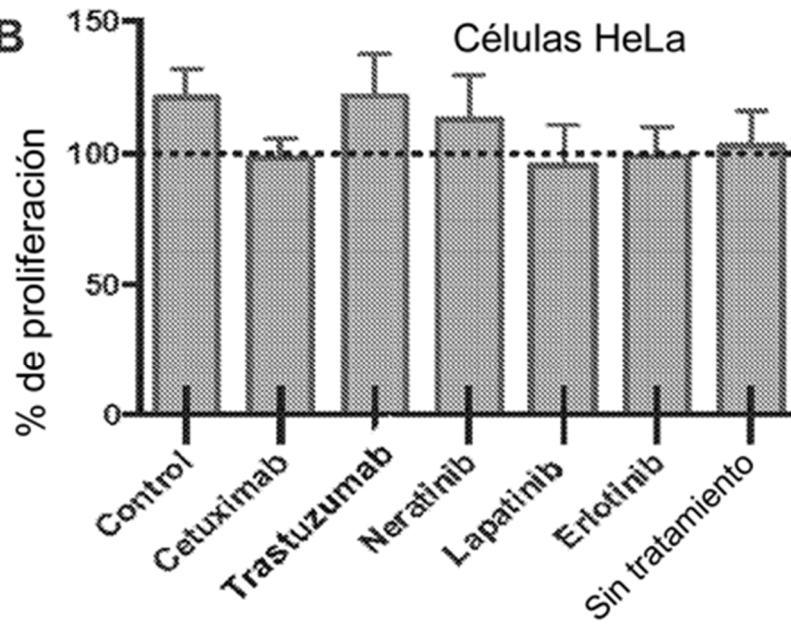


Fig. 12C

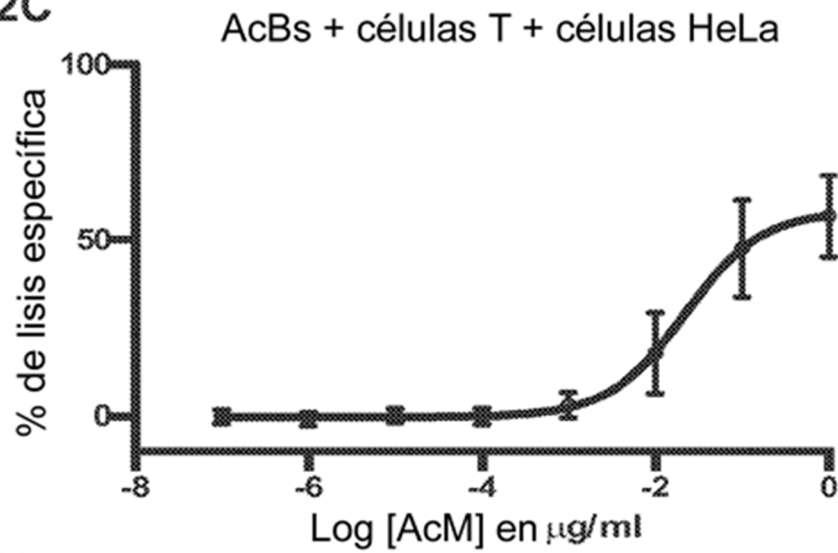
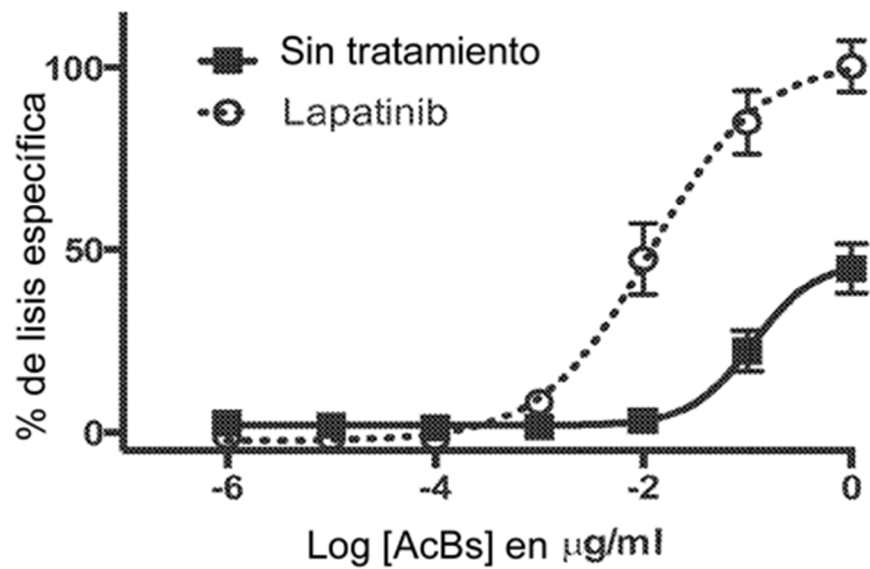


Fig. 12D



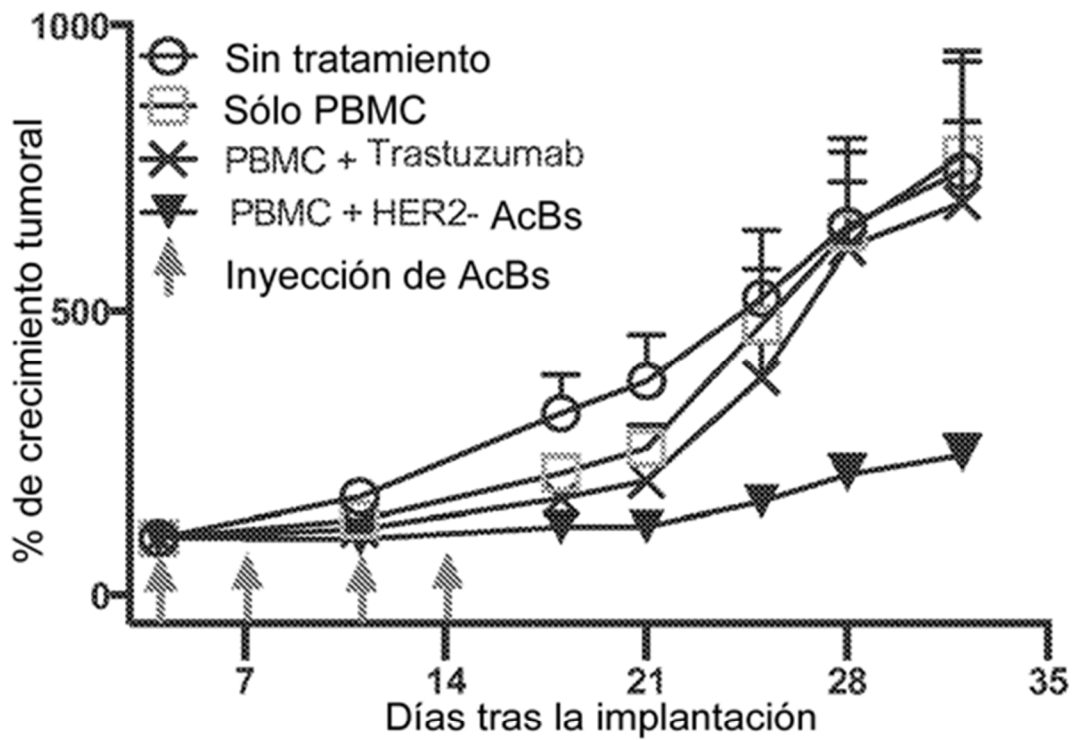


Fig. 13

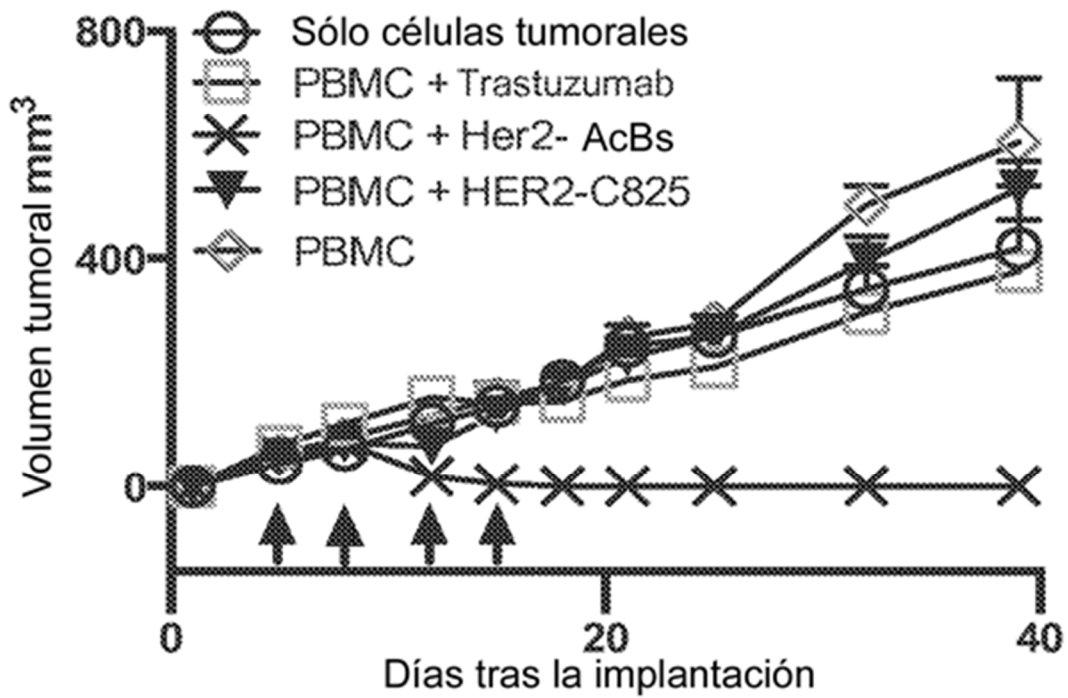


Fig. 14

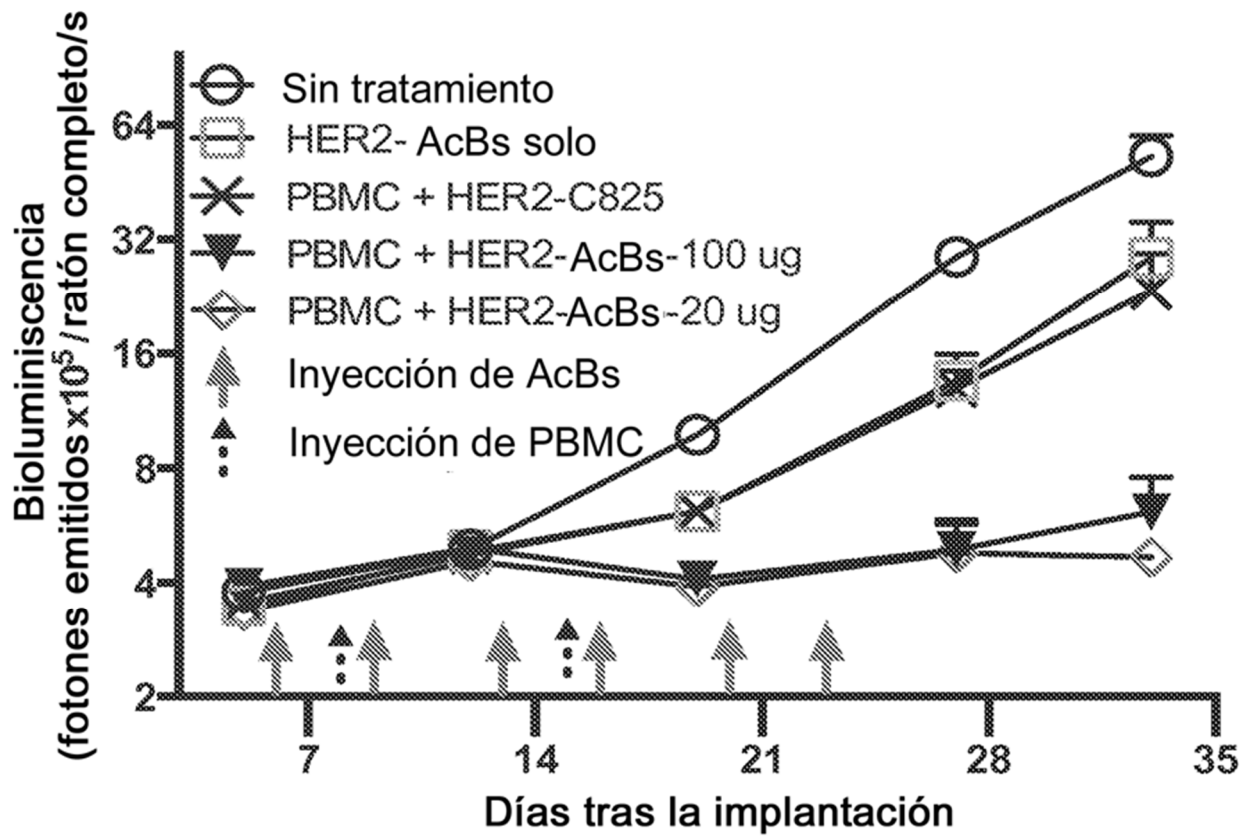


Fig. 15

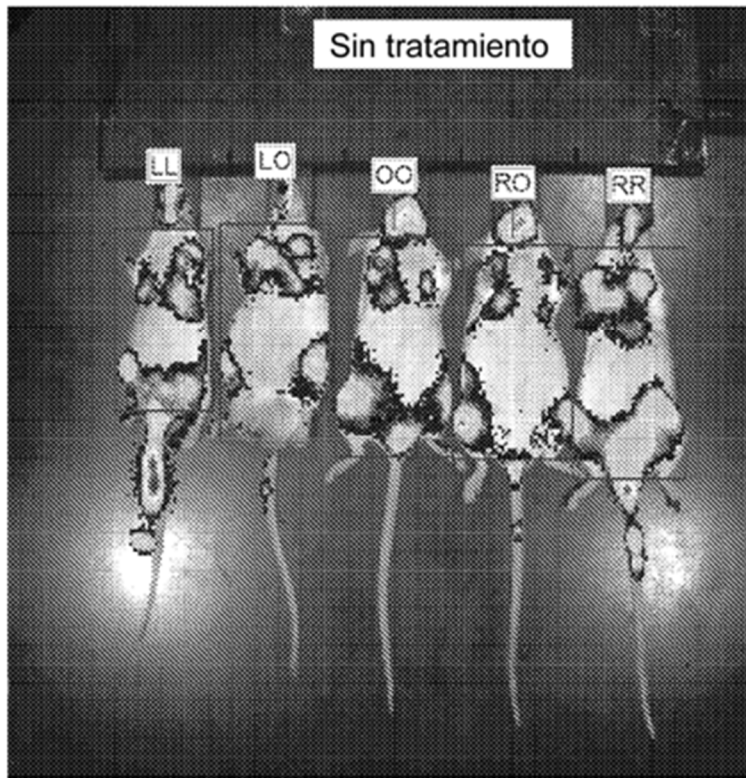


Fig. 16A

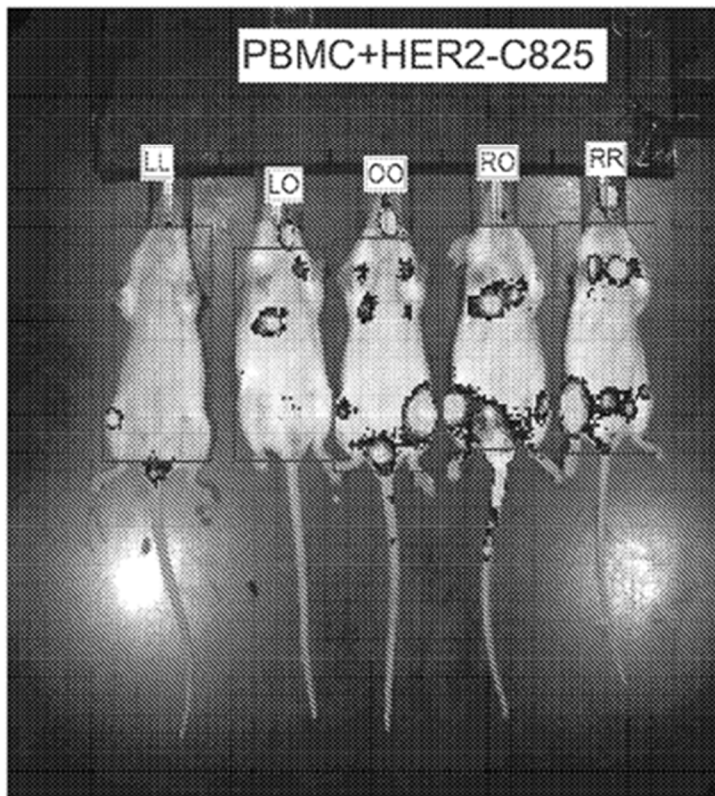


Fig. 16B

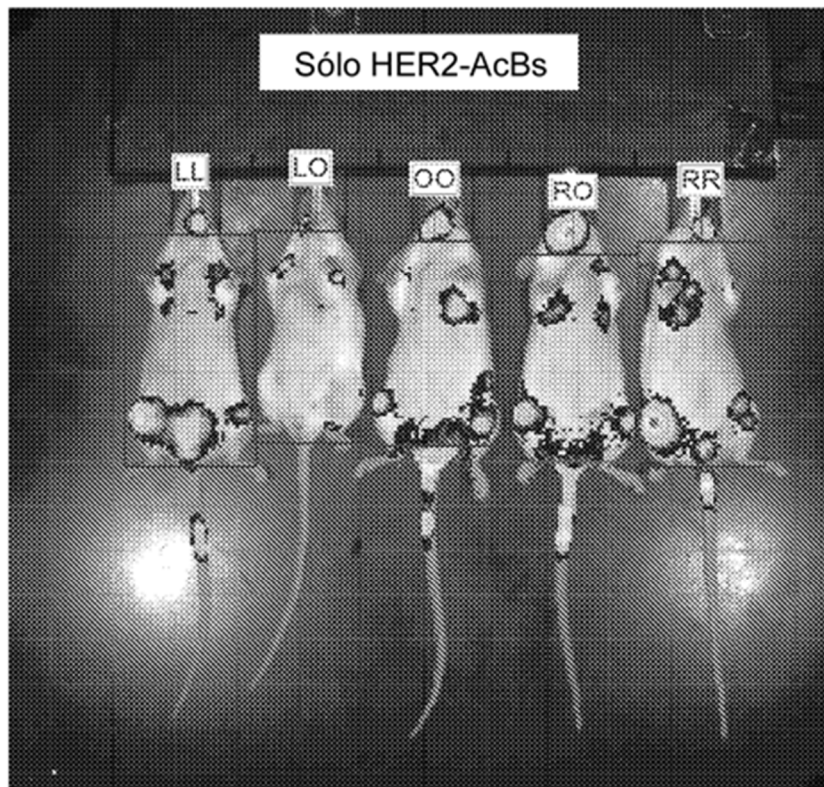
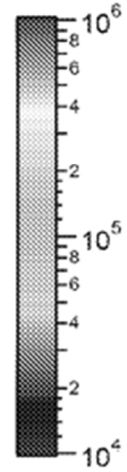


Fig. 16C

Imagen
Min = -10937
Máx = 8,1892e+05
p/s/cm²/sr



Barra de color
Min = 10000
Máx = 1e+06

resta de fondo
de campo plano
cósmica

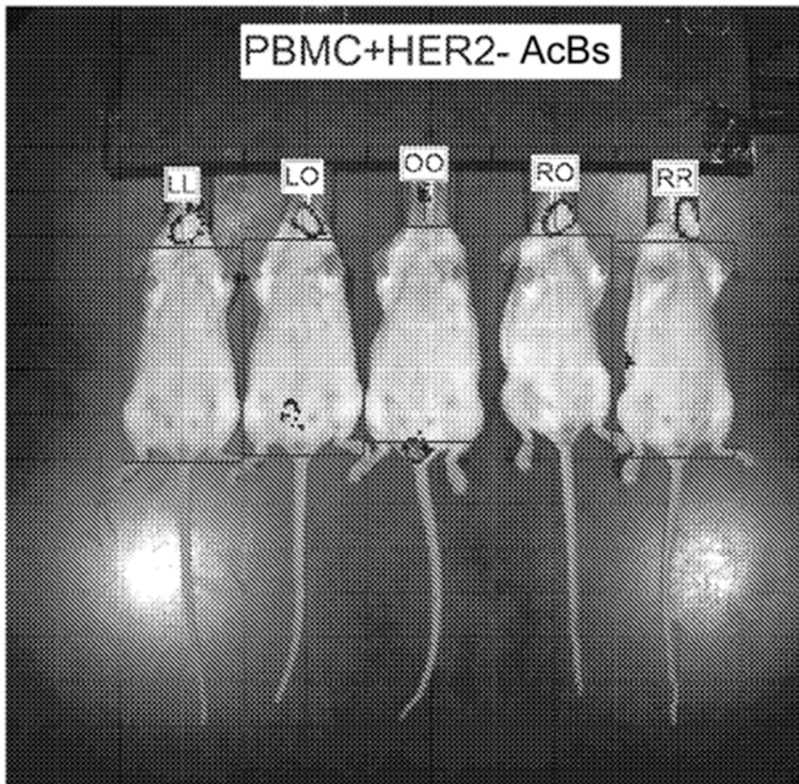
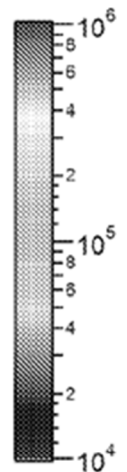


Fig. 16D

Imagen
Min = -9174,2
Máx = 3,214e+05
p/s/cm²/sr



Barra de color
Min = 10000
Máx = 1e+06

resta de fondo
de campo plano
cósmica

HER2- AcBs
(PM 210 Kda)

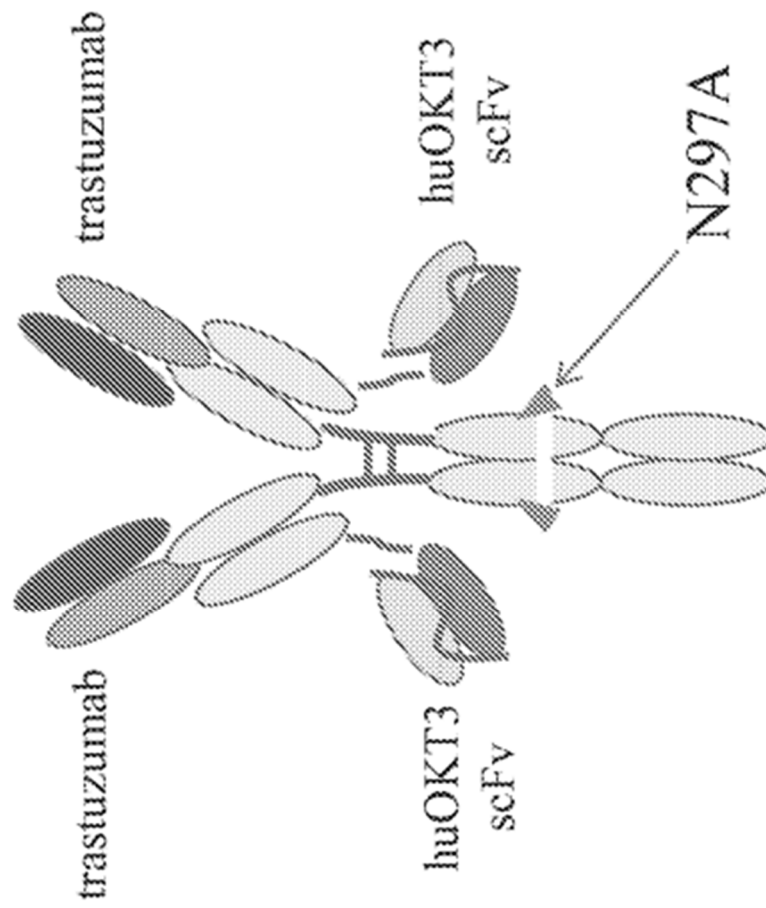


Fig. 17A

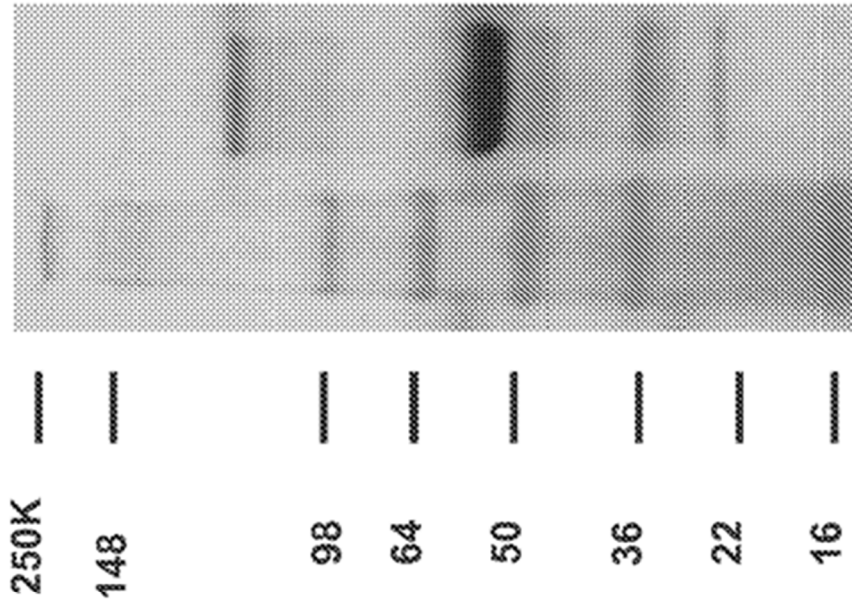
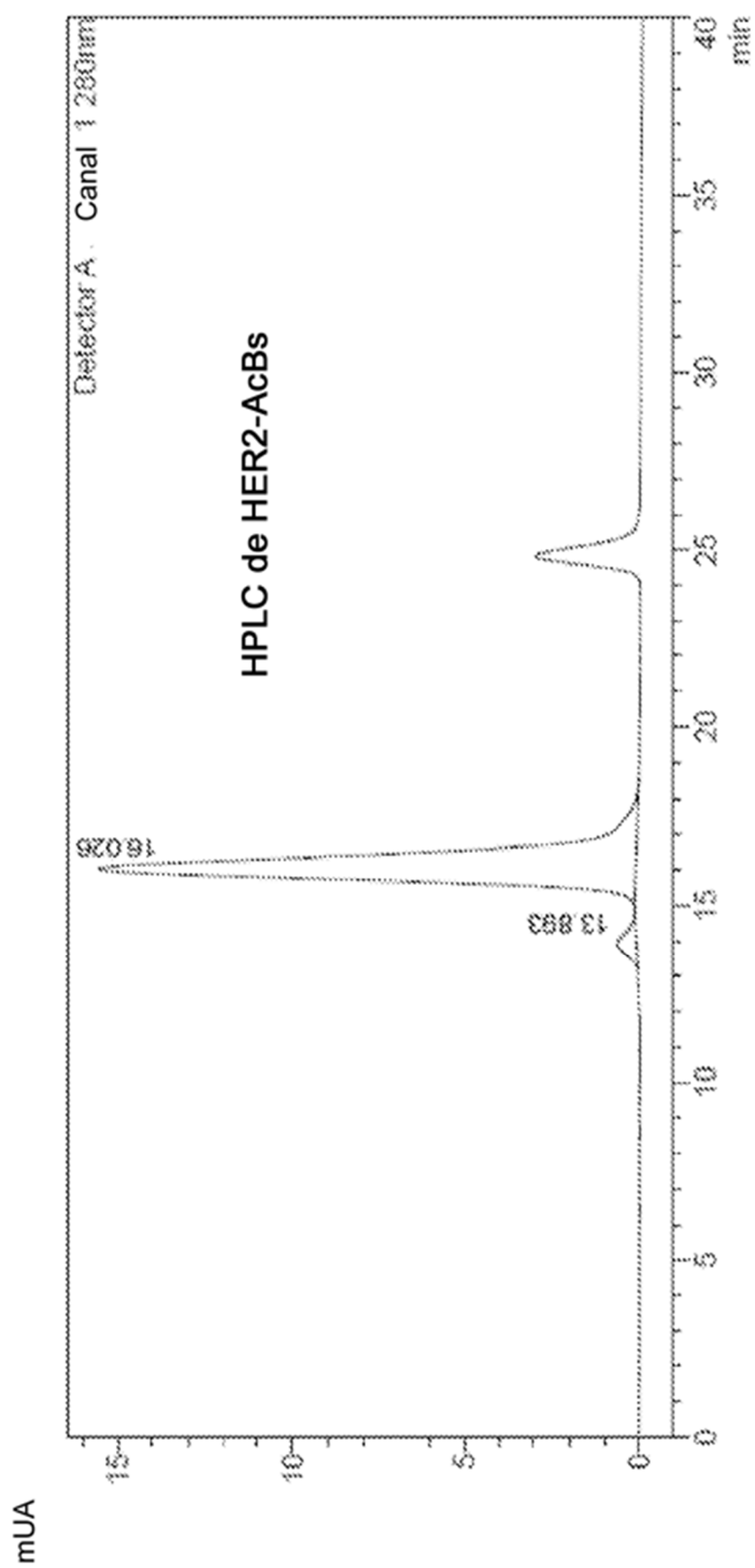


Fig. 17B

**Fig. 17C**

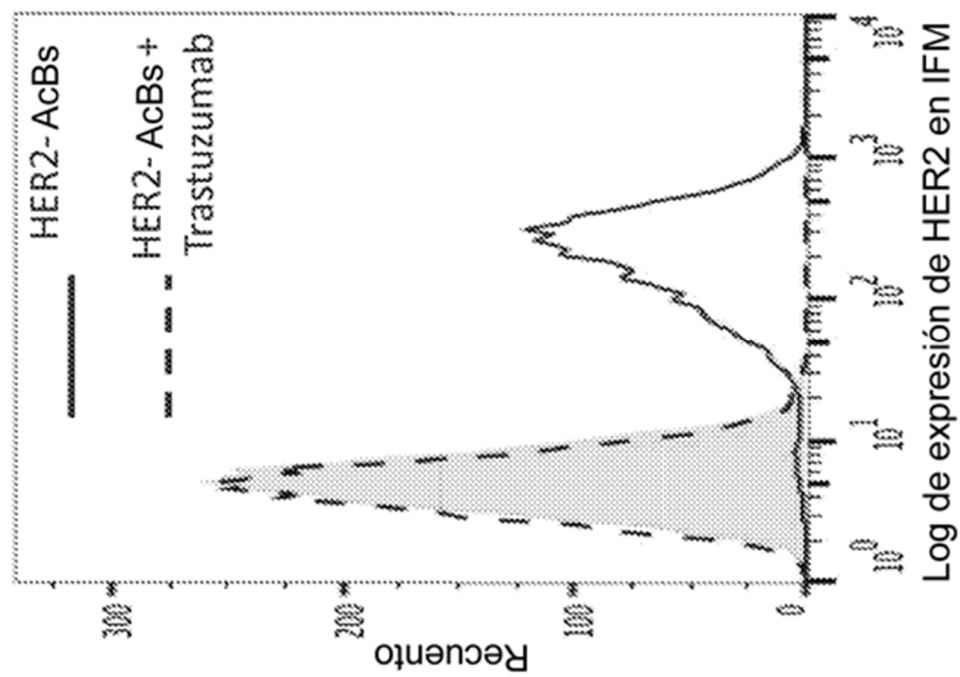


Fig. 18A

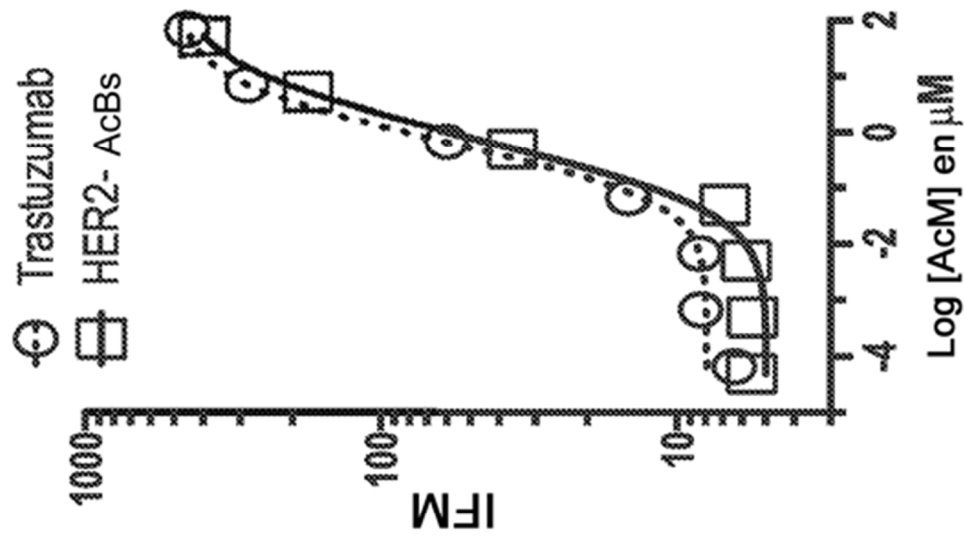


Fig. 18B

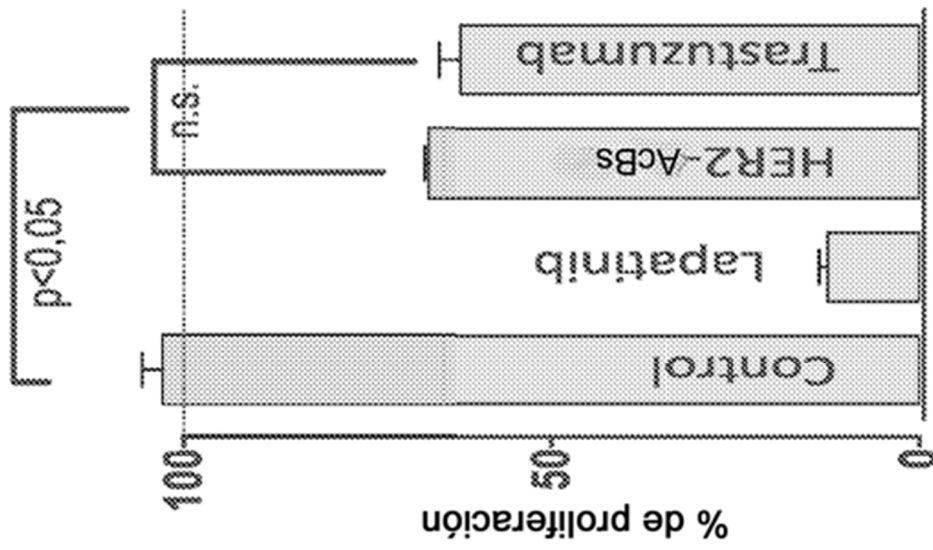


Fig. 18C

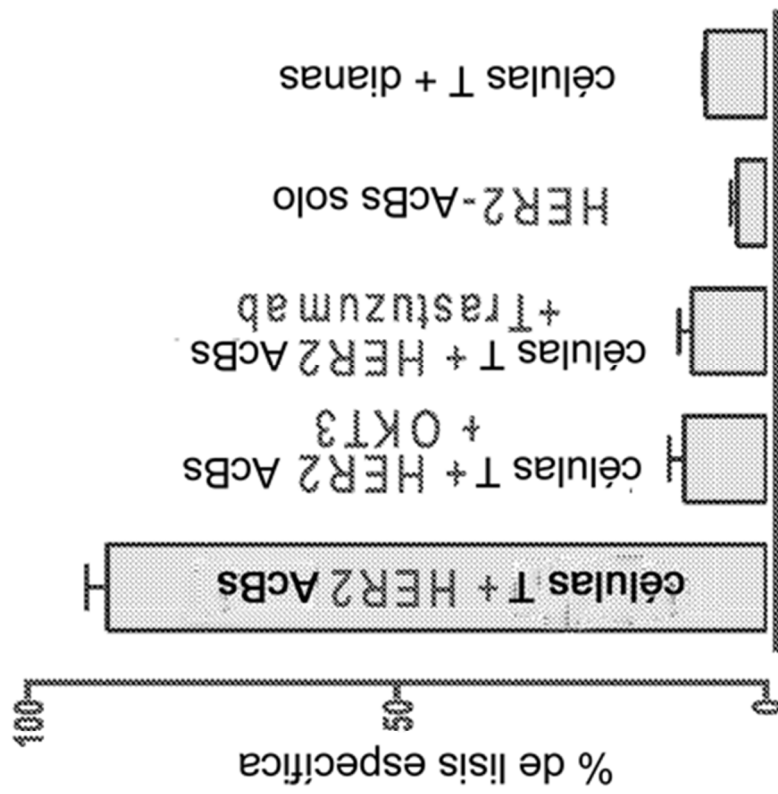


Fig. 19B

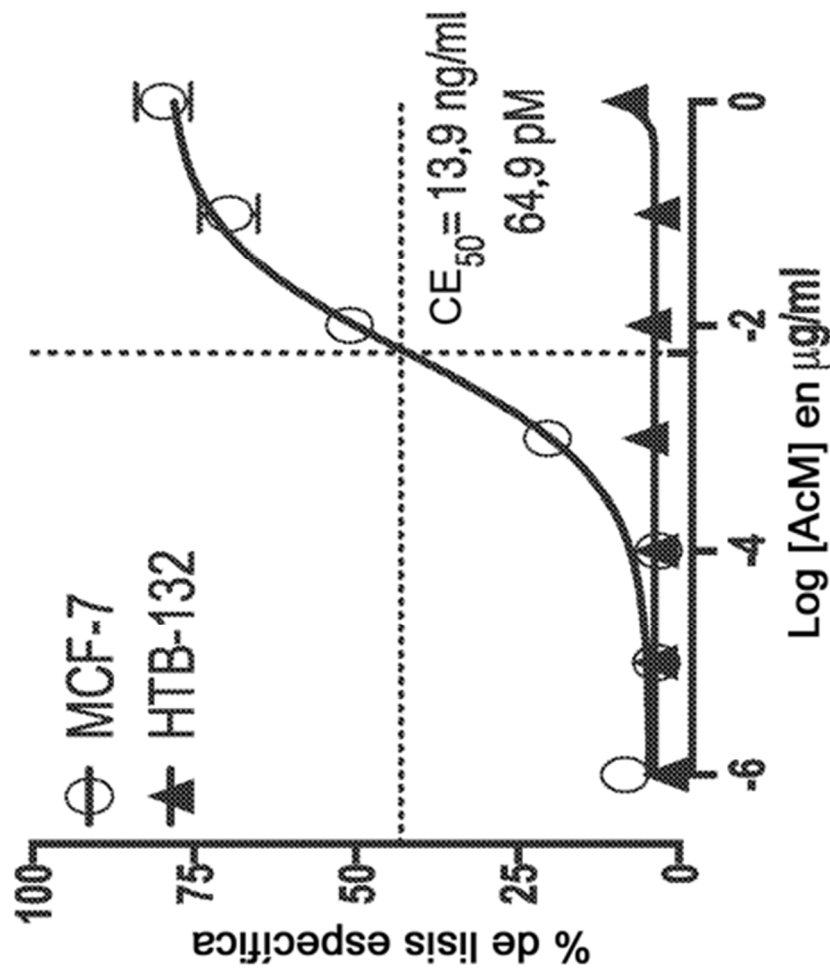
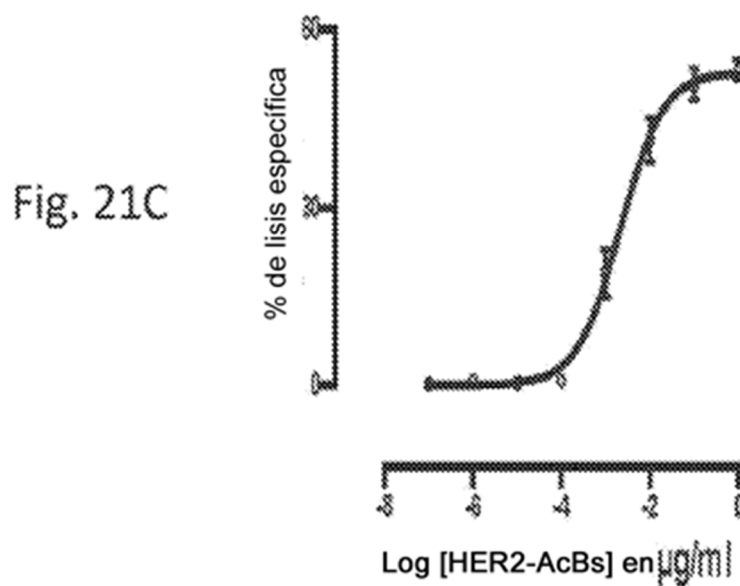
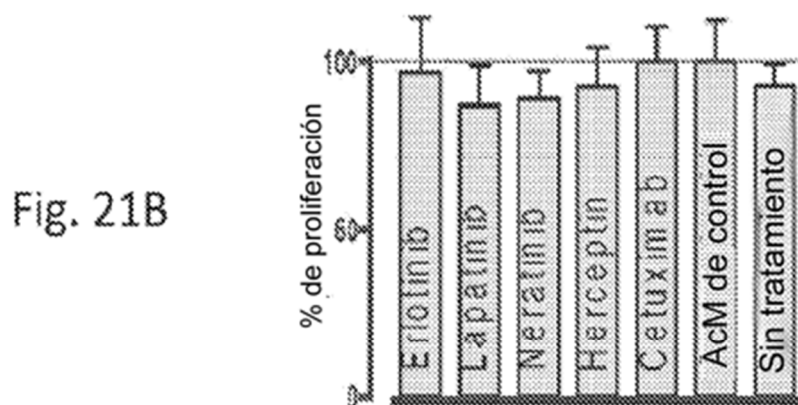
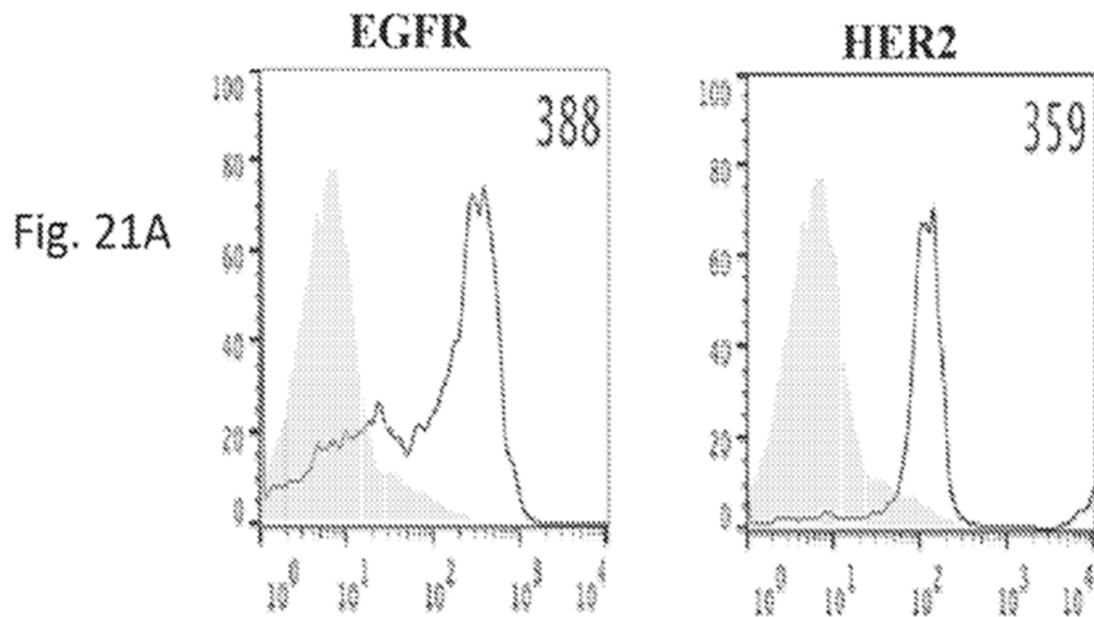


Fig. 19A

Tipo de tumor	Línea celular	Expresión de HER2 (IFM)	CE50(pM)
Carcinoma de mama	AU565	1175	0,3
Carcinoma de ovario	OVCAR3	183	1,8
Carcinoma de mama	MDA-MB-361	777	2,5
Carcinoma de ovario	SKOV3	1577	2,8
Melanoma	SKMEL28	190	3
Carcinoma de mama	SKBR3	2506	4,1
Carcinoma de mama	HCC1954	1597	5,5
Cáncer de cabeza y cuello	SCC90	274	5,7
Sarcoma de Ewing	SKEAW	246	10
Osteosarcoma	CRL1427	108	10
Rabdomiosarcoma	HTB82	204	10
Osteosarcoma	RG 160	563	11
Cáncer de cabeza y cuello	PCI-30	359	12,2
Melanoma	HT-144	156	15
Neuroblastoma	NB5	66	15,5
Osteosarcoma	RG 164	439	17,7
Cáncer de cabeza y cuello	UM SCC47	302	19,8
Osteosarcoma	U2OS	90	22,5
Cáncer de cabeza y cuello	UDSCC2	178	26,9
Cáncer de cabeza y cuello	93VU147T	127	32,4
Sarcoma de Ewing	SKES-1	146	50
Carcinoma de mama	HTB-26	76	50,2
Cáncer de cabeza y cuello	15B	305	62,8
Carcinoma de mama	MCF7	398	64,9
Cáncer de cuello uterino	HeLA	104	120,7
Melanoma	M14	57	130
Carcinoma de mama	MDA-MB-468	6	>5000
Neuroblastoma	NMB7	12	>5000
Neuroblastoma	SKNBE(2)C	8	>5000
Neuroblastoma	IMR32	6	>5000
Neuroblastoma	SKNBE(2)S	4	>5000
Neuroblastoma	SKNBE(1)N	3	>5000
Cáncer de pulmón de células pequeñas	NCI-H524	14	>5000
Cáncer de pulmón de células pequeñas	NCI-H69	10	>5000
Cáncer de pulmón de células pequeñas	NCI-H345	6	>5000

Fig. 20

Línea celular de carcinoma de cabeza y cuello PCI-30



Línea celular de carcinoma de mama HCC-1954

Fig. 21D

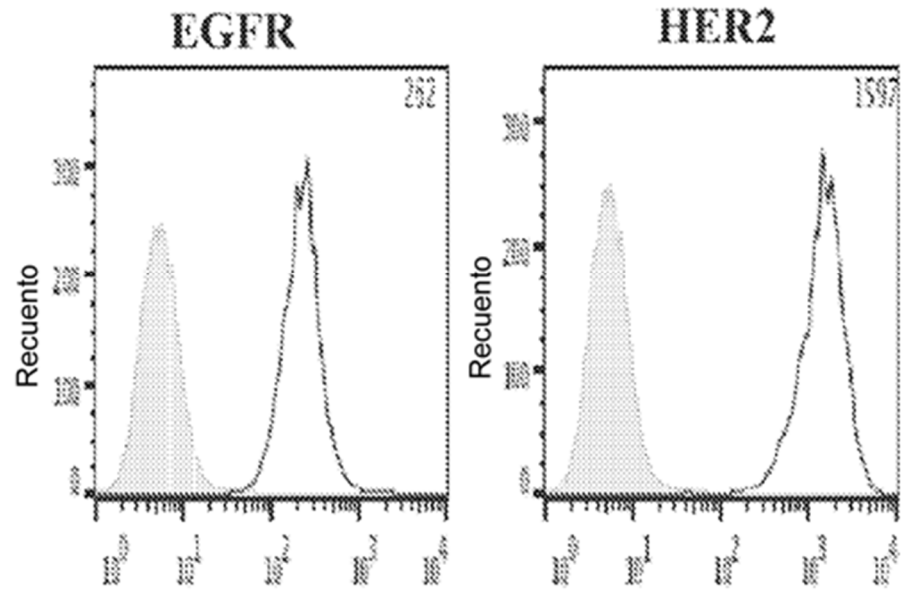


Fig. 21E

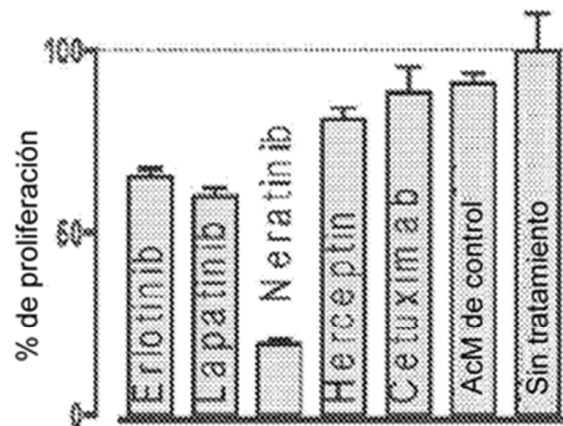
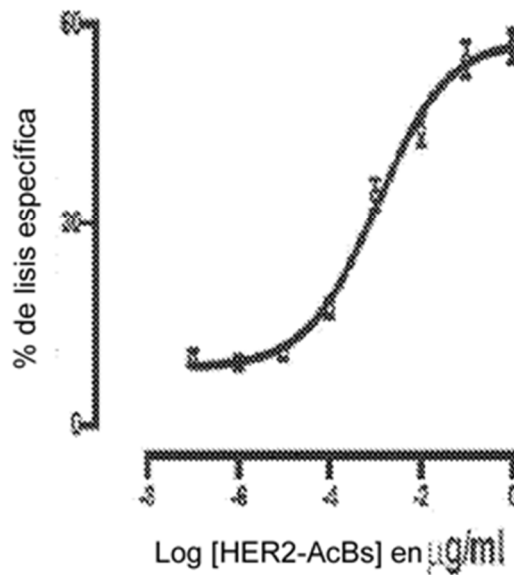


Fig. 21F



Línea celular de osteosarcoma U2OS

Fig. 21G

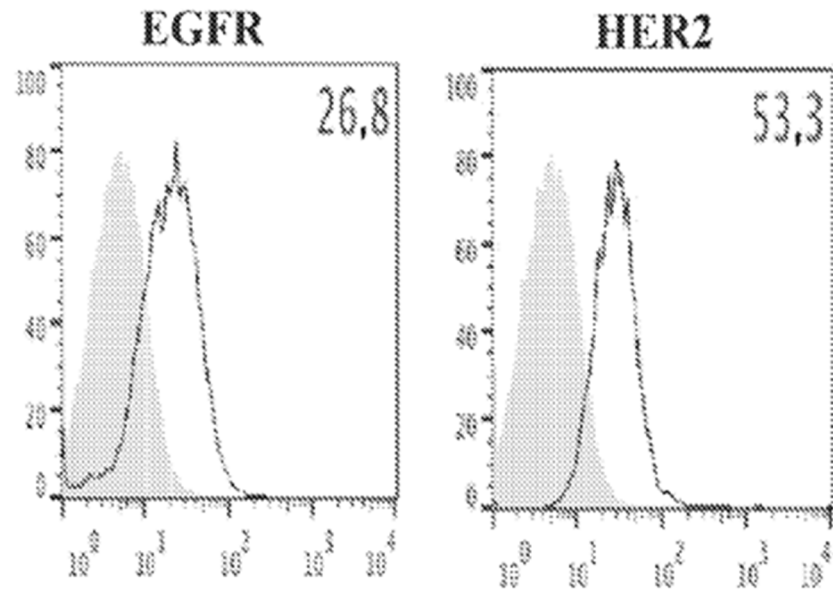


Fig. 21H

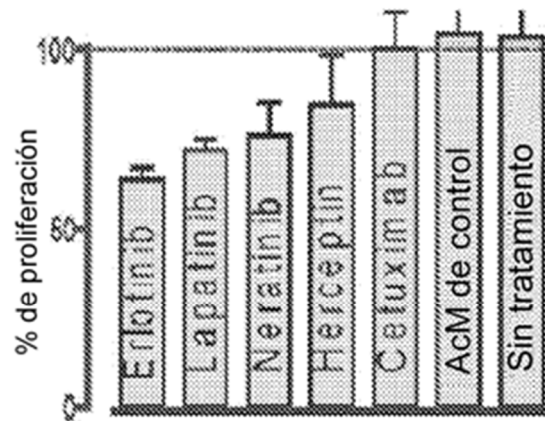
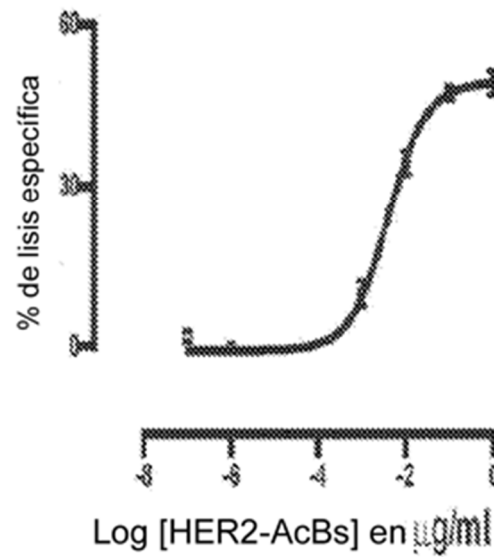
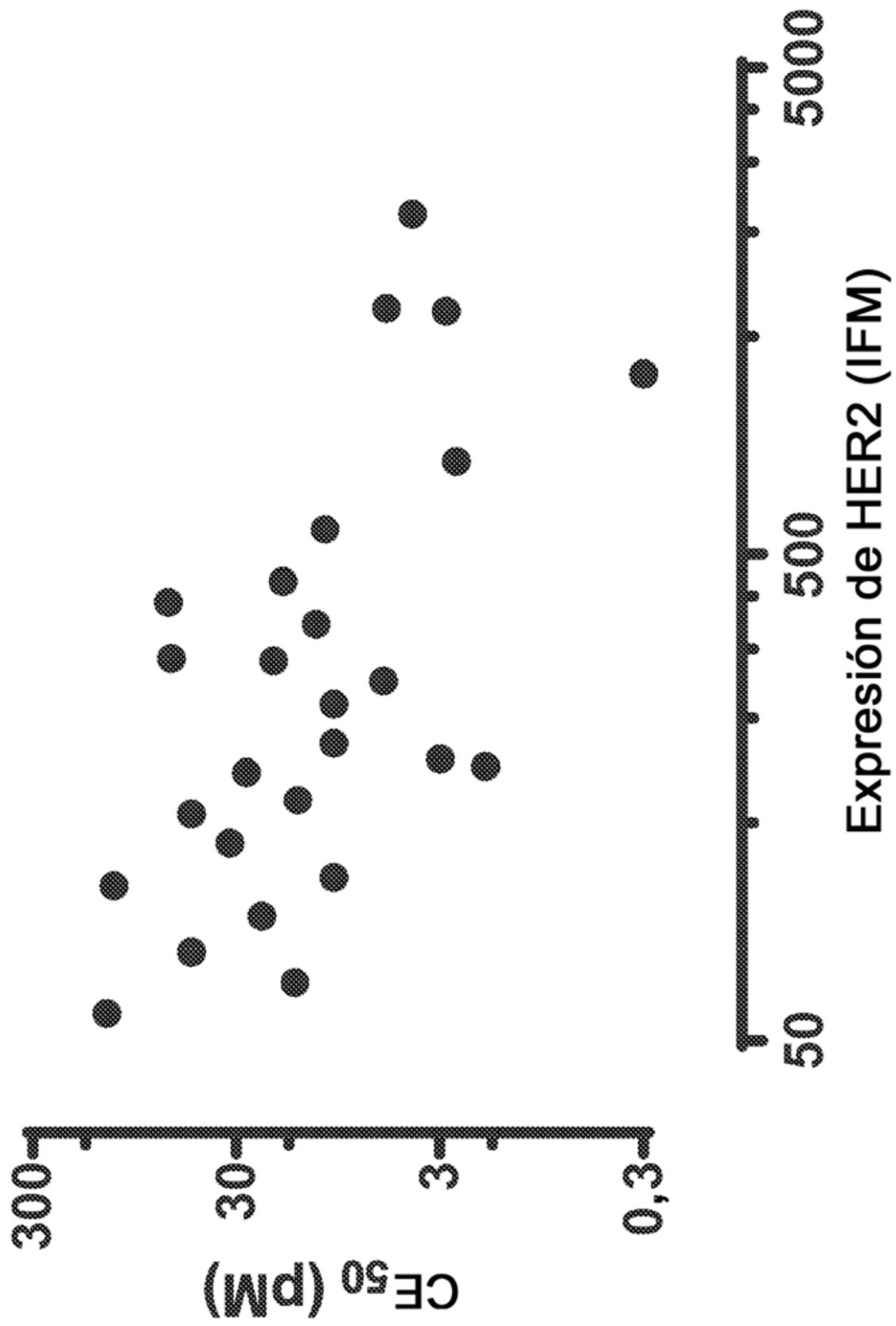


Fig. 21I





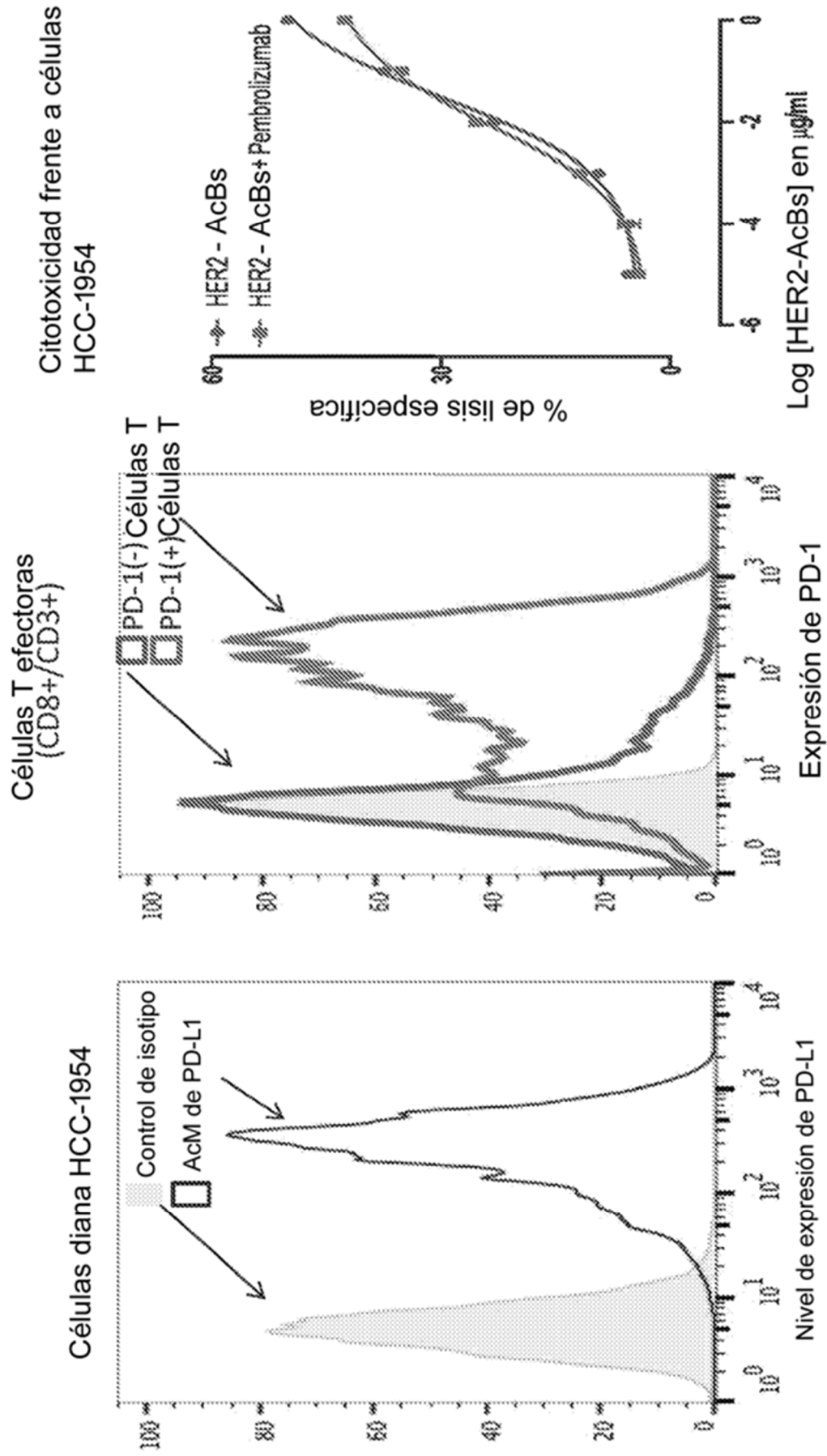


Fig. 23C

Fig. 23B

Fig. 23A

Expresión de PD-L1 en células diana

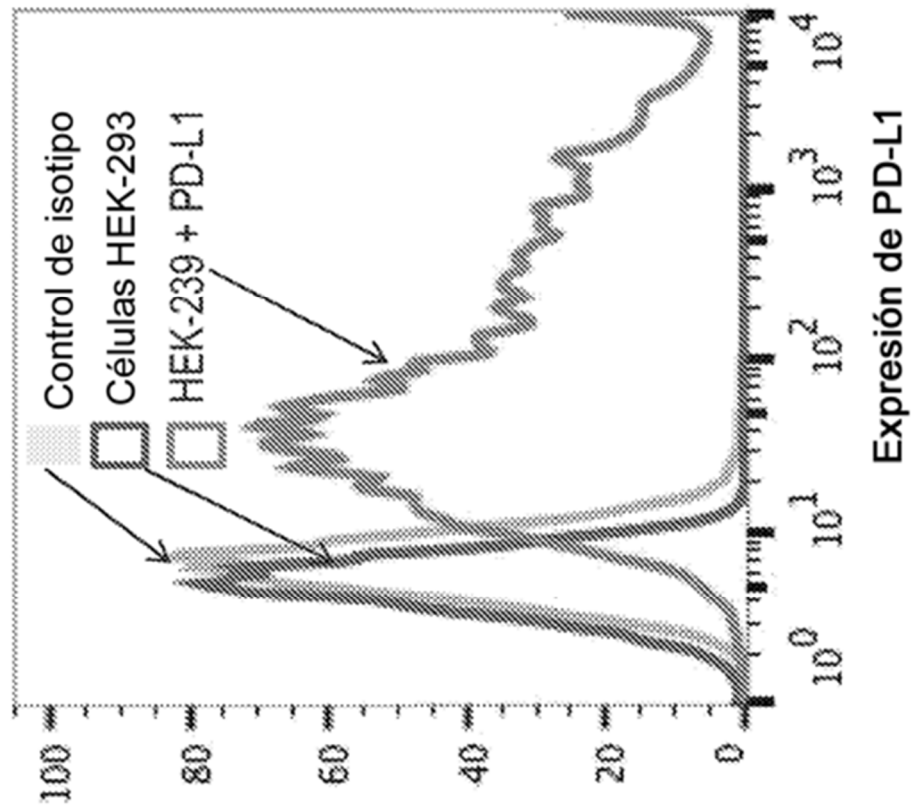


Fig. 24B

Citotoxicidad frente a células HEK-293 PD-L1(+) y PD-L1(-)

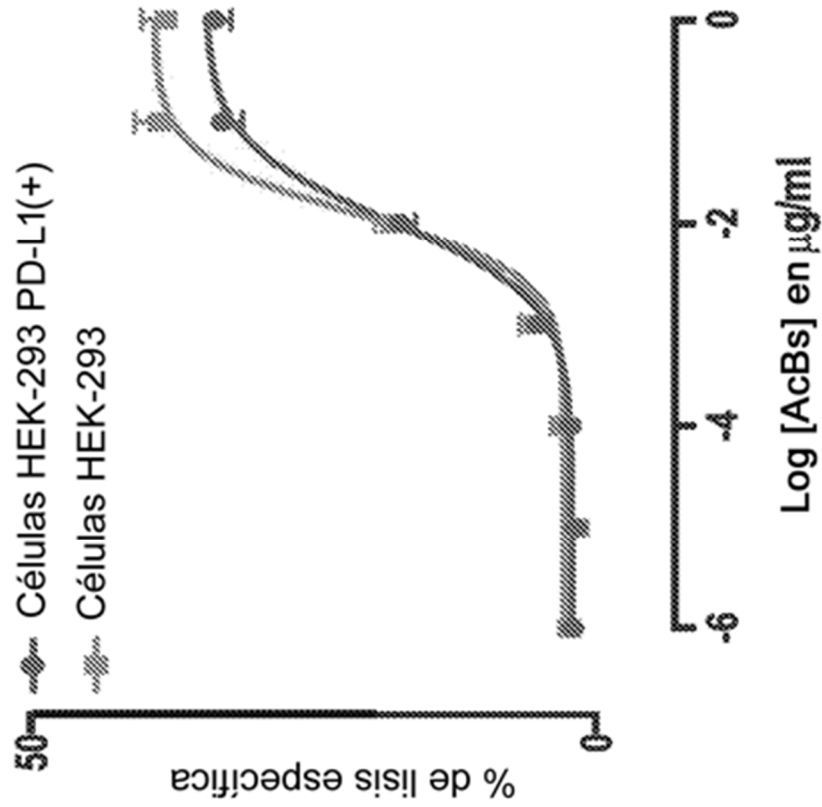


Fig. 24A

Células tumorales MCF7 s.c. + PBMC s.c. Células tumorales MCF7 i.v. + PBMC i.v.

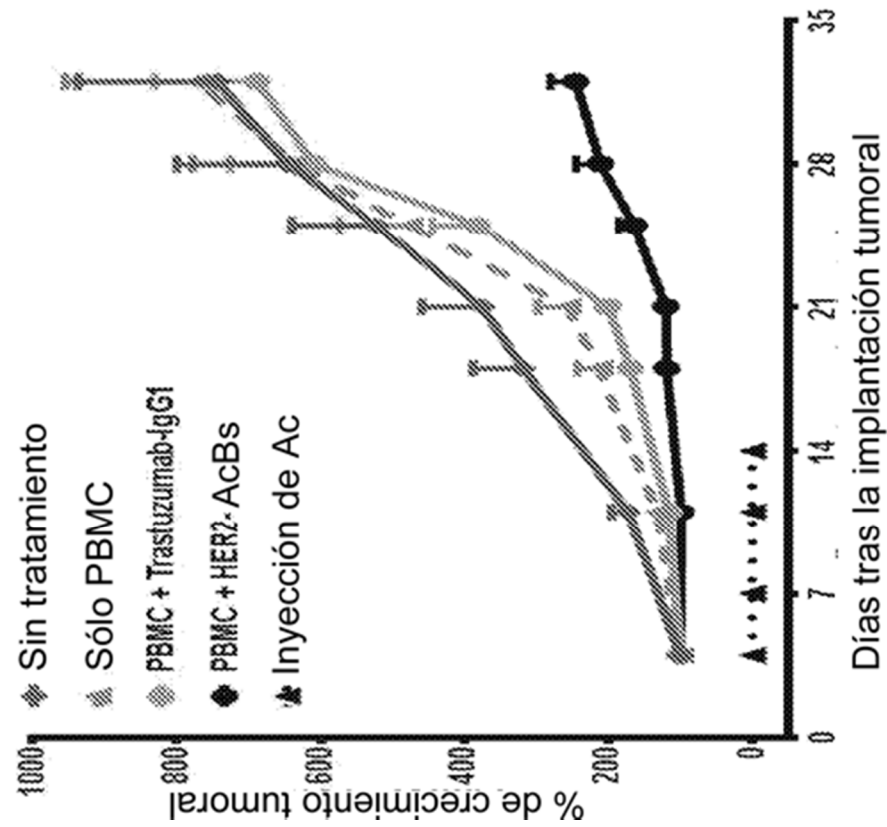


Fig. 25A

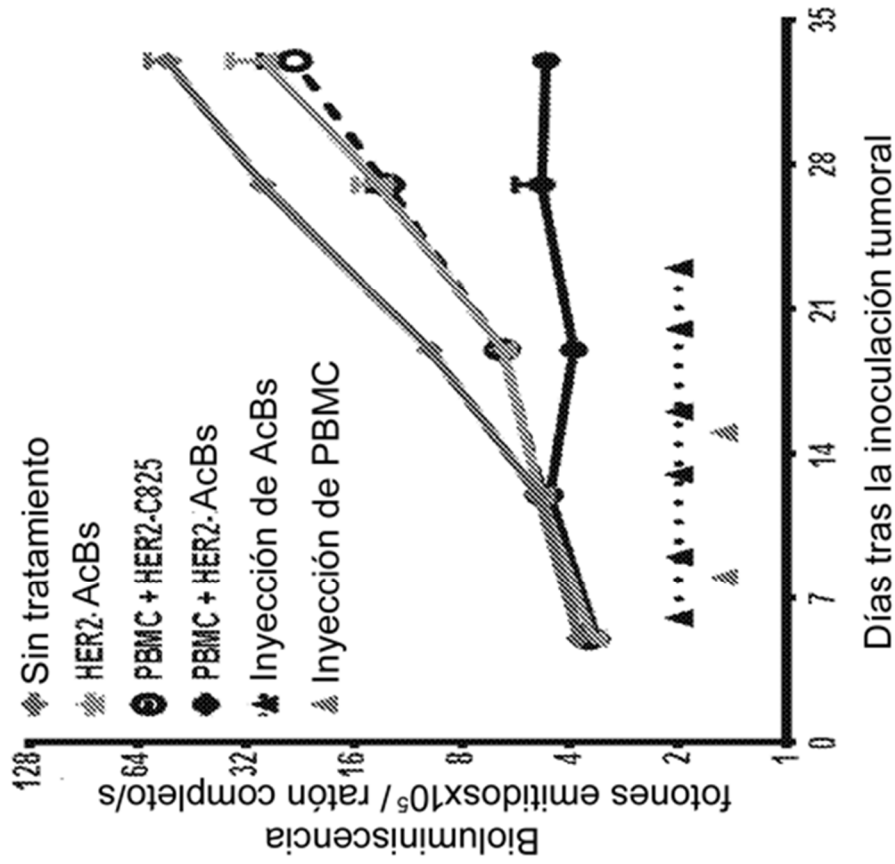


Fig. 25B

Células tumorales HCC1954 s.c. + PBMC s.c. Células tumorales HCC1954 s.c. + PBMC i.v.

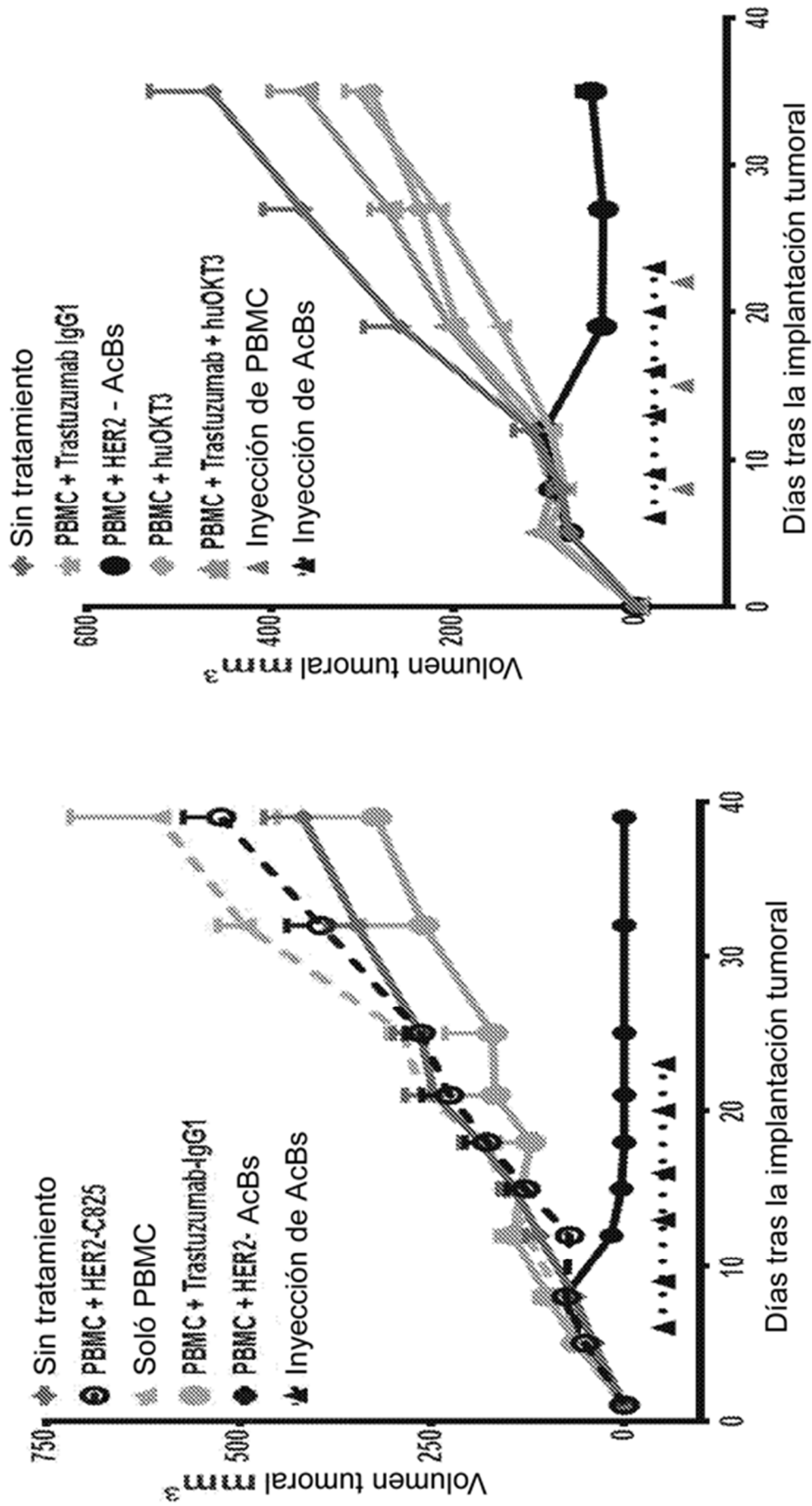


Fig. 25C

Fig. 25D