

(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 (Highlights of Prescribing Information). South San Francisco, CA: Genentech, Inc.; 2014). El ertumaxomab es un anticuerpo HER2-CD3 triespecífico 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 avidiz (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;
- (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 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.

40 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.

45 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.

50 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*.

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.

20 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.

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.

35 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 inicien 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

5 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.

10 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.

15 20 25 CD3 es un coreceptor 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.

30 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.

35 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.

40 45 50 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 químicos porque los primeros contienen considerablemente menos componentes no humanos.

El término "epítopo" 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 epítopo de un antígeno proteico puede ser lineal o conformacional, o puede estar formado por secuencias de aminoácidos contiguas o no contiguas del antígeno.

55 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 antigenica 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), 15C3 (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 epítopo que un anticuerpo específico de CD3 conocido en la técnica. El scFv en una molécula de unión biespecífica puede unirse al mismo epítopo que el anticuerpo específico de CD3, huOKT3. La unión al mismo epítopo 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_H 44 (según el sistema de numeración de Kabat) por una cisteína y el reemplazo del residuo de aminoácido en V_L 100 (según el sistema de

numeración de Kabat) por una cisteína para introducir un enlace disulfuro entre V_H 44 y V_L 100 (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 delecciones 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 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 epítopo que un anticuerpo específico de HER2 conocido en la técnica. La inmunoglobulina en una molécula de unión biespecífica puede unirse al mismo epítopo que trastuzumab. La unión al mismo epítopo 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 delecciones 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.º 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)).

- 15 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 20 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 25 región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones químéricos. Los ratones químéricos 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, 30 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 35 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.
- 40 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 epítopo 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 epítopo. Véase, por ejemplo, Jespers *et al.*, Bio/technology 12:899-903 (1988). Los anticuerpos humanos 45 también pueden generarse mediante células B activadas *in vitro*. Véanse las patentes estadounidenses n.º 5.567.610 y 5.229.275.

50 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. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029 (1989); patente estadounidense n.º 6.180.370; y Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sd. 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 aislan de un hibridoma. Las secuencias de ADN de los dominios variables, incluidas las CDR, se determinan mediante secuenciación. Los ADN, 55 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 isótipo deseado (por ejemplo, gamma-1 para CH y K para C_L), 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 disruptores dirigidos 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 5 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 10 *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 cloran en el marco o bien en un gen de la proteína de la cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también 15 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* 20 3:5564-571 (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 25 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 30 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 35 a las del anticuerpo de partida.

40 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 cloran 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 45 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 50 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, NAMAIWA, NEURO 2A), o similar, o heteromielomas, productos de fusión 55 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 60 marco constantes o variables de cadena pesada o ligera, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogico, 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, ARNh, 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 65

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, Sondermann *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.

- 5 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.

- 10 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.

- 15 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 HAHA, 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)).

- 20 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 avidez 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.

- 25 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 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 UMSSCC47. 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.

30 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.

- 5 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 rabdomiosarcoma 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.
- 10
- 15
- 20
- 25

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.

- 30 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.
- 35

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.

- 40 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.

- 45 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.
- 50 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.

- 55 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 un 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	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 14)
Ligador TS(G ₄ S) ₃	TSGGGGS GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)
Ligador G ₄ S	GGGGS (SEQ ID NO: 36)
Ligador (G ₄ S) ₂	GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37)
Ligador (G ₄ S) ₃	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 38)
Ligador (G ₄ S) ₄	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 39)
Ligador (G ₄ S) ₅	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 40)
Ligador (G ₄ S) ₆	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41)

5 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”.

DESCRIPCIÓN	SECUENCIA (SEQ ID NO:)
Dominio V _H de trastuzumab con región constante de IgG1 humana	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP LQS SGLYSLSSVTVPS <i>SSLGTQTYICVNHKPSNTKVDKRVEPK</i> SCDKTHT CPPCP <i>APELLGGPSVFLFPPKPKD</i> TLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTPREEQY <i>QYN</i> STYRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPS <i>DI</i> AVEWESNGQ <i>PENNY</i> KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23)
Dominio V _H de trastuzumab con región constante de IgG1 humana; N297A; K322A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP LQS SGLYSLSSVTVPS <i>SSLGTQTYICVNHKPSNTKVDKRVEPK</i> SCDKTHT CPPCP <i>APELLGGPSVFLFPPKPKD</i> TLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTPREEQY <i>A</i> STYRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCA <i>AVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTC</i> LVKGFYPS <i>DI</i> AVEWESNGQ <i>PENNY</i> KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27)
Dominio V _H de trastuzumab con región constante de IgG1 humana; N297A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP LQS SGLYSLSSVTVPS <i>SSLGTQTYICVNHKPSNTKVDKRVEPK</i> SCDKTHT CPPCP <i>APELLGGPSVFLFPPKPKD</i> TLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTPREEQY <i>A</i> STYRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPS <i>DI</i> AVEWESNGQ <i>PENNY</i> KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 62)

Dominio V_H de trastuzumab con región constante de IgG1 humana; K322A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAA <i>LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP</i> AVLQS <i>SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPNSNTKVDKRVEPKCDKTHT</i> <i>CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD</i> TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV <i>KFNWYVDGVEVHN</i> A <i>KTPREEQYNSTYRVVSVLVLH</i> QDWLN <i>GKEY</i> <i>KCA</i> VSNKALPAPIEK <i>TISKAKGQP</i> REPQVYTLPPSR <i>DELTKNQVSLTC</i> <i>LVKGFYPSDI</i> AVEWESEN <i>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS</i> <i>RWOOGNFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK</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 KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTS (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	QVQLVQSGGGVVQPGRSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGVYFCARYYDDHY <u>CLDYWGQGTP</u> VTVSS (SEQ ID NO: 15)
V_H de huOKT3; C105S	QVQLVQSGGGVVQPGRSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGVYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTP</u> VTVSS (SEQ ID NO: 17)
V_H de huOKT3; C105S + V_H -G44C	QVQLVQSGGGVVQPGRSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGVYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTP</u> VTVSS (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 WIYDTSKLASGVPSRFSGSQGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWS SNPFTFGQGTKLQITR (SEQ ID NO: 16)
V_L de huOKT3; V_L -Q100C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKR WIYDTSKLASGVPSRFSGSQGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWS SNPFTFG <u>CGT</u> KLQITR (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	QVQLVQSGGGVVQPGRSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK

15

C105S; ligador intra-scFv de 15 aminoácidos	GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> ggggsgggsggggsDI QMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFTFGQ GTKLQITR (SEQ ID NO: 19)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 5 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> gggggsDI QMTQSPSS LSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFTFGQ GTKLQITR (SEQ ID NO: 48)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 10 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> ggggsggggsDI QMT QSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFTFGQ GTKL QITR (SEQ ID NO: 49)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 20 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> ggggsgggsgggsgg ggsDI QMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRW IYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFT FGQ GTKLQITR (SEQ ID NO: 50)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 25 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> ggggsgggsgggsgg gggssDI QMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKA PKRWIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFT FGQ GTKLQITR (SEQ ID NO: 51)
C105S de scFv de huOKT3; ligador intra-scFv de 30 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> ggggsgggsgggsggg sggsDI QMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFTFGQ GTKLQITR (SEQ ID NO: 52)
C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 5 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK <u>GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP</u> EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> gggggsDI QMTQSPSS LSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFTFG <u>CGTKLQITR</u> (SEQ ID NO: 53)
C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 10 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK <u>GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP</u> EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> ggggsggggsDI QMT QSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFTFG <u>CGTKL</u> QITR (SEQ ID NO: 54)
C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 15 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK <u>GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP</u> EDTGKYFCARYYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> ggggsgggsggggsDI QMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDT SKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIA TYYCQQWSSNPFTFG <u>CGTKL</u> QITR (SEQ ID NO: 55)

C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 20 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK <u>CLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP</u> EDTGVYFCARYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> <u>ggggsgggsggggsggg</u> <u>ggsdiqmtqspsslasavgdrvitcsassvsymnwyyqotp</u> <u>gkapkrwiydtsklasgvpsrfsgsgetdytftisslqpediatyy</u> <u>cqqwssnpftfgcgtklqitr</u> (SEQ ID NO: 56)
C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 25 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK <u>CLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP</u> EDTGVYFCARYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> <u>ggggsgggsggggsggg</u> <u>gsggggsdiqmtqspsslasavgdrvitcsassvsymnwyyqotp</u> <u>gkapkrwiydtsklasgvpsrfsgsgetdytftisslqpediatyy</u> <u>cqqwssnpftfgcgtklqitr</u> (SEQ ID NO: 57)
C105S de scFv de huOKT3; V _L -Q100C; V _H -G44C; ligador intra-scFv de 30 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK <u>CLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP</u> EDTGVYFCARYDDHY <u>SLDYWGQGTPVTVSS</u> <u>ggggsgggsggggsggg</u> <u>gsggggsggggsdiqmtqspsslasavgdrvitcsassvsymnwyyqotp</u> <u>gkapkrwiydtsklasgvpsrfsgsgetdytftisslqpediatyy</u> <u>cqqwssnpftfgcgtklqitr</u> (SEQ ID NO: 58)
huOKT3; ligador intra-scFv de 15 aminoácidos	QVQLVQSGGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRP EDTGVYFCARYDDHY <u>CLDYWGQGTPVTVSS</u> <u>ggggsgggsggggsggg</u> <u>ggsdiqmtqspsslasavgdrvitcsassvsymnwyyqotp</u> <u>gkapkrwiydtsklasgvpsrfsgsgetdytftisslqpediatyy</u> <u>cqqwssnpftfgcgtklqitr</u> (SEQ ID NO: 59)

5 Tabla 7. Secuencia de polipéptido 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; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 15 aminoácidos	DIQMTQSPSSLASAVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>Ctggggsgggsggggsggg</u> <u>QVQLVQS</u> <u>GGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKLEWIGY</u> <u>INPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF</u> <u>CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSS</u> <u>ggggsgggsggggsggg</u> <u>ggsdiqmtqsp</u> <u>SSLSASVGDRVITCSASSVSYMNWYQQTPGKAPKRWYDTS</u> <u>KLASGVPSRFSGSGETDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT</u> <u>FGQGTKLQITR</u> (SEQ ID NO: 29)

Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 5 aminoácidos	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEtsggggsggggggggggsvQQLVQS GGGVVQPGRSRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY INPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL RPEDTGVYF CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSgggggsDIQMTQSPSSLSASVG DRVITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVP SRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTK LQITR (SEQ ID NO: 30)
Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 10 aminoácidos	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEtsggggsggggggggggsvQQLVQS GGGVVQPGRSRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY INPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL RPEDTGVYF CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSggggsgggggsDIQMTQSPSSLS ASVGDRVITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA SGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG QGTKLQITR (SEQ ID NO: 31)
Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 20 aminoácidos	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEtsggggsggggggggggsvQQLVQS GGGVVQPGRSRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY INPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL RPEDTGVYF CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSggggsggggsgggggggggsDIQMT QSPSSLSASVGDRVITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIY DTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSS NPFTFGQGTKLQITR (SEQ ID NO: 32)
Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 25 aminoácidos	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEtsggggsggggggggggsvQQLVQS GGGVVQPGRSRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY INPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL RPEDTGVYF CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSggggsggggsgggggggggggsDI QMTQSPSSLSASVGDRVITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPK RWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQ QWSSNPFTFGQGTKLQITR (SEQ ID NO: 33)
Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 30 aminoácidos	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEtsggggsggggggggggsvQQLVQS GGGVVQPGRSRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY INPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL RPEDTGVYF CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSggggsggggsgggggggggggggg ggsDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASSSVSYMNVYQQTPGK APKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIAT YCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR (SEQ ID NO: 34)

Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv de huOKT3; ligador peptídico intra-scFv de 5 aminoácidos; V _L -Q100C; V _H -G44C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>Ctsggggsgggggggggg</u> QVQLVQS <u>GGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYI</u> <u>NPSRGYTNQNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF</u> <u>CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSgggggggg</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGPVSRFSRGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 42)
Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv de huOKT3; ligador peptídico intra-scFv de 10 aminoácidos; V _L -Q100C; V _H -G44C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>Ctsggggsgggggggggg</u> QVQLVQS <u>GGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYI</u> <u>NPSRGYTNQNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF</u> <u>CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSgggggggg</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGPVSRFSRGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 43)
Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv de huOKT3; ligador peptídico intra-scFv de 15 aminoácidos; V _L -Q100C; V _H -G44C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>Ctsggggsgggggggggg</u> QVQLVQS <u>GGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYI</u> <u>NPSRGYTNQNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF</u> <u>CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSgggggggggggggggg</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGPVSRFSRGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 44)
Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv de huOKT3; ligador peptídico intra-scFv de 20 aminoácidos; V _L -Q100C; V _H -G44C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>Ctsggggsgggggggggg</u> QVQLVQS <u>GGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYI</u> <u>NPSRGYTNQNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF</u> <u>CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSgggggggggggggggg</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGPVSRFSRGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 45)
Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv de huOKT3; ligador peptídico intra-scFv de 25 aminoácidos; V _L -Q100C; V _H -G44C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRSGRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>Ctsggggsgggggggggg</u> QVQLVQS <u>GGGVVQPGRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYI</u> <u>NPSRGYTNQNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF</u> <u>CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSgggggggggggggggggg</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGPVSRFSRGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR (SEQ ID NO: 46)

Cadena ligera de trastuzumab; C105S; ligador de 17 aminoácidos que conjuga la cadena ligera con el scFv; ligador peptídico intra-scFv de 30 aminoácidos; V _L -Q100C; V _H -G44C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSFIGPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEtsggggsggggggggggSQQLVQS <u>GGGVVQPGRSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYI</u> <u>NPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF</u> <u>CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVS</u> Sggggsggggggggggggggg ggsDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNVYQQTPGK APKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATY 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 KLLIYSASFYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSFIGPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEtsggggsggggggggggSQQLVQS <u>GGGVVQPGRSRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGY</u> <u>INPSRGYTNYNQFKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF</u> <u>CARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVS</u> Sggggsggggggggg ggsDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNVYQQTPGKAPKRWIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR (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.

10

5.2.1 ISÓTOPOS Y MARCADORES DETECTABLES

- 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 esterase.

5 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}Cl , ^{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)).

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

20 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 fociocianina, un marcador de aloficiocianina, un marcador de proteína fluorescente verde (GFP), un marcador de oftaldehído y un marcador de fluorescamina.

25 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.

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

35 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.

40 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 etilendiaminetetraacético (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

5 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 10 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), polí(óxidos de alcano) (por ejemplo, polí(óxido de etileno) y polí(óxido de propileno)) y polivinilpirrolidona. El polímero hidrófilo que modifica una molécula de unión biespecífica proporcionada en el presente 15 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 Dalton. 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 20 ácido graso o éster de ácido graso pueden prepararse empleando métodos ade cuados. 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-hidroxisuccinimidilo (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 fosforamidato 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-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para formar un 40 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.)

50 55 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 60

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 Analogs: 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. Microbiol.*

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

- 5 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
10 de unión biespecíficas usando plantas transgénicas, según métodos conocidos. Véase también, por ejemplo, Fischer *et al.*, Biotechnol. Apl. 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.

15 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.

20 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.

25 35 Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse, por ejemplo, mediante ELISA, ELISPOT, citometría de flujo, inmunocitología, análisis BiaCore™, ensayo de exclusión cinética Savidyne 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

40 45 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.

50 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.

55 Las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNh, 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, otelixizumab, 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 nutación 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 5 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 10 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 15 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 20 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).

25 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 30 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.

35 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 40 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 45 cualquier método bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la sección 0.

50 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, 2^a 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 55 glicosilado, o para destruir la capacidad del anticuerpo para unirse al receptor de C1q, Fc, o para activar el sistema del complemento.

60 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

5 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.

10 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 15 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 20 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 25 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 delecciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar 30 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 35 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.

40 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 45 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 50 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*.

55 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 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.

10 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 25 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.

30 35 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.

40 45 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 biespecífica y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y poliadenilación del transcripto. 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 promotor de actina humana). Los ejemplos no limitativos de vectores de expresión de mamíferos incluyen vectores tales como pRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN o pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/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).

50 55 El vector puede ser un vector viral, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores basados en parvovirus, por ejemplo, vectores basados en virus adenoasociado (VAA), vectores químéricos 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, 2^a 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 biespecífica 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 transcrita 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 transcrita 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. aerugenosa*, *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 transflectado 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, intravítreo, intracárdica, intracolónica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarectal, intrarrenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, intratecal, intraventricular en el cerebro, intraparenquimatosa en el cerebro o transdérmitica. 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, fenoxyetanol, 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 períodos de tiempo prolongados, por ejemplo, durante períodos 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 pamoico, ácido algínico, ácido poliglutámico, 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 antigenico, no tóxico y de degradación lenta, tal como un polímero de polí(ácido láctico)/polí(ácido glicólico), por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 3.773.919.

5 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).

10 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 funcionarse 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.

15 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, 18^a 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.

20 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 25 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, betaina, 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, 30 maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, cellobiosa, 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.

35 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, 40 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 45 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).

50 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).

55 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 ", 19^a ed., Williams & Williams, (1995), y en el "Physician's Desk Reference ", 52^a 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, 5^a 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 crioconserva.

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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 o ácidos grasos naturales o sintéticos o semisintéticos; mono, di o tri-glicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. La administración parental 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.

25 5.5.2 FORMULACIONES PULMONARES

Una composición que comprende una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento puede 30 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 35 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 40 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 45 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 50 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 55 una molécula de unión biespecífica descrita en el presente documento suministrada por un pulverizador tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 um, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 um a aproximadamente 5 um, y lo más preferiblemente de aproximadamente 2 um a aproximadamente 3 um.

Las formulaciones de una composición que comprenden al menos una molécula de unión biespecífica descrita en el 60 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 piezoelectrónico. 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 um, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 um a aproximadamente 5 um, y lo más preferiblemente de aproximadamente 2 um a aproximadamente 3 um.

La composición puede administrarse a través de un inhalador dosificador (MDI, *metered dose inhaler*), en el que un propelso, 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 um, preferiblemente de aproximadamente 1 um a aproximadamente 5 um, y lo más preferiblemente de aproximadamente 2 um a aproximadamente 3 um. 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 propelso 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 propelso con la ayuda de un tensioactivo. El propelso puede ser cualquier material convencional empleado con este propósito, tal como clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA1-134a (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227), o similar. Preferiblemente, el propelso es un hidrofluorocarbono. El tensioactivo puede elegirse para estabilizar la al menos una molécula de unión biespecífica como una suspensión en el propelso, 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.

50 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 Trasylol, 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 glicéricido. 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 (proteinoides) 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 polihidroxiálicos tales como polí(ácido láctico), polí(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

5 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.

10 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 15 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.

20 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®.

25 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 30 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

35 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.

50 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

5 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

10 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

15 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 epítopo en HER2 reconocido por trastuzumab. Véase, también, por ejemplo,

20 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 ser humano. El sujeto puede ser un cánido.

30 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, rhabdomiosarcoma, neuroblastoma o cualquier otro tejido neoplásico que exprese el receptor HER2.

35 35 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.

40 40 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.

45 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.

50 50 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 (^{113}In) y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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 desmóplásico 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, rhabdomiosarcoma, neuroblastoma o cualquier otro tejido neoplásico que exprese el receptor HER2.

25 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.

30 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.

35 Un 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

40 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.

45 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.

50 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.

55 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 0,1 mg/kg y 0,7 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.

- 10 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.

- 35 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.

- 50 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.
- 10 El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser una citocina tal como, por ejemplo, IL15, complejo IL15R/IL15, IL2 o GMCSF.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 El agente farmacéuticamente activo adicional puede ser un agente que aumente la muerte celular, apoptosis, autofagia o necrosis de las células tumorales.
- 30 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 ciclofosfamida y docetaxel. Los dos agentes farmacéuticamente activos adicionales pueden ser ciclofosfamida y paclitaxel. 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.
- 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 como un único agente tras una terapia basada en antraciclina multimodal.
- 40 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.
- 45 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, 5^a 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:
- 50 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-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 10^6 células T activadas. A continuación, la mezcla se lava y se crioconserva.

6. Ejemplos

10 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 avidez, (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(+) 20 redirigiéndolas 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

25 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 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.

35 Se usó ADN de plásmido linealizado para transfectar células CHO-S (Invitrogen) para la producción estable de AcBs. Se transfecaron 2×10^6 células con 5 µg 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 µg/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 Jurkat CD3(+), respectivamente, y se seleccionaron los clones estables con la mayor expresión.

40 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 aliquotas 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. Despues 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 µg de proteína en una columna TSK-GEL G3000SWXL de 7,8 mm x 30 cm, 5 µm (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

55 Se incubaron células con 5 µg/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 °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 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$. Se incubaron las 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: (cpm experimental - cpm de fondo)/(cpm total - cpm de fondo) x 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.
- 10
- 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 °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.

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 trajeron células con anticuerpo monoclonal de control de isotipo, lapatinib 10 nM (como control positivo), HER2-AcBs 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, trastuzumab 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, lapatinib 10 nM, erlotinib 10 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 = (Muestra-fondo)/(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.

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*

- 45 Para estudios *in vivo*, ratones BALB-Rag2-KO-IL-2R- γ c-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 trajeron los ratones con PBS, 10 μg de trastuzumab o 10 μg 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.

50 Para el modelo metastásico, se administraron células MCF7 que expresaban luciferasa a ratones DKO por vía intravenosa. Cuatro días tras la administración, se trajeron los ratones con 100 ug de HER2-AcBs, 20 ug de HER2-AcBs, o 20 ug 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
10 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 transfeció 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.

20 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.

25 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 $4,53 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, una k_{off} a $8,68 \times 10^{-2} s^{-1}$ y una K_D global a 192 nM; comparable al huOKT3 IgG1-aGlico parental a la k_{off} ($1,09 \times 10^{-1} s^{-1}$), pero menos a la k_{on} ($1,68 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$) 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 une 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.

30 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, 40 rabdomiosarcoma 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 55 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

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.

Antes del tratamiento con HER2-AcBs, se preincubaron células positivas para HER2 con trastuzumab para determinar si HER2-AcBs comparte la misma especificidad antigenica 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.

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.

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.

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.

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.

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 medidas 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).

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.

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

5 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.

10 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).

15 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).

20 6.1.4 CONCLUSIONES

25 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 hIgG1 trastuzumab.

30 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

35 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).

50 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.

55 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 inhibidoras 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).

5 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 avidez 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 10 con su función Fc elecciónada 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.

15 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.

20 6.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

25 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 Chandrarapthy del Centro Oncológico Memorial Sloan Kettering; 93-VU-147T y HeLa, 25 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 tandem 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.

30 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 (G_4S)₃ seguido de scFv de huOKT3 (SEQ 35 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 40 Cancer Ther 13:1803-12).

45 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 50 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.

55 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 molvió 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 estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{inyección}$, 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 captaron 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).

45 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 transfecaron 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.

55 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 avidez 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 avideces 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 (figura 19B). La preincubación con o bien trastuzumab o bien OKT3 impidió la citotoxicidad mediada por células T de HER2-AcBs.
25

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 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.

- 45 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, las células T positivas para PD-1 generaron respuestas citotóxicas similares en presencia de HER2-AcBs, independientemente de la presencia de pembrolizumab. Cuando se transfecaron 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).
50
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 hematogena, 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 tandem (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 redirecccionamiento 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> <i>Homo sapiens</i>	
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 gccccttac tgccgcgcgc gccccggcccc	180
	cacccctcgc agcaccccgc gccccgcgc ctcccagccg ggtccagccg gagccatggg	240
	gccggagccg cagtgagcac catggagctg gcggccttgt gccgctgggg gctcctcctc	300
	gccctttgc ccccccggagc cgcgagcacc caagtgtgca ccggcacacaga catgaagctg	360
	cggctccctg ccagtcccg aaccacactg gacatgctcc gccacctcta ccagggctgc	420
	caggtggtgc agggaaacct ggaactcacc tacctgcccc ccaatgccag cctgtccttc	480
	ctgcaggata tccaggaggt gcagggctac gtgctcatcg ctcacaacca agtgaggcag	540
	gtcccactgc agaggctgca gattgtgcga ggcacccagc tctttgagga caactatgcc	600
	ctggccgtgc tagacaatgg agacccgctg aacaatacca cccctgtcac aggggcctcc	660
	ccaggaggcc tgccggagct gcagcttcga agcctcacag agatctgaa aggaggggtc	720
	ttgatccagc ggaaccccca gctctgctac caggacacga ttttgtggaa ggacatcttc	780
	cacaagaaca accagctggc tctcacactg atagacacca accgctctcg ggctgtccac	840
	ccctgttctc cgatgtgtaa gggctccgc tgctggggag agagttctga ggattgtcag	900
	agcctgacgc gcactgtctg tgccggtgcc tgtgcccgt gcaaggggcc actgcccact	960
20	gactgctgcc atgagcagtg tgctgcccc tgcacgggcc ccaagcactc tgactgcctg	1020

ES 2 832 704 T3

gcctgcctcc acttcaacca cagtggcatc tgtgagctgc actgcccagc cctggtcacc	1080
tacaacacag acacgtttga gtccatgccc aatcccgagg gccggatac attcggcgcc	1140
agctgtgtga ctgcctgtcc ctacaactac ctttctacgg acgtgggatc ctgcaccctc	1200
gtctgcccc tgcacaacca agaggtgaca gcagaggatg gaacacagcg gtgtgagaag	1260
tgtagcaaggc cctgtgccc agtgtgctat ggctctggca tggagactt gcgagaggtg	1320
agggcagttt ccagtgc当地 tatccaggag ttgtctggct gcaagaagat ctttggagc	1380
ctggcatttc tgccggagag ctttgc当地 gacccagct ccaacactgc cccgc当地	1440
ccagagcagc tccaagtgt tgagactctg gaagagatca caggttacct atacatctca	1500
gcatggccgg acagcctgcc tgacctc当地 gtcttccaga acctgcaagt aatccgggaa	1560
cgaattctgc acaatggcgc ctactcgctg accctgcaag ggctggcat cagctggctg	1620
gggctgc当地 cactgaggaa actgggactt ggactggccc tcatccacca taacacccac	1680
cctctgttgc tgacacacggt gccc当地 cagctttc ggaacccgca ccaagctctg	1740
ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag tggggctggc agggc当地 ctgccc当地	1800
ctgtgc当地 gagggcactg ctggggtcca gggccaccc agtgtgtcaa ctgc当地	1860
ttccttc当地 gccaggagtg cgtggaggaa tgccgactac tgca当地 agggag	1920
tatgtgaatg ccaggcactg ttgc当地 caccctgactt gtc当地 ccaatggctca	1980
gtgacctgtt ttggaccgga ggctgaccag tggggctgtt gtccc当地 taaggaccct	2040
cccttctgc当地 tggccgctg cccagcggt gtgaaacctg acctcttcta catgccc当地	2100
tgaaagttc cagatgagga gggc当地 cagc当地 ccatcaactg cacccactcc	2160
tgtgtggacc tggatgacaa gggctgccc gccgagcaga gagccagccc tctgacgtcc	2220
atcatctctg cgggtggttgg cattctgctg gtgtggctt tgggggtggt ctttggatc	2280
ctcatcaaggc gacggc当地 gaagatccgg aagtacacga tgccgagact gctgc当地	2340
acggagctgg tggagccgct gacacccatgc ggagc当地 ccaaccaggc gcagatgc当地	2400
atccctgaaag agacggagct gaggaaggtg aaggtgctt gatctggc当地 ttttggacaa	2460
gtctacaagg gcatctggat ccctgatggg gagaatgtga aaattccagg ggc当地	2520
gtgttgaggg aaaacacatc ccccaaagcc aacaaagaaa tcttagacga agcatacgt	2580
atggctggtg tgggctccc atatgtctcc cgc当地 ctgg gcatctgc当地 gacatccac	2640
gtgc当地 ctgg tgacacagct tatgc当地 ttggctt tagaccatgt ccgggaaaac	2700
cgc当地 gagc当地 tgggctccc ggacctgctg aactgggtta tgca当地 ttggatc	2760
agctacctgg aggatgtgc当地 gctcgatcac agggacttgg cc当地 ctggaa cgtgctggc当地	2820
aagagtccca accatgtcaa aattacagac ttggggctgg ctggctgct ggacattgac	2880
gagacagagt accatgcaga tggggcaag gtgccc当地 agtggatggc gctggagtc当地	2940

ES 2 832 704 T3

attctccgcc	ggcggttcac	ccaccagagt	gatgtgtgga	gttatggtgt	gactgtgtgg	3000
gagctgatga	cttttggggc	caaacc tac	gatggatcc	cagccccgg	gatccctgac	3060
ctgctggaaa	agggggagcg	gctgcccag	ccccccatct	gcaccattga	tgtctacatg	3120
atcatggta	aatgttgat	gattgactct	aatgtcg gc	caagattccg	ggagttggtg	3180
tctgaattct	cccgcatggc	cagggacccc	cagcgctt t	tggtcatcca	aatgaggac	3240
ttggggccag	ccagtc ctt	ggacagcacc	ttctaccgct	cactgctgga	ggacgatgac	3300
atgggggacc	tgg tggatgc	tgaggagtat	ctggtacccc	agcagg gctt	cttctgtcca	3360
gaccctgccc	cgggc gctgg	gggc atggc	caccac aggc	accgc agctc	atctaccagg	3420
agtggcggt	gggac ctgac	actagg gctg	gagccctctg	aagaggaggc	ccccagg tct	3480
ccactggcac	cctcc gaagg	ggctggctcc	gatgtat tt	atgg t gac	ct ggaa atgggg	3540
gcagccaagg	ggctg caaag	cctccccaca	catgacccc	gccctctaca	gcggta cagt	3600
gaggacccca	cagt acccct	gccc tctgag	actgatggct	acg tggccc	cctgac ctgc	3660
agccccccagc	ctgaat atgt	gaacc agcca	gatgtt cggc	cccagcccc	ttc gccc cga	3720
gagggccctc	tgc ctgctgc	ccgac ctgct	ggtg ccactc	tggaa aggcc	caagact ctc	3780
tccccaggga	agaat ggggt	cgtcaa agac	gttttgcct	ttgggggtgc	cgtggaga ac	3840
cccgag tact	tgac accc ca	gggagg agct	gccc tcagc	ccc accc tcc	tcctgc ct tc	3900
agcccagc ct	tcgaca acct	ctt actt ctgg	gaccagg acc	cacc agac g	ggggc tcca	3960
ccca gca cct	tcaa agg gac	acct acggc a	gaga accc ag	agtac ctggg	tctggac g	4020
ccagtgtgaa	ccaga aggcc	aagtccg cag	aagccctgat	gtgtc ctca g	ggagcagg g	4080
aggcctgact	tctgctgca	tcaagagg t	ggagg gccc	ccgacc actt	ccagg gga ac	4140
ctgccc atgca	aggAACCTGT	cctaagga ac	cttc ctcc	gctt gagttc	ccagatgg ct	4200
ggaagg ggtc	cagc ctg tt	ggaagg gaa	cagc actggg	gagtctt gt	ggattctg ag	4260
gccctgccc	atgagact ct	agggtcc agt	ggatg ccaca	gccca gctt g	gccctt cc	4320
tccagatc ct	gggtactgaa	agcctt aggg	aagctggc	gagagg gaa	gcggccct aa	4380
gggagtgt ct	aagaacaaaa	gcgacccatt	cagagactgt	ccctgaaacc	tagtactg cc	4440
ccccatgagg	aaggaac agc	aatgg t gta	gtatccaggc	ttt gta caga	gtgcttt ct	4500
gttttagttt	tactttttt	gtttt gttt	ttaaagatg	aaataa agac	ccaggggg ag	4560
aatgggtgtt	gtatgggag	gcaagtgtgg	gggtc ct tc	tccac accca	ctttgtccat	4620
ttgcaa atat	at tttggaaa	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
545 550 555 560

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
625 630 635 640

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

ES 2 832 704 T3

<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	ccgctggggg	ctccttctcg	ccctcctgcc	ctccggagcc	60
gcgggcaccc	aagtgtcac	cggcacagac	atgaagctcc	ggctcccgcc	cagtcccgag	120
acccacactgg	atatgctccg	ccacactgtac	caggcgtgtc	aagtggtaca	gggaaacctg	180
gagctcaactt	acctgcctgc	caatgccagc	ctgtcattcc	tgcaggatat	ccaggagggtg	240
cagggctatg	tgctcattgc	tcacagccaa	gtgaggcaga	tcccactgca	gaggctacga	300
attgtgcgag	gcacccagct	cttgaggac	aactacgccc	tggccgtgct	ggacaatgga	360
gaccgcgtgg	agggtggcat	ccctgcacca	ggggcggccc	aaggagggtct	gcgggagctg	420
cagcttcgaa	gcctcacaga	gatcctgaag	ggaggggtct	tgattcagcg	gagccgcag	480
ctctgccacc	aggacacat	tttatggaag	gacgtcttcc	ataagaacaa	ccagctggcc	540
ctcacgctga	tagacaccaa	ccgctttcg	gcctgcccgc	cctgttctcc	agcttgtaaa	600
gacgcccact	gctggggggc	cagctccggg	gactgtcaga	gcttgacgcg	gactgtctgt	660
gccgggggct	gtgcccgtg	caagggccca	caacccaccc	actgctgcca	cgagcagtgt	720
gctgctggct	gcacggggccc	caagcactct	gactgcctgg	cctgcattca	cttcaaccac	780
agtggcatct	gtgagctgca	ctgcccagcc	ctggtcaccc	acaacacgga	cacccatcgaa	840
tccatgcccc	accctgaggg	ccgatataacc	ttcggggcca	gctgtgtgac	ctcctgtccc	900
tacaactacc	tgtctacgga	tgtggatcc	tgcaccctgg	tctgtcccct	gaacaaccaa	960
gaggtgacgg	ctgaggatgg	gacacagcgg	tgcgagaaat	gcagcaagcc	ctgtgcccga	1020
gtgtgctacg	gtctgggcat	ggaggcacctg	cgagaggtga	gagcggtcac	cagtgcgaac	1080
10 atccaggagt	ttgcccgtg	caagaagatc	tttggaaagcc	tggcattttt	gccagagagc	1140

ES 2 832 704 T3

tttcatgggg acccagccctc caacactgcc cccctacagc ctgagcagct cagagtgttt	1200
gaggctctgg aggagatcac aggttacctg tacatctcg cgtggccaga cagcctgcct	1260
aacctcagtg tcttccagaa cctgcgagta atccggggac gagttctgca tgatgggcc	1320
tactcgctga ccctgcaagg gctggcatac agctggctgg ggctgcgcac gctgcggaa	1380
ctgggcagtg ggctggccct catccaccgc aacgcccggc tttgcttcgt gcacacggtg	1440
ccctgggacc agctcttccg gaaccccccac caggccctgc tccatagtgc caaccggcca	1500
gaggaggagt gcgtggggcga gggctggcc tgcataccct gtgcggatgg gcactgcgtg	1560
ggtcaggggc ccacccagtg cgtcaactgc agccaattcc tccggggccca ggagtgcgtg	1620
gaggaatgcc gagtactgca ggggctgccc cgagagttatg tgaaggacag gtactgtcta	1680
ccgtgccact cagagtgtca gccccagaat ggctcagtga cctgtttagg atcggaggct	1740
gaccagtgtg tggcctgcgc ccactacaag gaccctccct tctgtgtggc tcgctgcccc	1800
agtggtgtga aacctgaccc gtccattcatg cccatctggc agttcgcaga tgaggaggc	1860
acttgcgcagc cgtgccccat caactgcacc cactcctgtg cggacctggc cgagaagggc	1920
tgtcccgccg agcagagagc cagccctgtg acatccatca ttgcgcgtgt ggtgggcatt	1980
ctgctggctg tggcgtgtgg gctggccctc ggcatcctga tcaagcgaag gccggcagaag	2040
atccggaagt acactatgcg gaggctgtg caggaaaccg agctggtgaa gcccgtgacg	2100
cctagtggag cgatgccccaa ccaggctcag atgcggatcc taaaagagac agagctgagg	2160
aaggtaagg tgcttggatc cggagctttt ggcacagtct acaagggcat ctggatccct	2220
gatggggaaa atgtaaaaat cccagtggcc atcaaagtgt tgaggaaaaa cacatctccc	2280
aaagccaaca aagaaatctt ggacgaagca tatgtatgg ctggagtgaa ctccccgtat	2340
gtgtcccgcc tccctggcat ctgcctgaca tccacggcgc agctggtgac acagcttatg	2400
ccctacggct gcctttaga ccatgtccga gaacaccgtg ggccgcgtgg ctcccaggac	2460
ttgctgaact ggtgtgtgca gattgcaag gggatgagct acttggagga tgtccggctg	2520
gtgcacaggg acctggctgc cggaatgtg ctggtaaga gtcccaacca tgtcaagatt	2580
acagatttcg ggctggctcg gttgctggac atcgacgaga cagagtacca tgcggatggg	2640
ggcaagggtgc ccatcaagtg gatggcgctg gagtcattc ctccgcggcg gttcaccac	2700
cagagtgtg tgtggagcta tgggtgtact gtgtggaaac tgatgacttt tggggccaaa	2760
ccttatgtg ggatcccagc cggggagatc cctgacactgc tggagaagg ggaacggctg	2820
ccccagcccc ccatctgcac cattgtatgc tacatgtca tggtaagtg ctggatgata	2880
gactctgaat gccgaccggc gttccggag ttggcggccg aatttcacg tatggccagg	2940
gaccccccagc gctttgtgtt cattcagaat gaagacttgg gccccggccag ccccttggac	3000
agcaccttct accgttcaact actgaaagat gatgacatgg gggacctggt ggatgcgtag	3060

ES 2 832 704 T3

gagtacctgg	taccccagca	gggtttcttc	tgcccagaac	ctacccagg	ggctggggc	3120
actgcccacc	gacggcacccg	cagctcatcc	accaggaatg	gcgggtggta	gctgactcta	3180
ggactggagc	cctccgagga	ggagcccccc	aagtctccac	tggcaccctc	agagggcgct	3240
ggctctgacg	tgtttagatgg	tgacttggga	atggggcag	ccaaggggct	gcagagcctt	3300
ccctcacagg	accccagccc	tctccagcgg	tacagtgagg	accctacggt	acccttgc	3360
cctgagactg	atggtaaggt	tgccccctg	acctgcagcc	cccagcctga	atatgtgaac	3420
cagccagaag	tttggccgca	gcccccctt	gccctagaag	gcccttgcc	tccttcccga	3480
ccggctggtg	ccactctgga	aaggcccaag	actctgtccc	ccaagactct	ctcccctggc	3540
aagaatgggg	ttgtcaaaga	cgaaaaaa	tttggagtg	ctgtggagaa	tccggagttac	3600
ctggcacccc	ggggcagagc	tgccctcag	ccccaccctc	ctccagcctt	cagccagcc	3660
tttgacaacc	tgtattactg	ggaccaggat	ccatcagagc	ggggctctcc	acccagcacc	3720
tttgaaggga	cccctacagc	agagaacccg	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
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 Ser Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu		
290	295	300
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	330	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 aaggcgtgct ccacgctttt 60

gccggaggac agagactgac atgaaacagg ggaaggccct ggctgtcctc atcctggcta 120

tcattttct tcaaggtact ttggcccagt caatcaaagg aaaccacttg gttaagggtgt 180

atgactatca agaagatggc tcggacttc tgacttgtga tgcagaagcc aaaaatatca 240

catggtttaa agatggaaag atgatggct tcctaactga agataaaaaa aaatggaatc 300

ES 2 832 704 T3

	tggaaagtaa tgccaaggac cctcgaggga tgtatcagtg taaaggatca cagaacaagt	360
	caaaaacctt ccaagtgtat tacagaatgt gtcagaactg cattgaacta aatgcagcca	420
	ccatatctgg ctttctcttt gctgaaatcg tcagcatttt cgcccttgct gttgggtct	480
	acttcattgc tggacaggat ggagttcgcc agtcgagagc ttcagacaag cagactctgt	540
	tgcccaatga ccagctctac cagcccccta aggatcgaga agatgaccag tacagccacc	600
	ttcaaggaaa ccagttgagg aggaattgaa ctcaggactc agagtagtcc aggtgttctc	660
	ctccttattca gttcccagaa tcaaagcaat gcattttgaa aagctcttag cagagagact	720
	ttcagcccta aatctagact caaggttccc agagatgaca aatggagaag aaaggccatc	780
	agagcaaatt tgggggtttc tcaaataaaa taaaaataaa aacaaataact gtgtttcaga	840
	agcgccacctt attggggaaa attgtaaaag aaaaatgaaa agatcaaata accccctgga	900
	tttgaatata attttttgtt ttgtatattt tatttcgttt ttgtataaggt tataattcac	960
	atggctcaaa tattcagtga aagctctccc tccaccgcca tcccctgcta cccagtgacc	1020
	ctgttgcctt cttcagagac aaatttagttt ctctttttt tttttttttt ttttttttg	1080
	agacagtctg gctctgtcac ccaggctgaa atgcagtggc accatctcg ctcactgcaa	1140
	cctctgcctc ctgggttcaa gcgattctcc tgcctcagcc tcccggcag ctgggattac	1200
	aggcacacac taccacaccc ggctaatttt tttttttttt tttttttttt ttttttttg	1260
	tgttggccaa gctggtctcg aactcctgac ctcaagtgat ccgccccct c	1311
5	<210> 6	
	<211> 182	
	<212> PRT	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<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 cactctcctc tttccggtagtca	60
gctaggggag ggcagctctc acccaggctg atagttcggt gacctggctt tatctactgg	120
atgagttccg ctgggagatg gaacatagca cgtttctctc tggcctggta ctggctaccc	180
ttctctcgca agtgagcccc ttcaagatac ctatagagga acttgaggac agagtgtttg	240
tgaattgcaa taccagcatc acatggtag agggAACGGT ggAACACTG ctctcagaca	300
ttacaagact ggacctggaa aaacgcattcc tggaccacgg aggaatatat aggtgtaatg	360
ggacagatat atacaaggac aaagaatcta ccgtgcaagt tcattatcga atgtgccaga	420
gctgtgtgga gctggatcca gccaccgtgg ctggcatcat tgtcaactgat gtcattgcca	480
cctctgtctt tgctttggaa gtcttctgct ttgctggaca tgagactgga aggctgtctg	540
gggctgccga cacacaagct ctgttgagga atgaccaggt ctatcagccc ctccgagatc	600

ES 2 832 704 T3

gagatgatgc tcagtagacgc caccttggag gaaactgggc tcggaacaag tgaacctgag 660
 actggtggtct tctagaagca gccattacca actgtacctt cccttcttgc tcagccaata 720
 aatatatcct ctttcactcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 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 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

ES 2 832 704 T3

<213> *Homo sapiens*

<300>

<308> NM_000733.3

<309> 03-05-2014

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

<400> 9

tattgtcaga	gtccttgcgtt	ttggcccttct	aggaaggctg	tgggacccag	ctttcttcaa	60
ccagtccagg	tggaggcctc	tgccttgaac	gtttccaagt	gaggtaaaac	ccgcaggccc	120
agaggcctct	ctacttcctg	tgtggggttc	agaaaccctc	ctccccctccc	agcctcaggt	180
gcctgcttca	gaaaatgaag	tagtaagtct	gctggcctcc	gccatcttag	taaagtaaca	240
gtccccatgaa	acaaagatgc	agtccggcac	tcactggaga	gttctggcc	tctgccttct	300
atcagttggc	gtttgggggc	aagatggtaa	tgaagaaatg	ggtggattta	cacagacacc	360
atataaaagtc	tccatctctg	gaaccacagt	aatattgaca	tgccctcagt	atcctggatc	420
tgaaatacta	tggcaacaca	atgataaaaa	cataggcggt	gatgaggatg	ataaaaacat	480
aggcagtgtat	gaggatcacc	tgtcaactgaa	gaaattttca	gaattggagc	aaagtggta	540
ttatgtctgc	taccccagag	gaagcaaacc	agaagatgcg	aacttttac	tctacctgag	600
ggcaagagtg	tgtgagaact	gcatggagat	ggatgtgatg	tcggtgccca	caattgtcat	660
agtggacatc	tgcacatctg	ggggcttgct	gctgctggtt	tactactgga	gcaagaatag	720
aaaggccaag	gccaagcctg	tgacacgagg	agcgggtgct	ggcggcaggc	aaaggggaca	780
aaacaaggag	aggccaccac	ctgttccaa	cccagactat	gagcccatcc	ggaaaggcca	840
gcgggacctg	tattctggcc	tgaatcagag	acgcacatctg	ccctctggag	aacactgcct	900
cccgctggcc	caggctctct	ctccagtc	cctgcgactc	cctgtttcct	gggctagtct	960
tggacccac	gagagagaat	cgttcctcag	cctcatggtg	aactcgcgcc	ctccagcctg	1020
atcccccgct	ccctcctccc	tgccttctct	gctggtaccc	agtccctaaaa	tattgctgct	1080
tcctcttcct	ttgaagcatc	atcagtagtc	acaccctcac	agctggcctg	ccctcttgcc	1140
agatattta	tttgtgctat	tcactccctt	ccctttggat	gttaacttctc	cgttcagttc	1200
cctccttttc	ttgcatgtaa	gttgtccccc	atcccaaagt	attccatcta	cttttctatc	1260
gccgtccct	tttgcagccc	tctctggga	tggactgggt	aaatgttgac	agaggccctg	1320
ccccgttcac	agatcctggc	cctgagccag	ccctgtgctc	ctccctcccc	caacactccc	1380
taccaacccc	ctaattccct	actccctcca	ccccccctcc	actgttaggcc	actggatgg	1440
catttgcac	tccgtaaatg	tgctctgctc	ctcagctgag	agagaaaaaaaa	ataaactgt	1500
tttggctgca	agaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaa			1534

<210> 10

<211> 207

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 832 704 T3

<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 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> Cánido

<300>

ES 2 832 704 T3

<308> NM_001003379.1

<309> 22-02-2014

<313> (1)..(1436)

<400> 11

ataaacgtta	gttactattt	ttatcaggac	tcctgggacc	cctatctcac	taatttcatt	60	
aaagacagta	taatacagca	gctcacacag	actttcgat	tcagaaaaac	agttgtgtcg	120	
ggccttgggt	aaattatgt	aggcaagcct	cagtttgctc	agcggtaaaa	cgaggaaagt	180	
aataagccac	ccgcctccgc	cattttgggt	agaataaggg	tgcattccagt	gagagaagga	240	
tgcagtcag	gaacctctgg	agaattctgg	gactctgtct	cttattcagtt	ggtgcttggg	300	
ggcaggacga	ggatttcaaa	gcttctgatg	acttgacaag	tatatctcca	gagaaacggt	360	
ttaagggtctc	catctcttgg	accgaggtag	tggtgacatg	ccctgatgtt	tttggatatg	420	
ataatataaa	atgggaaaaaa	aatgataacc	ttgtggaagg	tgcttagtaac	agagagctat	480	
ctcagaagga	gttttcagaa	gtggacgaca	gtggtttatta	tgcctgtat	gcagattcca	540	
taaaggagaa	gagctatctc	tacctgagag	caagagtgtg	tgcaaactgc	atagaggtga	600	
atctgatggc	agtggtcaca	atcattttag	ctgacatctg	ccttactctg	gggttgctgc	660	
tgatgggtgt	ttactggagc	aagactagaa	aggccaatgc	caagcctgtg	atgagaggaa	720	
caggtgccgg	cagcaggccc	aggggacaaa	acaaggagaa	gccaccacct	gttcccaatc	780	
cagactacga	gccccatccgg	aaaggccagc	aggacctgt	ttctggcctg	aatcagagag	840	
gcatctgacg	gctcctgagg	acacggcctc	cccaggccc	aggtcttgg	gtctccaggt	900	
cctgctactc	ccagttaccct	gggtttatct	tgaacccca	ttcctctgccc	tttggagaa	960	
ttctggagaa	ctaactccca	gcctgcagcc	ttatccccag	caccctccaa	cccgccttct	1020	
ctgctggcac	ttggccctgc	aatatcacct	cctcatcatg	gccactacc	gcccccccac	1080	
cagccagact	gccctcttgt	cgggttattt	atttctgtt	ccctgacgccc	cccaccatca	1140	
ccaattccctt	cctacccttc	agaggtatcc	ttgctccctt	ccgttaccct	ctccggaca	1200	
gaacctgccc	ccatccctta	ctatcccacc	tacctttccg	ttttccagc	tctcttttg	1260	
gtgaccctct	gtggggatgg	actaggtaac	tctggtagag	gtcctgcccc	atccatgacc	1320	
ttggcccaaga	gccaccctct	gccagcaggc	ccctggatga	tcatttgcat	tcttacaaat	1380	
5	gtgcttaggct	ccttgacagc	tagagagaaa	ataataaagt	gtatttggtt	aaaaaa	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 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

ggcggcgaggatctggcgaggatgttggaaagtggggaggcgatct

45

10

<210> 14

ES 2 832 704 T3

<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Ligador peptídico (G4S)3
<400> 14
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser 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
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
15 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 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

10 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 832 704 T3

<210> 18
<211> 723
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> C105S de scFv de OKT3
<400> 18

caggtgcagc tgggtgcagag tgggtggcgga gtgggtgcagc ctggcagatc cctgagactg 60
tcttgcaagg ccagcggcta cacccttcacc cggtaacacca tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggcaagg gcctggaatg gatcggtac atcaacccct cccggggcta caccaactac 180
aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc agccgggaca actccaagaa caccgcctt 240
ctgcagatgg actccctgcg gcctgaggat accggcgtgt actttgcgc cggtaactac 300
gacgaccact actctctgga ctactgggc cagggAACCC ctgtgacagt gtctagcgga 360
gggggagggtt caggtggcg tggatcaggg ggcggaggct ctgatatcca gatgacccag 420
tccccctcca gcctgtctgc ctctgtggga gacagagtga caattacatg ctccgccagc 480
tccagcgtgt cctacatgaa ttggtatcag cagacccctg gcaaggctcc caagcggtgg 540
atctacgaca cctccaagct ggcctccggc gtgccttcca gatttctgg cagcggctcc 600
ggcacagact ataccttac aatcagctcc ctgcagcccg aagatatcgc caccctactac 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 Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser 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 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	tggcgagga	ctgggcagc	ctggcggtc	tctgagactg	60
tcttgtccg	cctccggctt	caacatcaag	gacacctaca	tccactgggt	gcgacaggcc	120
cctggcaagg	gactggaatg	ggtggccaga	atctacccc	ccaacggcta	caccagatac	180
gccgactctg	tgaaggggcg	gttcaccatc	tccgcccaca	cctccaagaa	caccgcctac	240
ctgcagatga	actccctgcg	ggccgaggac	accgcccgt	actactgttag	tagatgggaa	300
ggcgacggct	tctacgcccc	ggactattgg	ggccaggggca	ccctcggtac	cgtgtcctct	360
gcttctacca	agggcccctc	tgtgtttcct	ctggccccc	ccagcaagtc	cacctctgg	420
ggaacagccg	ccctgggctg	cctcgtaag	gactacttc	ccgagcccgt	gaccgtgtcc	480
tgaactctg	gcgcgtcgac	ctctggcg	cacaccc	ctgctgtgct	gcagtctagc	540
ggcctgtact	ccctgtcctc	cgtcgta	gtgccttcca	gctctctgg	cacccagacc	600
tacatctgca	acgtgaacca	caagccctcc	aataccaagg	tggacaagcg	ggtggAACCC	660
aagtccgtcg	acaagaccca	cacctgtccc	ccttgcctg	cccctgaact	gctggcgga	720
ccttccgtgt	tcctgttccc	cccaaagccc	aaggacaccc	tgtatgtctc	ccggacccccc	780
gaagtgaccc	gcgtgggtgt	ggatgtgtcc	cacgaggacc	ctgaagtgaa	gttcaattgg	840
tacgtggacg	gcgtggaa	gtcacaacg	aagaccaagc	ctagagagga	acagtacg	900
tccacccatcc	gggtgggtgc	cgtgcgtaca	gtgcgtcacc	aggactggct	gaacggcaaa	960
gagtacaagt	gcaaaagtgtc	caacaaggcc	ctgcctgccc	ccatcgaaaa	gaccatctcc	1020
aaggccaagg	gccagccccc	ggaaccccaag	gtgtacacac	tgcctcttag	cagggacgag	1080
ctgaccaaga	accagggtgtc	cctgacccgt	ctcgtaaa	gcttctaccc	ctccgatatc	1140
gccgtggaa	gggagtccaa	cggccagcc	gagaacaact	acaagaccac	ccccctgtg	1200
ctggactccg	acggctcatt	cttcctgtac	agcaagctga	ccgtggacaa	gtcccgggtgg	1260
cagcagggca	acgtgttctc	ctgctccgt	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	tggtggaatc	tggcgaggaa	ctgggtgcagc	ctggcggttc	tctgagactg	60
tcttgcgg	cctccggctt	caacatcaag	gacacctaca	tccactgggt	gcgacaggcc	120
cctggcaagg	gactggaatg	ggtggccaga	atctacccca	ccaacggcta	caccagatac	180
gccgactctg	tgaagggccg	gttaccatc	tccgcccaca	cctccaagaa	caccgcctac	240
ctgcagatga	actccctgcg	ggccgaggac	accgcccgtgt	actactgttag	tagatgggaa	300
ggcgacggct	tctacgcat	ggactattgg	ggccaggggca	ccctcgtagc	cgtgtcctct	360
gcttctacca	agggcccttc	tgtgtttcct	ctggccccct	ccagcaagtc	cacctctgg	420
ggaacagccg	ccctgggctg	cctcgtaag	gactactttc	ccgagcccgt	gaccgtgtcc	480
tgaactctg	gcgctctgac	ctctggcggt	cacacccccc	ctgctgtgct	gcagtcttagc	540
ggcctgtact	ccctgtcctc	cgtcgtaga	gtgcctccca	gctctctggg	cacccagacc	600
tacatctgca	acgtgaacca	caagccctcc	aataccaagg	tggacaagcg	ggtggAACCC	660
aagtctgacg	acaagaccca	cacctgtccc	ccttgcctcg	cccctgaact	gctggcgga	720
ccttccgtgt	tcctgttccc	cccaaagccc	aaggacaccc	tgtatgatctc	ccggacccccc	780
gaagtgaccc	gcgtgggtgt	ggatgtgtcc	cacgaggacc	ctgaagtgaa	gttcaattgg	840
tacgtggacg	gcgtggaagt	gcacaacgcc	aagaccaagc	ctagagagga	acagtacaac	900
tccacccat	gggtgggtgtc	cgtgctgaca	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaaa	960
gagtacaagt	gcccgtgtc	caacaaggcc	ctgcctgccc	ccatcgaaaa	gaccatctcc	1020
aaggccaaagg	gccagccccc	ggaaccccaag	gtgtacacac	tgcccccstag	cagggacgag	1080
ctgaccaaga	accagggtgtc	cctgaccctgt	ctcgtaaaag	gcttctaccc	ctccgatatac	1140
gcccgtggaat	gggagtccaa	cggccagcct	gagaacaact	acaagaccac	ccccctgtg	1200
ctggactccg	acggctcatt	cttcctgtac	agcaagctga	ccgtggacaa	gtcccggtgg	1260
cagcaggggca	acgtgttctc	ctgctccgtg	atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	1320
cagaagtccc	tgtccctgag	ccccggcaaa				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	tggtggaatc	tggcgaggaa	ctgggtgcagc	ctggcggttc	tctgagactg	60
tcttgtccg	cctccggctt	caacatcaag	gacacctaca	tccactgggt	gcgacaggcc	120
cctggcaagg	gactggaatg	ggtggccaga	atctacccca	ccaacggcta	caccagatac	180
gccgactctg	tgaagggccg	gttaccatc	tccgcccaca	cctccaagaa	caccgcctac	240
ctgcagatga	actccctgcg	ggccgaggac	accgcccgtgt	actactgttag	tagatgggga	300
ggcgacggct	tctacgcat	ggactattgg	ggccaggggca	ccctcgtagc	cgtgtcctct	360
gcttctacca	agggcccttc	tgtgtttcct	ctggccccct	ccagcaagtc	cacctctggt	420
ggaacagccg	ccctgggctg	cctcgtgaag	gactactttc	ccgagcccgt	gaccgtgtcc	480
tgaaactctg	gcgctctgac	ctctggcggt	cacacccccc	ctgctgtgt	gcagtcttagc	540
ggcctgtact	ccctgtcctc	cgtcgtgaca	gtgcctccca	gctctctggg	cacccagacc	600
tacatctgca	acgtgaacca	caagccctcc	aataccaagg	tggacaagcg	ggtggAACCC	660
aagtccctg	acaagaccca	cacccccc	ccttgcctcg	cccctgaact	gctggcgga	720
ccttccgtgt	tcctgttccc	cccaaagccc	aaggacaccc	tgtatgatctc	ccggacccccc	780
gaagtgaccc	gcgtgggtgt	ggatgtgtcc	cacgaggacc	ctgaagtgaa	gttcaattgg	840
tacgtggacg	gcgtggaagt	gcacaacgcc	aagaccaagg	ctagagagga	acagtacaac	900
tccacccat	gggtgggtgtc	cgtgctgaca	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaaa	960
gagtacaagt	gcaaaagtgtc	caacaaggcc	ctgcctgccc	ccatcgaaaa	gaccatctcc	1020
aaggccaaagg	gccagccccc	ggaaccccaag	gtgtacacac	tgcccccstag	cagggacgag	1080
ctgaccaaga	accagggtgtc	cctgacccgt	ctcgtgaaag	gcttctaccc	ctccgatatac	1140
gccgtggaat	gggagtccaa	cggccagcc	gagaacaact	acaagaccac	ccccccctgt	1200
ctggactccg	acggctcatt	cttcctgtac	agcaagctga	ccgtggacaa	gtcccggtgg	1260
cagcaggggca	acgtgttctc	ctgctccgt	atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	1320
cagaagtccc	tgtccctgag	ccccggcaaa				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 ctgtggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggcctccca ggacgtgaac accgcccgtgg cttggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactcc gcctcattcc tgtactccgg cgtgccctcc 180

ES 2 832 704 T3

agattctccg	gcagcagatc	tggcaccgac	tttaccctga	ccatctccag	cctgcagccc	240
gaggacttcg	ccaccta	ctgccagcag	cactacacca	cccccccccac	cttggccag	300
ggcaccaagg	tggaaatcaa	gcggaccgtg	gccgctccct	ccgtgttcat	cttcccacct	360
tccgacgagc	agctgaagtc	cggcaccgct	tctgtcgtgt	gcctgctgaa	caacttctac	420
ccccgcgagg	ccaaggtgca	gtggaaagggtg	gacaacgccc	tgcagtccgg	caactccca	480
aatccgtga	ccgagcagga	ctccaaggac	agcacctact	ccctgtcctc	caccctgacc	540
ctgtccaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct	gcgaagtgac	ccaccagggc	600
ctgtctagcc	ccgtgaccaa	gtcttcaac	cggggcgag	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 tggcgagga ctgggtcagc ctggcggtc tctgagactg	60
tcttgtgccg cctccggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt gcgacaggcc	120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccaga atctacccca ccaacggcta caccagatac	180
gccgactctg tgaaggcccgg gttcaccatc tccgcccaca cctccaagaa caccgcctac	240
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgcccgtgt actactgttag tagatgggga	300
ggcgacggct tctacgccat ggactattgg ggccagggca ccctcggtac cgtgtcctct	360
gcttctacca agggcccttc tgtgtttcct ctggccccct ccagcaagtc cacctctgg	420
ggaacagccg ccctgggctg cctcgtaag gactacttcc ccgagccgtg gaccgtgtcc	480
tggaactctg ggcgtctgac ctctggcgtg cacacccctcc ctgctgtgtgc gcagtctagc	540
ggcctgtact ccctgtctc cgctcgtaa gtgccttcca gctctctggg caccctggacc	600
tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aataccaagg tggacaagcg ggtggAACCC	660
aagtccctgca acaagaccca cacctgtccc cttgtcctg cccctgaact gctggccgga	720
ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tggatgtatctc ccggacccccc	780
gaagtgaccc gctgttgtgtt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg	840
tacgtggacg gctgtggaaat gcacaacgcc aagaccaagc ctagagagga acagttacgcc	900
tccacccatcc ggggtgggttc cgtgtcgaca gtgtgcacc aggactggct gaacggcaaa	960
gagtcacaaatgt gctgtgttc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgaaaa gaccatctcc	1020

ES 2 832 704 T3

aaggccaagg	gccagccccg	ggaaccccag	gtgtacacac	tgccccctag	cagggacgag	1080
ctgaccaaga	accagggtgc	cctgacctgt	ctcgtaaaag	gcttctaccc	ctccgatatac	1140
gccgtggaat	gggagtccaa	cggccagcct	gagaacaact	acaagaccac	ccccccctgtg	1200
ctggactccg	acggctcatt	tttcctgtac	agcaagctga	ccgtggacaa	gtcccggtgg	1260
cagcagggca	acgtgttctc	ctgctccgtg	atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	1320
cagaagtccc	tgtccctgag	ccccggcaaa				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

ES 2 832 704 T3

<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	cccttcagc	ctgtccgcct	ctgtggcga	cagagtgacc	60
atcacctgtc	gggcctccca	ggacgtgaac	accgccgtgg	cttggtatca	gcagaaggccc	120
ggcaaggccc	ccaagctgct	gatctactcc	gcctccttcc	tgtactccgg	cgtgccctcc	180
agattctccg	gcagcagatc	tggcaccgac	tttaccctga	ccatctccag	cctgcagccc	240
gaggacttcg	ccacctaacta	ctgccagcag	cactacacca	cccccccccac	cttggccag	300
ggcaccaagg	tggaaatcaa	gcccggcgtg	gccgctccct	ccgtgttcat	cttcccacct	360
tccgacgagc	agctgaagtc	cggcaccgct	tctgtcggt	gcctgctgaa	caacttctac	420
ccccgcgagg	ccaagggtgca	gtggaaagggtg	gacaacgccc	tgcagtcgg	caactcccaag	480
gaatccgtga	ccgagcagga	ctccaaggac	agcacctact	ccctgtcctc	caccctgacc	540
ctgtccaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct	gcgaagtgac	ccaccaggc	600
ctgtctagcc	ccgtgaccaa	gtcttcaac	cggggcgagt	gcactagtgg	cgccggagga	660
tctggcggag	gtggaaagtgg	gggaggcgg	tctcagggtgc	agctggtgca	gagtggtg	720
ggagtgggtgc	agcctggcag	atccctgaga	ctgtcttgca	aggccagcgg	ctacaccttc	780
acccggtaca	ccatgcactg	ggtgcgacag	gcccctggca	agggcctgg	atggatcggc	840
tacatcaacc	cctcccccgg	ctacaccaac	tacaaccaga	agttcaagga	ccggttcacc	900
atcagccggg	acaactccaa	gaacaccgccc	tttctgcaga	tggactccct	gcggcctgag	960
gataccggcg	tgtactttg	cgcccggtac	tacgacgacc	actactctct	ggactactgg	1020
ggccaggggaa	cccctgtgac	agtgtctagc	ggagggggag	gttcagggtgg	cggatca	1080
ggggggcgag	gctctgat	ccagatgacc	cagtccccct	ccagcctgtc	tgcctctgt	1140
ggagacagag	tgacaattac	atgctccgcc	agctccagcg	tgtcctacat	gaattggat	1200
cagcagaccc	ctggcaaggc	tcccaagcgg	tggatctacg	acaccccaa	gctggcctcc	1260
ggcgtccct	ccagatttc	tggcagcggc	tccggcacag	actatacctt	tacaatcagc	1320
tccctgcagc	ccgaagat	cgccacctac	tactgccagc	agtggtcctc	caaccccttc	1380
acctttggcc	aggggacaaa	actgcagatc	accaga			1416

10 <210> 29
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 832 704 T3

<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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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 Ser 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

ES 2 832 704 T3

<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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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

ES 2 832 704 T3

<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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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 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 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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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 Ser 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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

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

Gly Ser 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 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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser 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 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 Ser Gly Gly Gly Ser 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
15 <400> 38
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser 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 Ser 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 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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser 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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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
145 150 155 160

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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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

ES 2 832 704 T3

Gly Gly Ser 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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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 Ser 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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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 Ser Gly Gly Ser 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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

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

Gly Ser 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	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 Ile 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 Ser Gly Gly Gly			
210	215	220	
Gly Ser 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	

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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

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

Ser Gly Gly Gly Ser 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 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 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

ES 2 832 704 T3

<220>

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

<400> 51

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser 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 Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser 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

ES 2 832 704 T3

<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 Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

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

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

ES 2 832 704 T3

<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 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 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 Ser 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 Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser 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 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 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 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

195 200 205

210 215 220

225 230 235 240

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

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

5 Ser 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

5

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

ES 2 832 704 T3

<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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
130	135	140
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 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 Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Ser 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 Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser 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 Ser 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

ES 2 832 704 T3

<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 Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser 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 tccctttcc ctgtccgctt cagtcggcga tcgggtcact	60
attacttgtc gggcttcaca ggatgtcaac acagccgtgg cttggtagcca gcagaagccc	120
gggaaagcac ctaagctgct gatctactct gccagttcc tgtattctgg cgtcccaagt	180
aggttttcag gctcccgag cgaaactgac ttccacctga caattccag cctgcagccc	240
gaggattttg ctacctaata ttgccagcag cattatacta cccccccaac attcggccag	300
ggcacaaaaag tcgaaatcaa gcggaccgtg gcccccccat cagtgttcat cttcccccc	360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgccc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaaggtg gacaacgccc tgcagtcgg caactccag	480
gagtccgtga ccgagcagga ctccaaggac tccacctact ccctgtcctc caccctgacc	540
ctgtccaaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggc	600
ctgtcctccc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gcactagtgg aggaggaggt	660
agcggaggag gagttctgg cggaggggggt tcccaggtgc agctggtgca gagcggagga	720
ggagtggtgc agccaggaag gagcctgcga ctgtcttgca aggctagtgg ctacaccc	780
acacgatata ctatgcactg ggtgaggcag gcacctgtta aaggcttgaa gtggatcgcc	840
tacattaacc cctctagggg atacaccaac tataatcaga agttcaaaga caggttcacc	900
atctcacccgataactccaa gaataccgccc ttccctgcaga tggactccct gcggcccgaa	960
gatacaggcg tgtatTTTG cgctagatac tatgacgatc attactgtct ggactattgg	1020

ES 2 832 704 T3

ggacagggga	cccctgtgac	agtgtccagc	ggtggaggag	ggtcaggtgg	aggagggagc	1080
ggtggcgag	ggtctgacat	ccagatgacc	cagtccccat	ctagtctgag	cgcctctgt	1140
ggcgatagag	tgactattac	ctgcagtgct	tcatccagcg	tgagctacat	gaactggtat	1200
cagcagacac	ccggaaaggc	acctaaacgc	tggatctacg	atactagcaa	gctggcctct	1260
ggcgtgcca	gtcgattcag	tggttcaggc	tccggaacct	actatacctt	caccatctct	1320
agtctgcagc	ctgaggatata	tgccacatac	tattgtcagc	agtggtcatac	caatccattc	1380
acttttgggc	agggtaccaa	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	cgaggagggt	ctggtcagc	ccggaggttc	cctgagactg	60
tcctgtccg	catctgggtt	taatatcaag	gacacataca	tccactgggt	gagacaggca	120
cccgccaaag	gactggagtg	ggtcgccagg	atctacccta	ccaacggta	cacaagatata	180
gctgactctg	tgaaggggcg	gttaccatc	tccgcccata	ctagaaaaaa	caccgcttac	240
ctgcagatga	attccctgag	ggcagaagat	accgctgtct	actactgttc	aagatggggg	300
ggggatggtt	tttacgctat	ggattattgg	ggccaggggca	ccctggtgac	cgtgtcctcc	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtttcccc	ctggcacccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	480
tggaactcag	gcccctgac	cagccgcgtg	cacacccctcc	cgccgcgtcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtccctccca	gcagctgggg	cacccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagccc	660
aaatcttgtg	acaaaactca	cacatgcccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctggggggga	720
ccgtcagtct	tccttttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggacccct	780
gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgccggagga	gcagtacgcc	900
agcacgtacc	gtgtggtcag	cgtccctacc	gtccctgcacc	aggactggct	aatggcaag	960
gagtacaagt	gcaagggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1020
aaagccaaag	ggcagccccc	agaaccacag	gtgtacaccc	tgccccatc	ccgggatgag	1080
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1140

ES 2 832 704 T3

gccgtggagt	gggagagcaa	tggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctccgtg	1200	
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gaggcagggtgg	1260	
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcattgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320	
cagaagagcc	tctccctgtc	tccggtaaa				1350	
<210>	69						
<211>	1410						
<212>	ADN						
5	<213>	Secuencia artificial					
	<220>						
	<223>	Cadena ligera de HER2-C825					
	<400>	69					
	gatattcaga	tgactcagtc	tccctttcc	ctgtccgctt	cagtcggcga	tcgggtcact	60
	attacttgtc	gggcttcaca	ggatgtcaac	acagccgtgg	cttggtacca	gcagaagccc	120
	ggaaaagcac	ctaagctgct	gatctactct	gccagttcc	tgtattctgg	cgtcccaagt	180
	aggttttcag	gctcccgag	cggaactgac	ttcaccctga	caatttccag	cctgcagccc	240
	gaggattttg	ctacctacta	ttgcagcag	cattatacta	cccccccaac	attcggccag	300
	ggcacaaaag	tcgaaatcaa	gcccggcgtg	gccggccccc	ccgtgttcat	cttccccccc	360
	tccgacgagc	agctgaagtc	cgccacccgccc	tccgtgggt	gcctgctgaa	caacttctac	420
	ccccgggagg	ccaagggtgca	gtggaaagggtg	gacaacgccc	tgcagtcgg	caactccag	480
	gagtccgtga	ccgagcagga	ctccaaaggac	tccacctact	ccctgtcctc	caccctgacc	540
	ctgtccaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct	gcgagggtgac	ccaccaggc	600
	ctgtccccc	ccgtgaccaa	gtccttcaac	cgggcgag	gccccgtgg	tggtagcggc	660
	ggcggtggaa	gcccgtccca	tgtgaaactg	caggaaagcg	gcccagggtct	ggccatccac	720
	tcccagtctc	tgagcctgac	atgcactgtg	agcggattct	ctctgacaga	ctatgggtg	780
	cactgggtca	gacagagtcc	aggaaagggg	ctggagtggc	tggcgtcat	ctggcaggc	840
	ggagggactg	cttataaacac	cgcactgatc	agcagactga	atatctaccc	cgacaactct	900
	aaaaatcagg	tgtccctgga	gatgaacagt	ctgcaggccg	aagataccgc	tatgtactat	960
	tgcgcaggc	ggggcagcta	cccttataat	tactttgacg	cttgggggtt	tggcaccaca	1020
	gtgacagtct	ccagcggtgg	aggagggagt	ggtggaggag	ggtcagggtgg	aggagggtcc	1080
	caggcagtgg	tcattcagga	gtctgccctg	actacccccc	ctggagaaac	cgtgacactg	1140
	acttgcggat	ctagtacagg	ggcagtgact	gcctccaact	atgcacattt	ggtccaggaa	1200
	aaggcctgatc	actgtttcac	tggcctgatc	ggtggccata	acaatcgacc	accggagtg	1260
	ccagctaggt	tttcagggttc	cctgatccgc	gacaaagccg	ctctgaccat	tgctggcacc	1320
	cagacagagg	atgaagcaat	ctactttgt	gccctgtgg	attccgatca	ctgggtcatt	1380
10	ggggggggga	cacgtctgac	tgtgctgggg				1410
	<210>	70					

ES 2 832 704 T3

<211> 1350
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5 <223> Cadena pesada de HER2-C825
 <400> 70

gaagtgcagc	tggtcgagag	cggaggaggt	ctggtgacgc	ccggaggttc	cctgagactg	60
tcctgtgccg	catctgggtt	taatatcaag	gacacataca	tccactgggt	gagacaggca	120
cccgcaaaag	gactggagtg	ggtcgcccagg	atctacccta	ccaacggta	cacaagatat	180
gctgactctg	tgaaggcccg	gttcaccatc	tccgcccata	ctagaaaaaa	caccgcttac	240
ctgcagatga	attccctgag	ggcagaagat	accgctgtct	actactgttc	aagatggggg	300
ggggatggtt	tttacgctat	ggattattgg	ggccagggca	ccctggtgac	cgtgcctcc	360
gcctccacca	aggccccatc	ggtttttccc	ctggcacccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	480
tggaactcag	gcccctgac	cagccgcgtg	cacacccccc	cggccgtcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtccccctcca	gcagcttggg	cacccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagccccgc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagccc	660
aaatcttgtg	acaaaactca	cacatgccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	720
ccgtcagtct	tcctttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggacccct	780
gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagtacgcc	900
agcacgtacc	gtgtggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	aatggcaag	960
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1020
aaagccaaag	ggcagcccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccata	ccggatgag	1080
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1140
gccgtggagt	gggagagcaa	tggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctccgtg	1200
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1260
cagcagggga	acgttttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320
cagaagagcc	tctccctgtc	tccggtaaa				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 Ser 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 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
305 310 315 320

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 Ser Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Ser 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
385 390 395 400

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 Thr
450 455 460

Arg Leu Thr Val Leu Gly
465 470

<210> 72

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<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

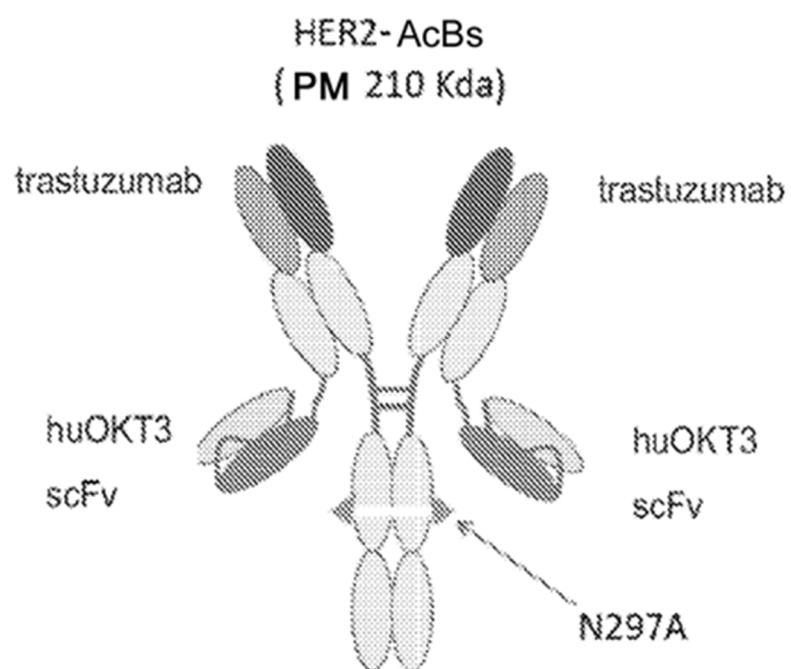
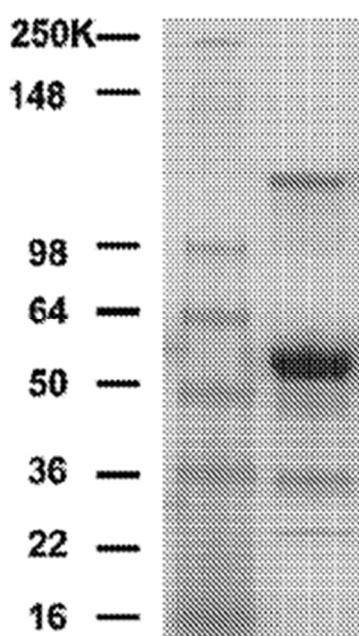
REIVINDICACIONES

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 10 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;
- 15 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.
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

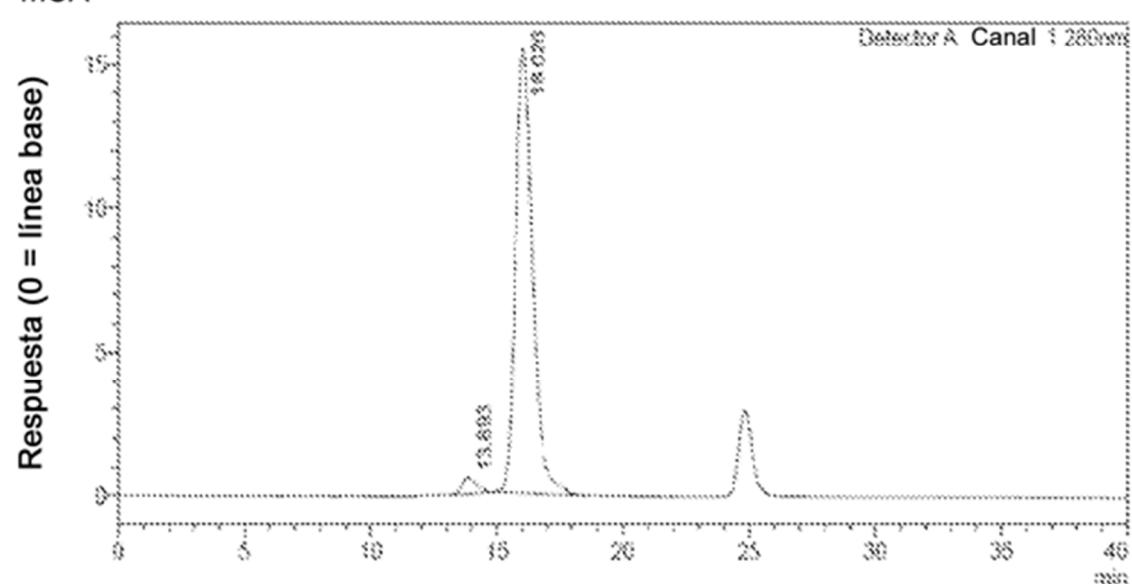
- que consiste en las SEQ ID NO: 15, 17 y 64, y un dominio V_L que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16 y 65; y;
- en el que opcionalmente:
- 5 (a) la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID NO: 25, en el que opcionalmente la secuencia de nucleótidos que codifica 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;
- (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
- 15 (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
- 25 (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.
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 cáncer positivo para HER2 en un sujeto que lo necesita.
- 40 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, leucemia, melanoma, sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, 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**

mUA

**Fig. 1C**

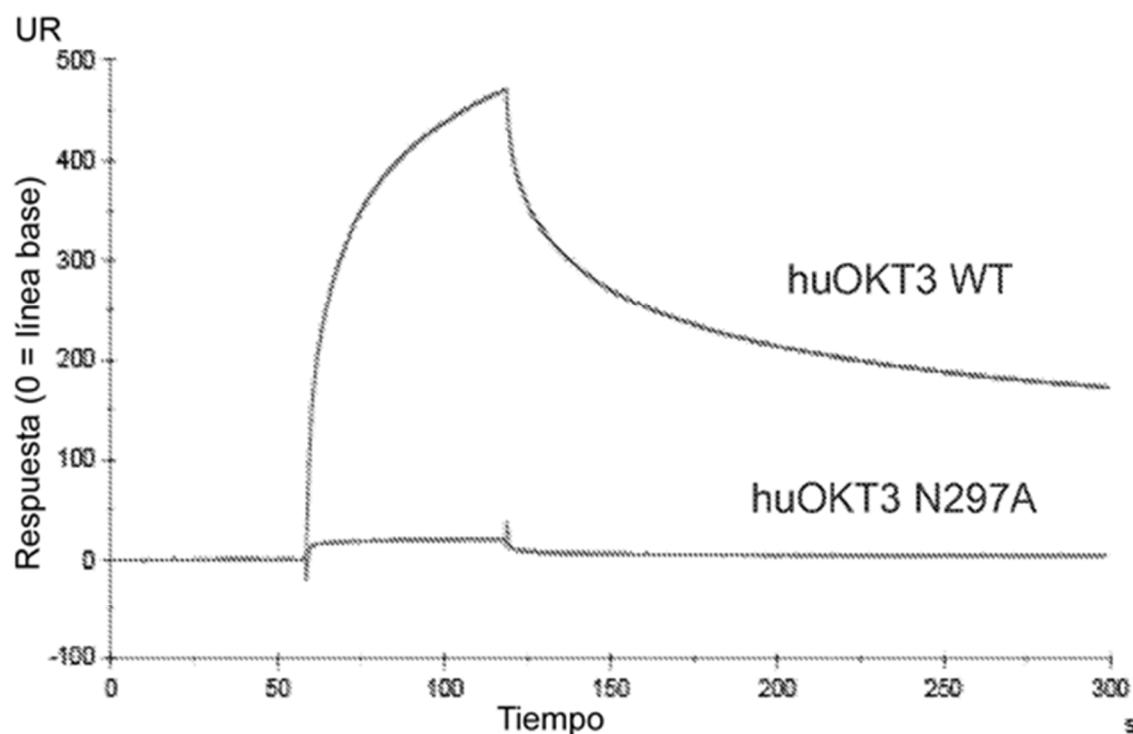


Fig. 1D

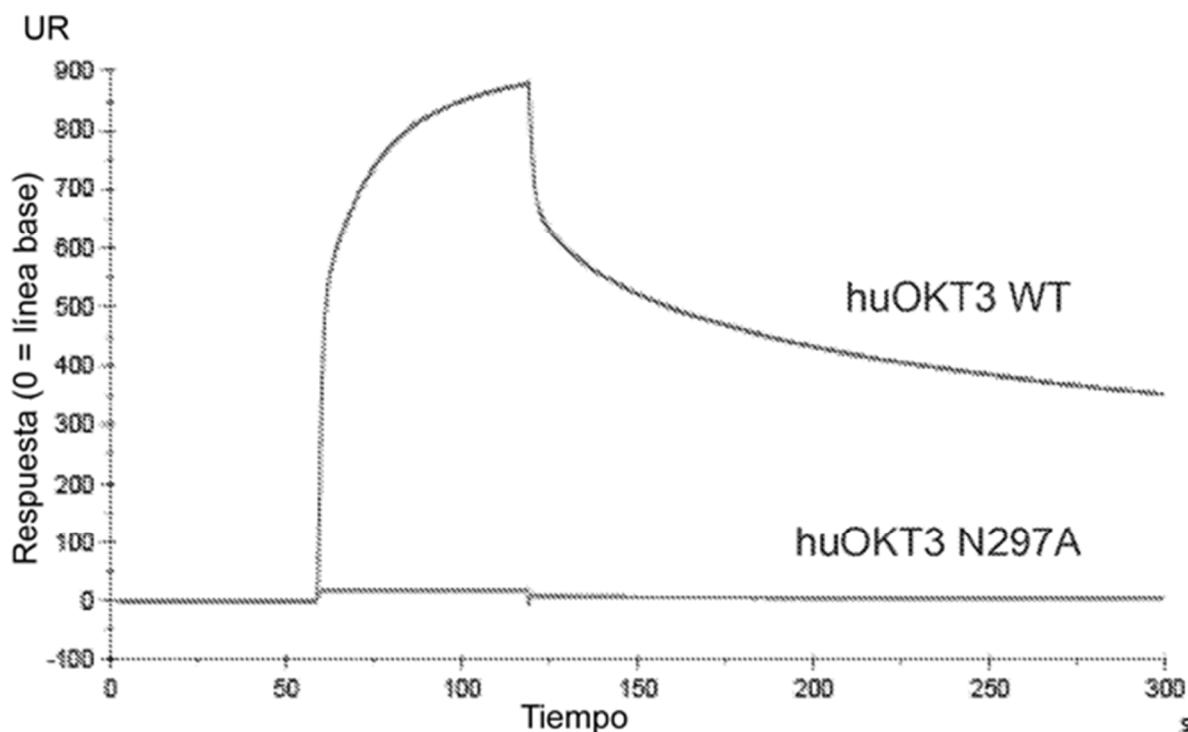
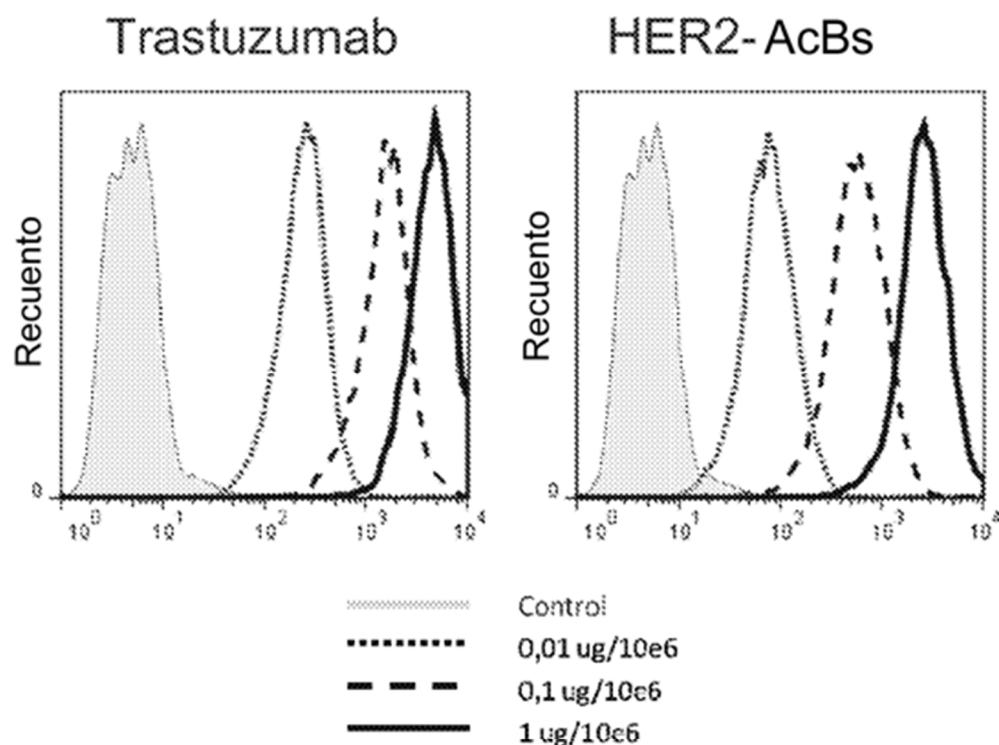
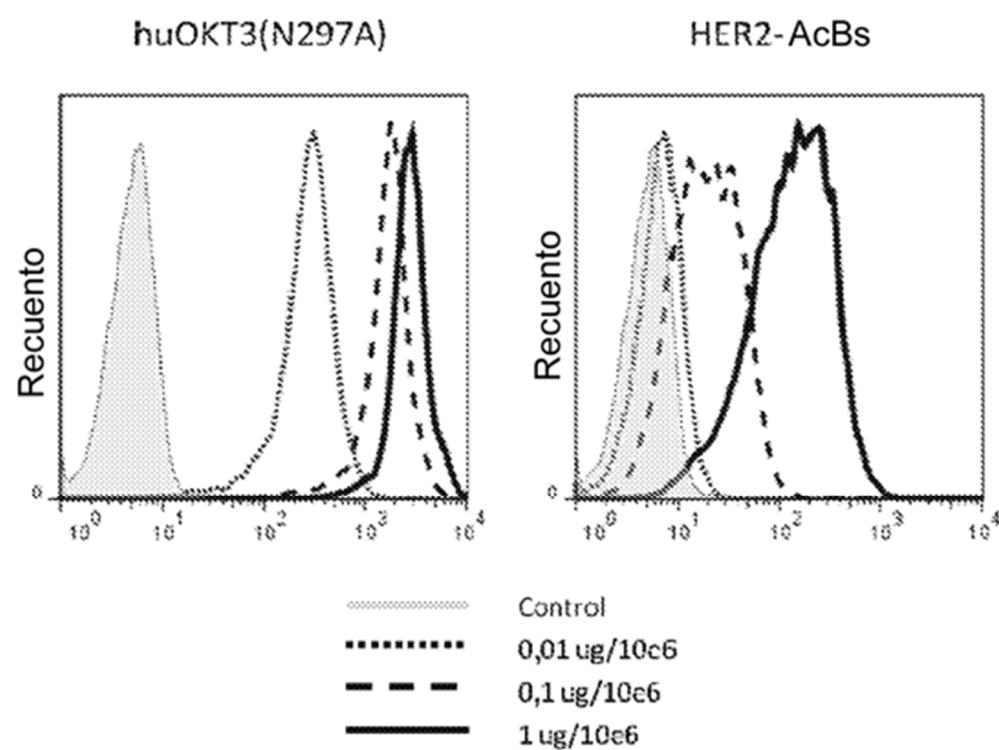
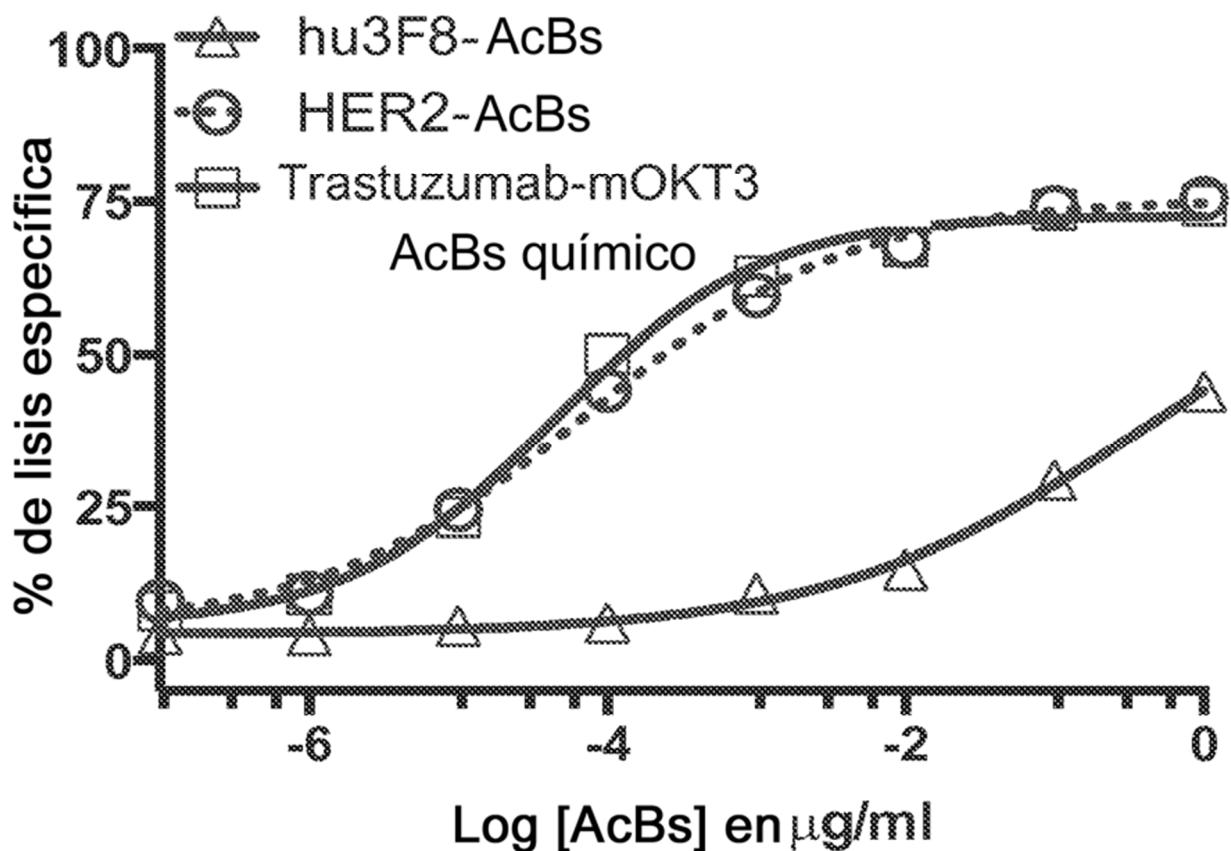


Fig. 1E

**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	SKMEI28	190	0,6	3
Osteosarcoma	CRL1427	108	2	10
Sarcoma de Ewing	SKEAW	246	2	10
Rabdomiosarcoma	HT1B82	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

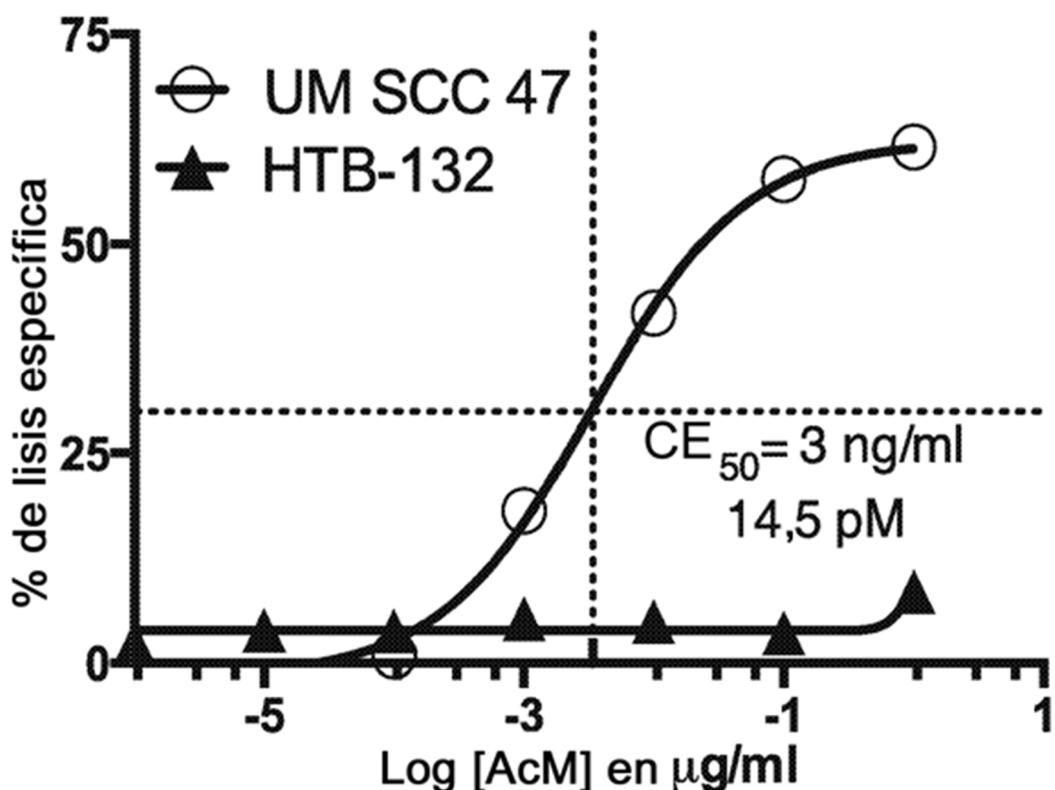


Fig. 5A

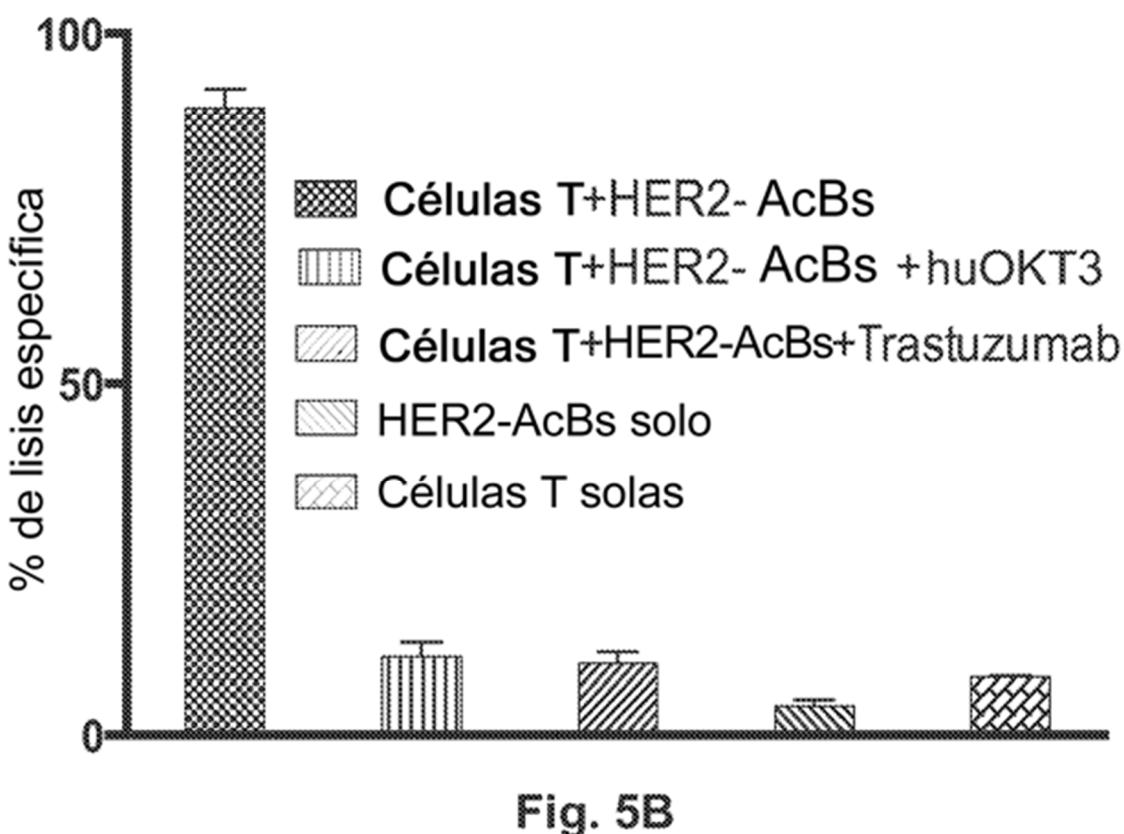


Fig. 5B

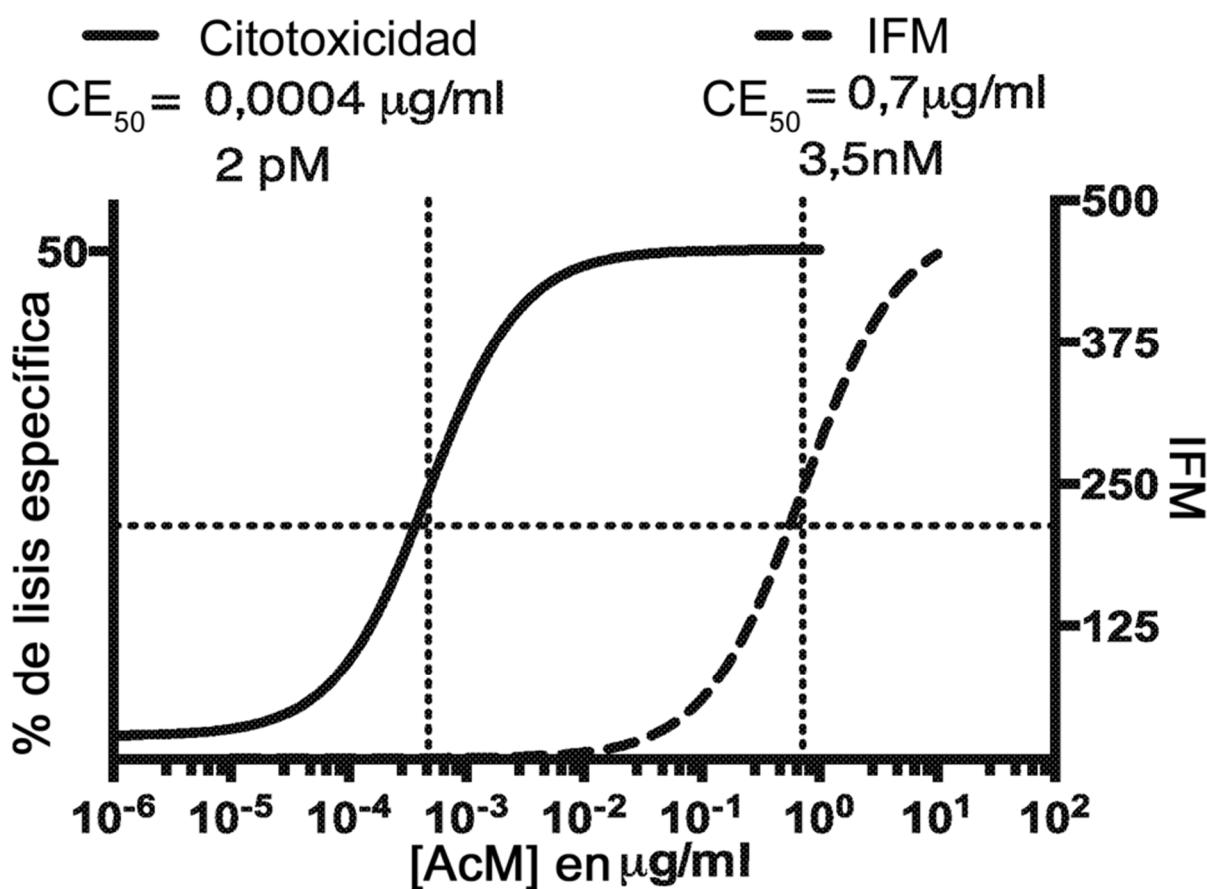


Fig. 6

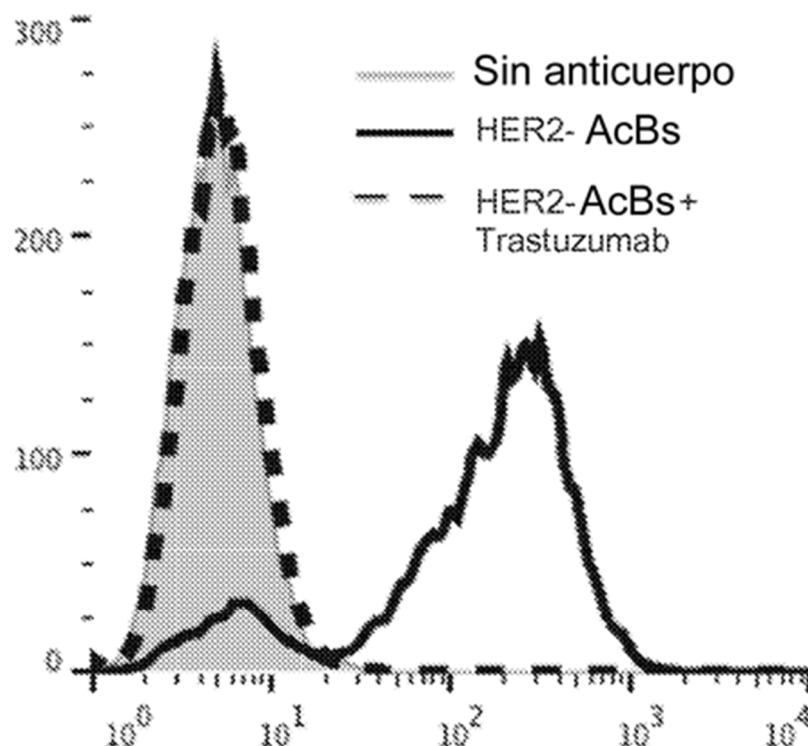


Fig. 7A

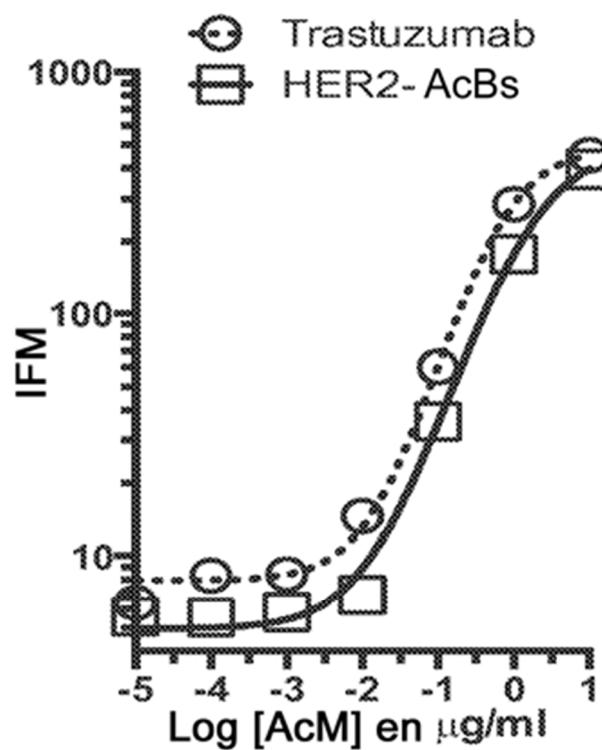


Fig. 7B

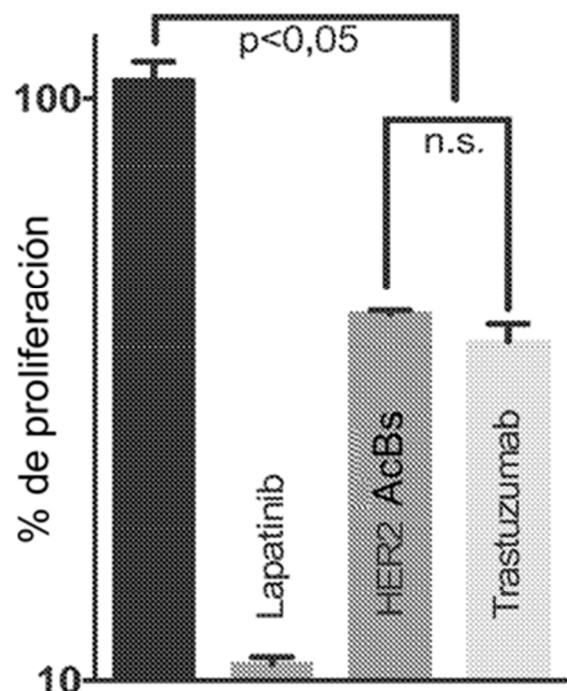
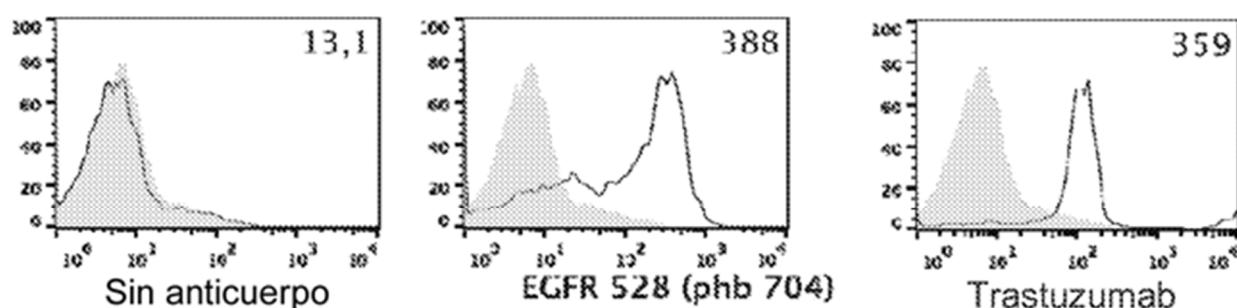
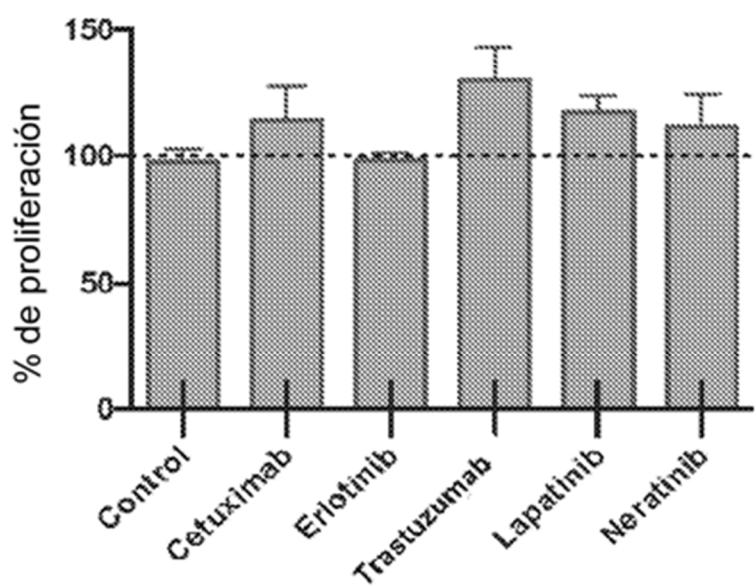
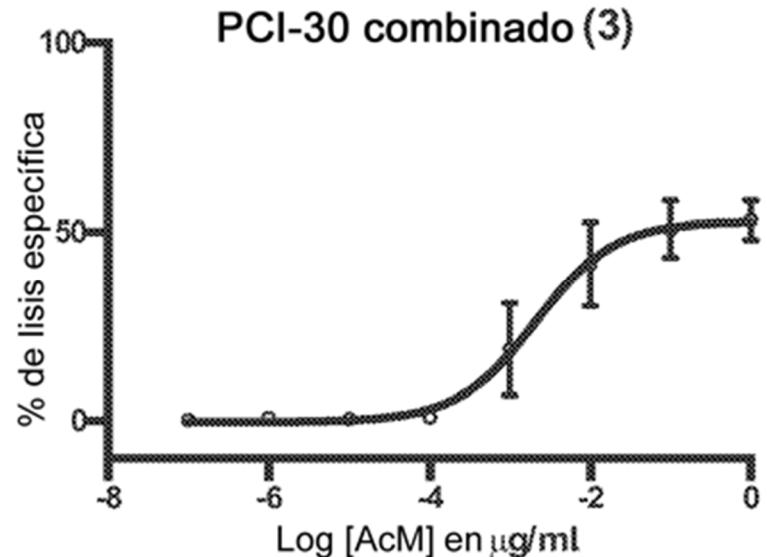


Fig. 7C

Líneas celulares de CCECC	% de lisis máx.	HER2 en flujo (IFM)	qPCR (con relación 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**

Lineas celulares de osteosarcoma	% de lisis máx.	HER2 en flujo (IFM)	qPCR (con rela- ción a MCF7)	Número de experimentos	CE50 ngs/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

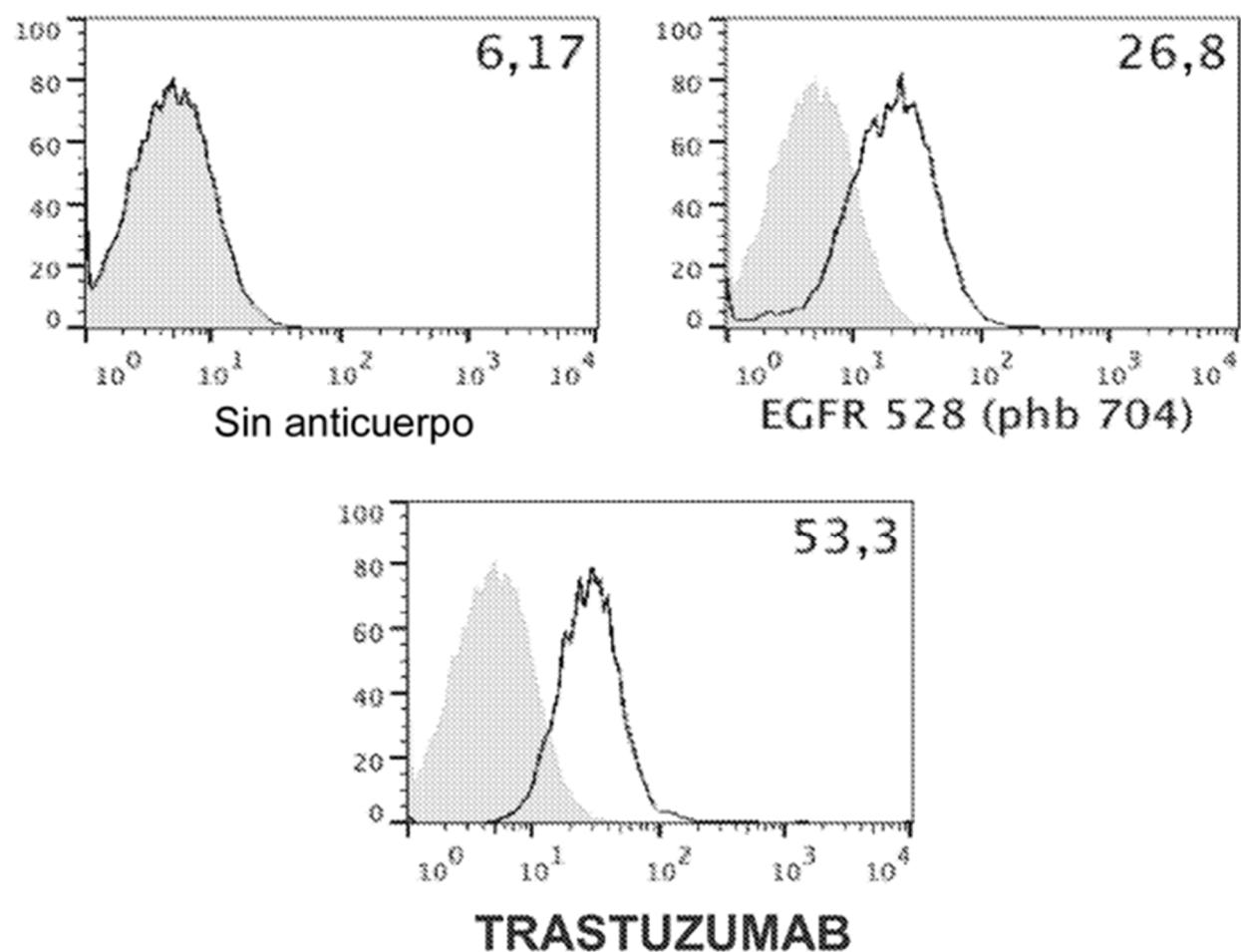
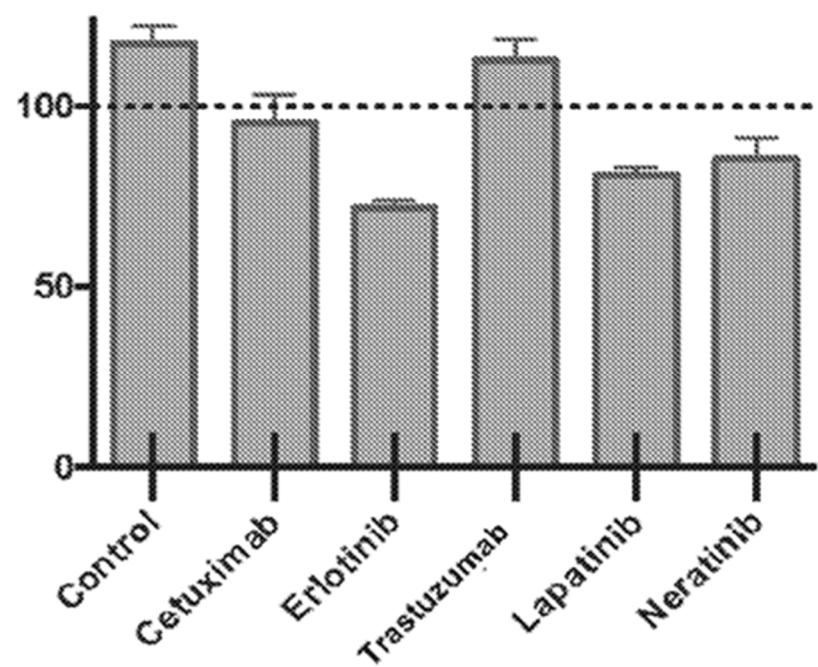
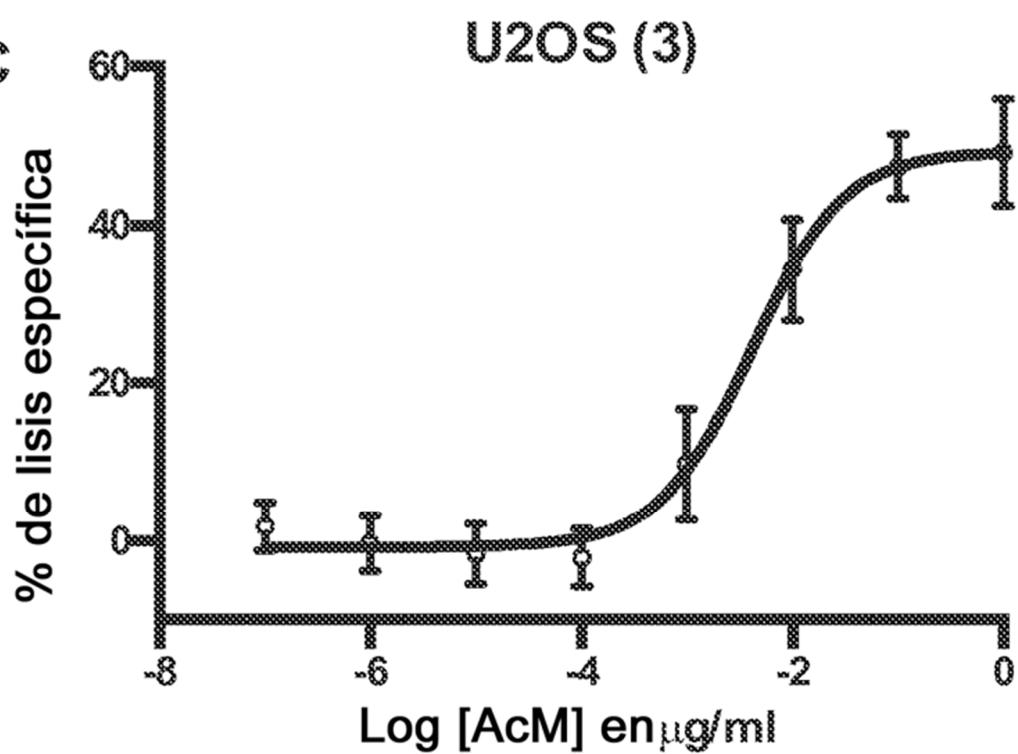
Fig. 11A**Fig. 11B**

Fig. 11C



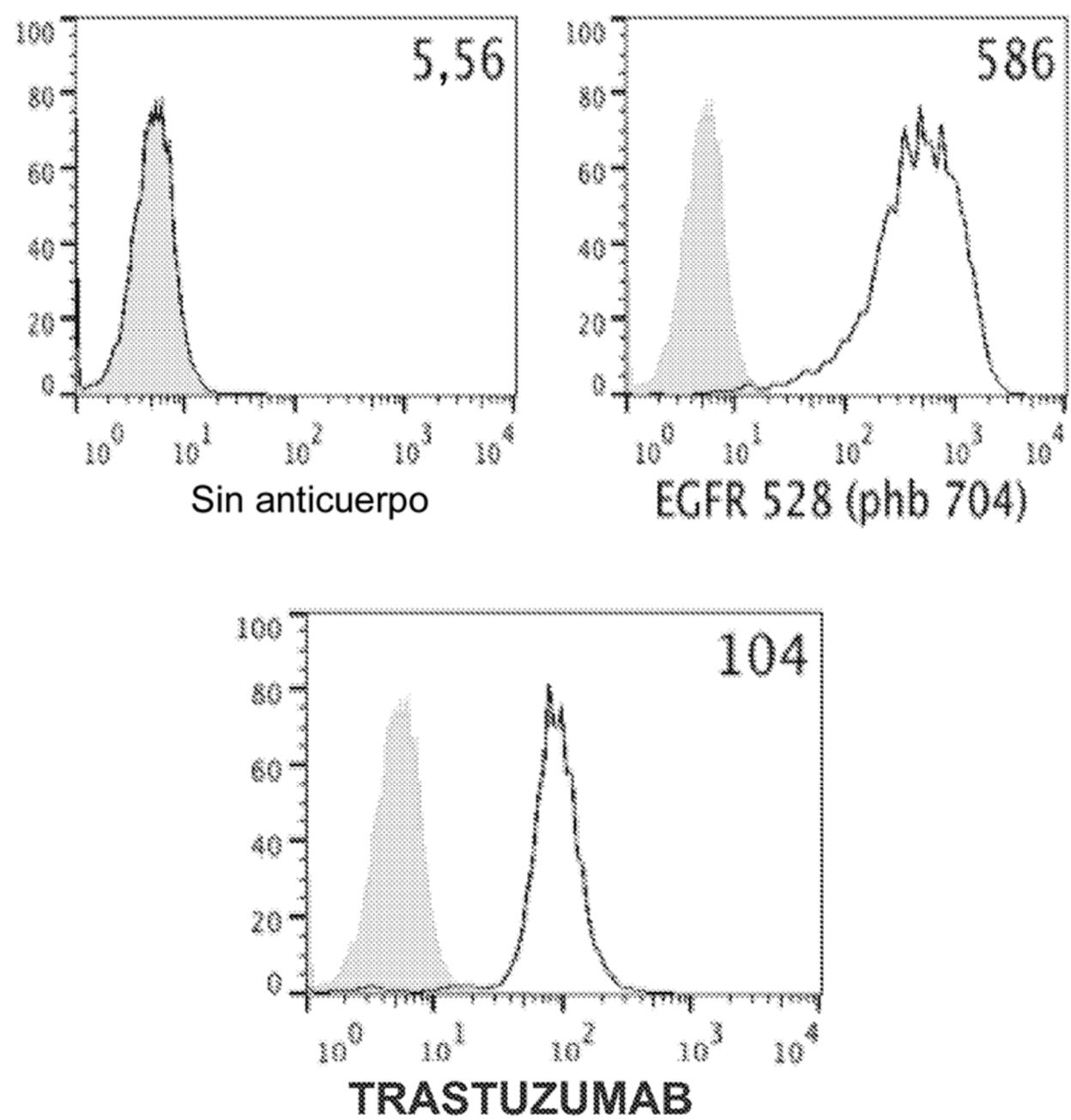


Fig. 12A

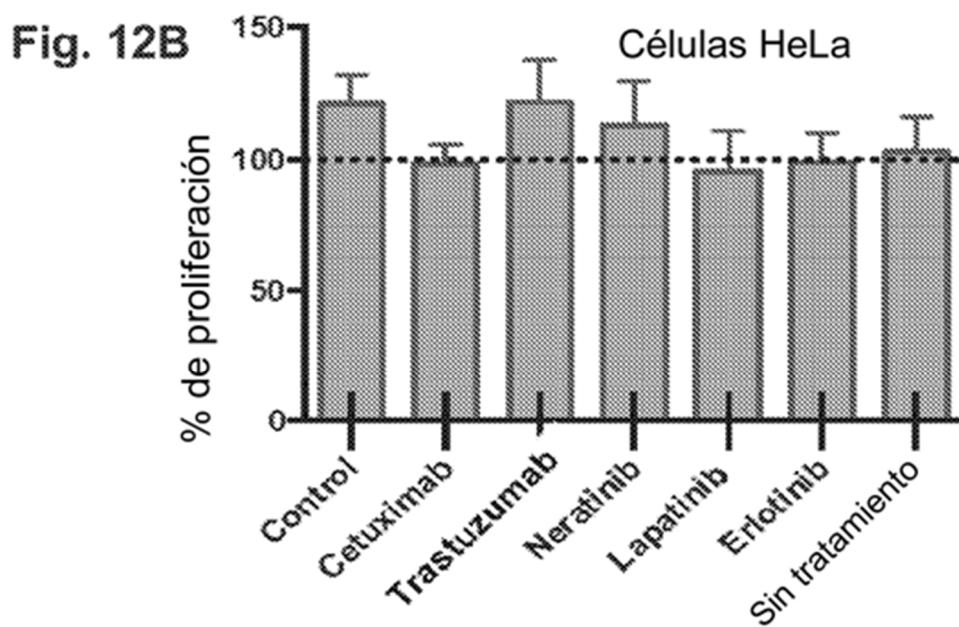


Fig. 12C AcBs + células T + células HeLa

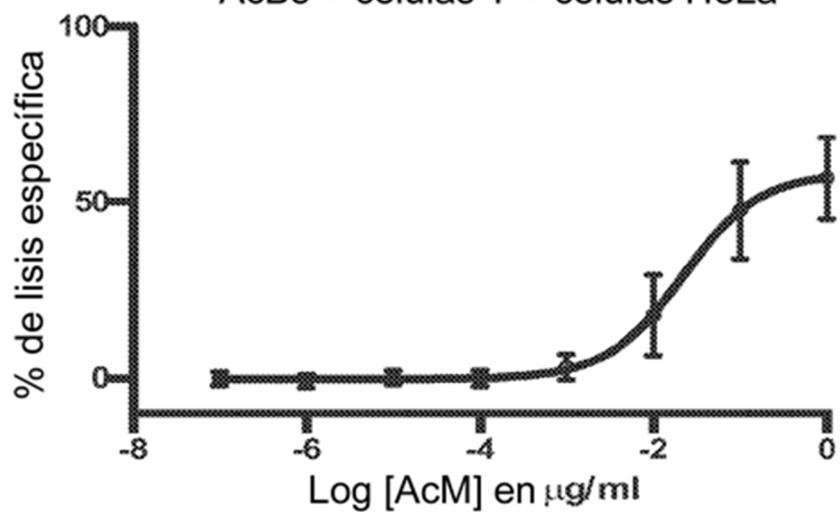
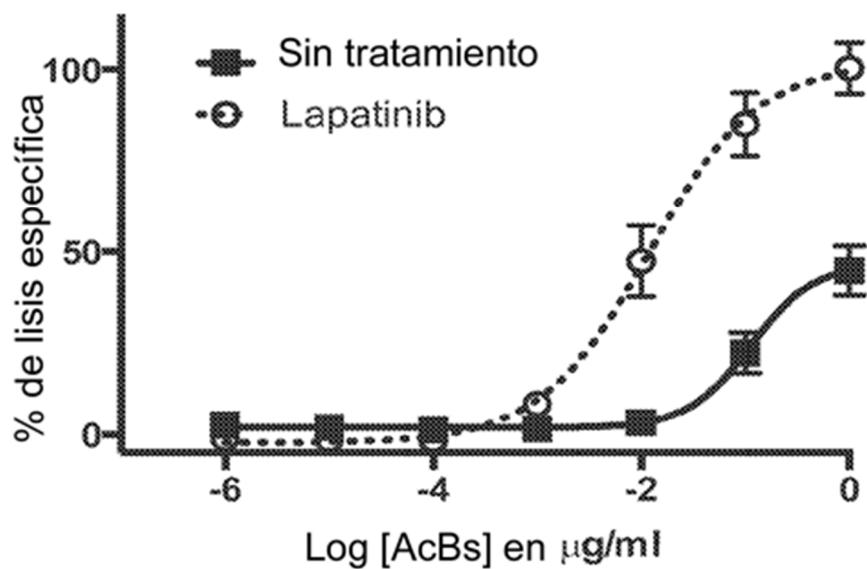


Fig. 12D



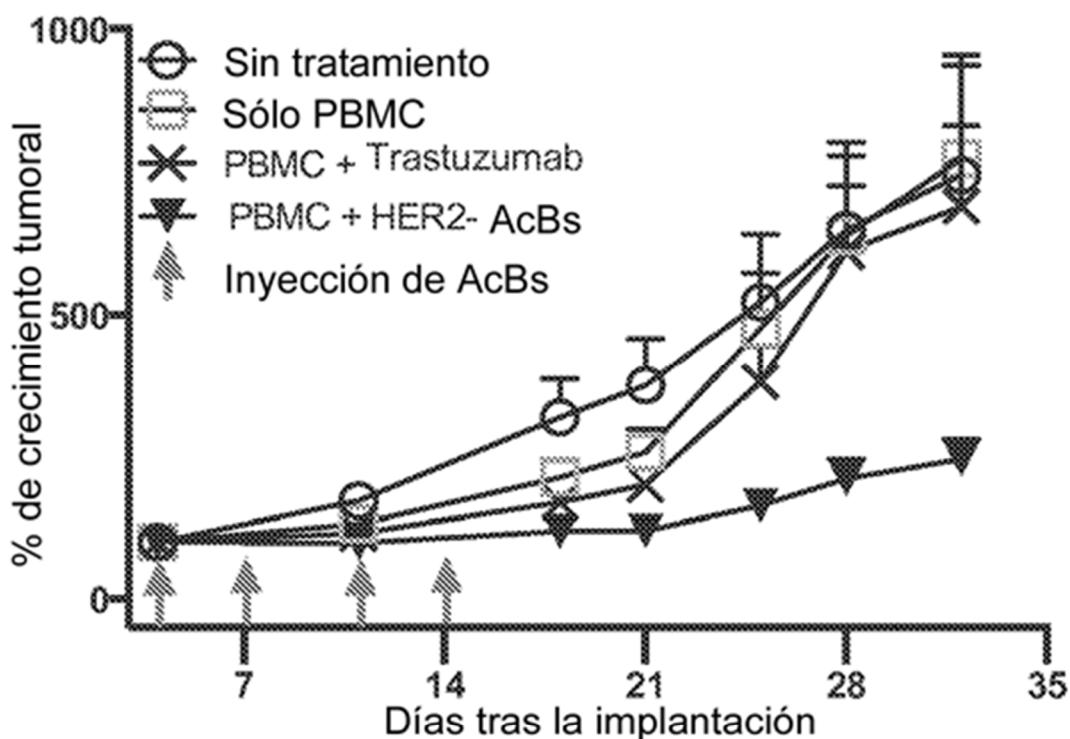


Fig. 13

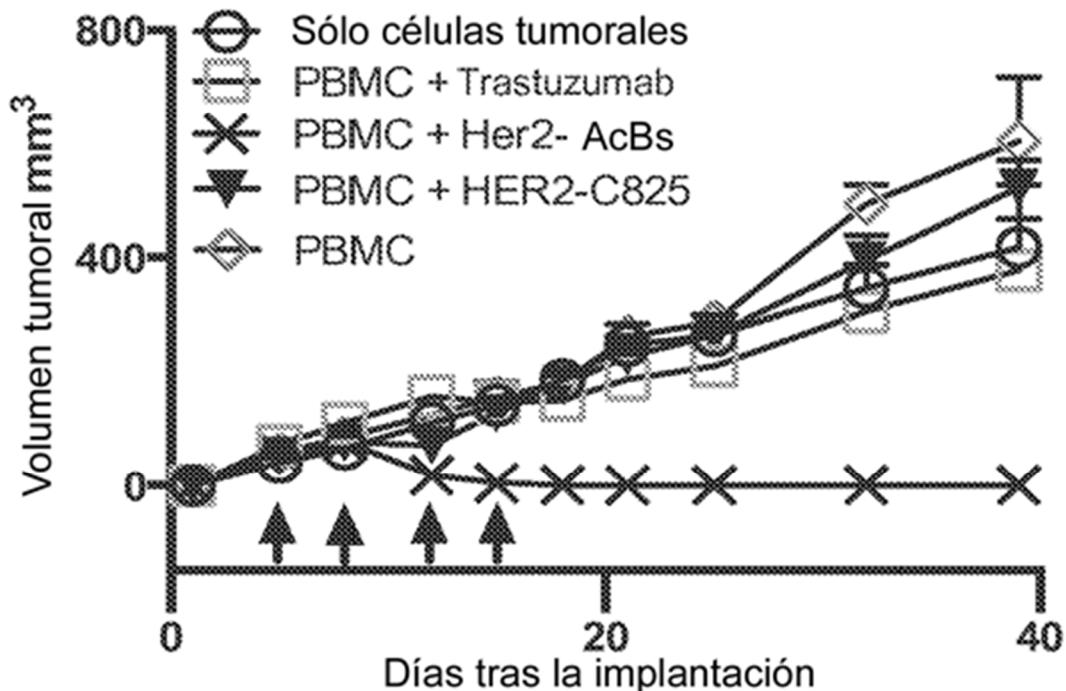


Fig. 14

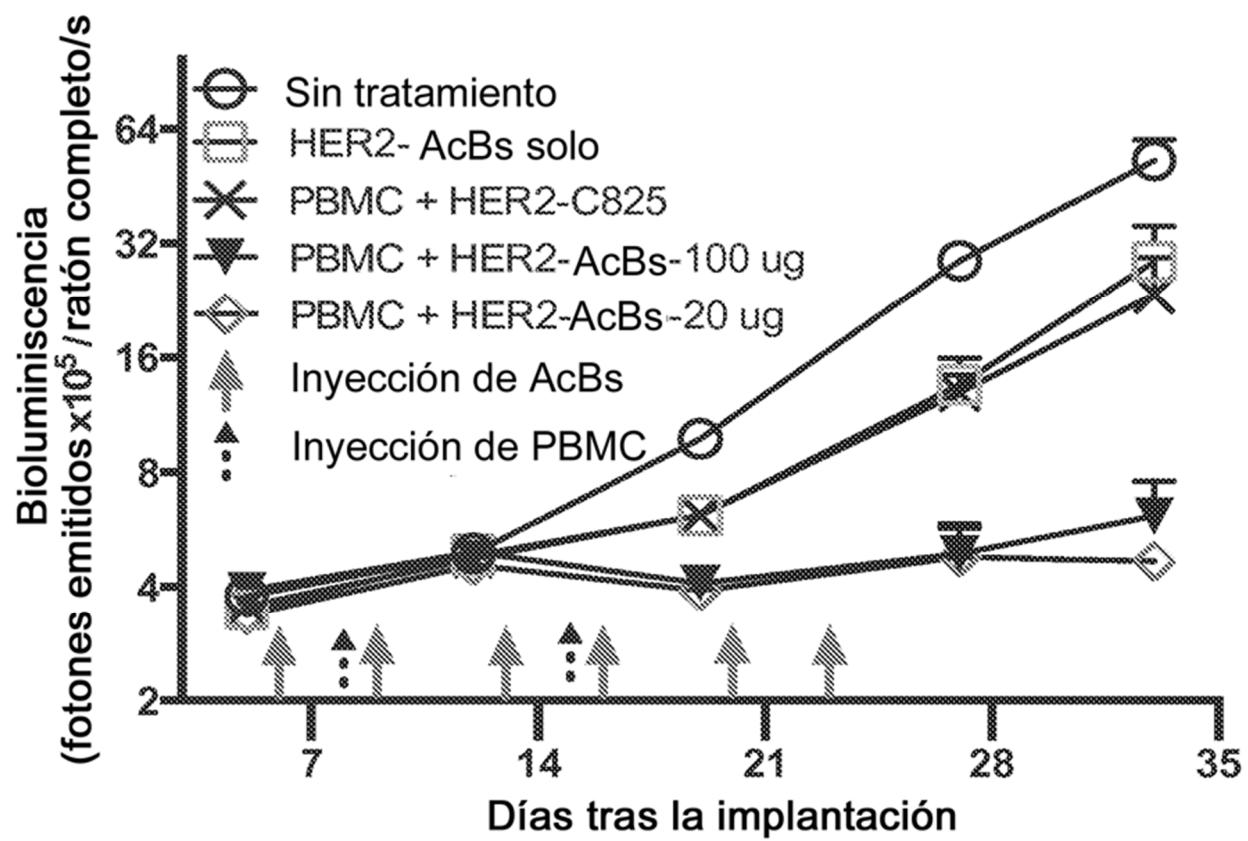


Fig. 15

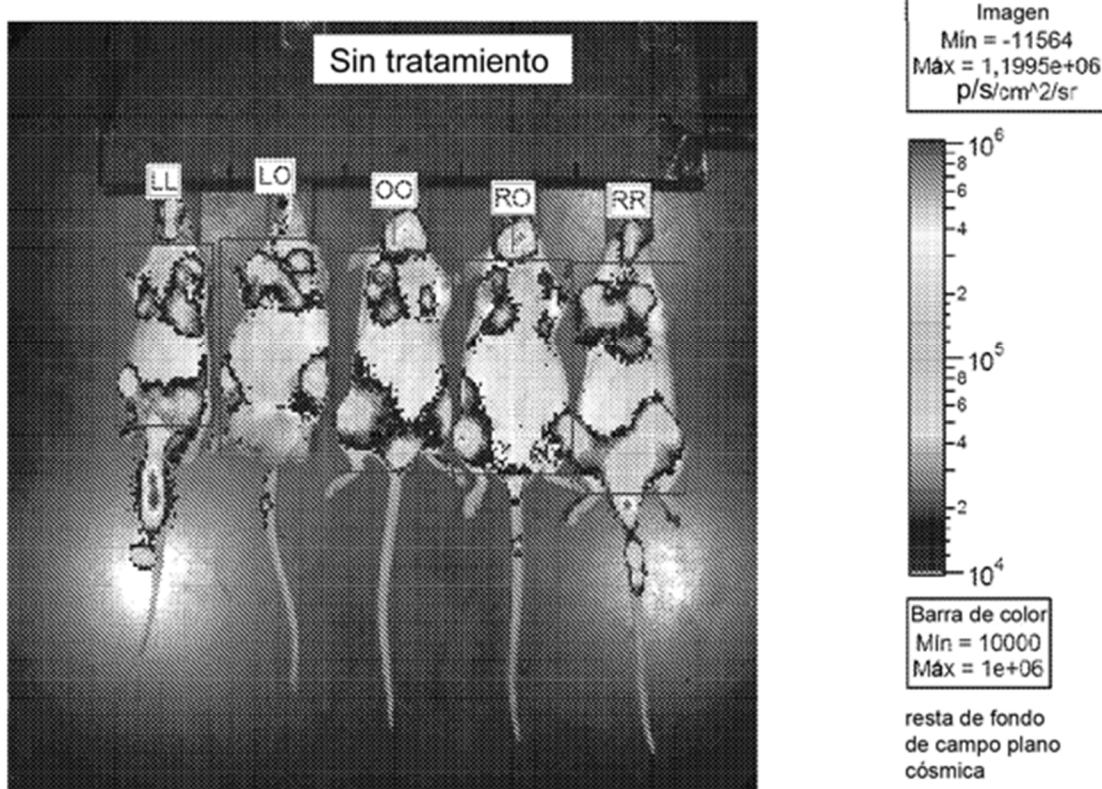


Fig. 16A

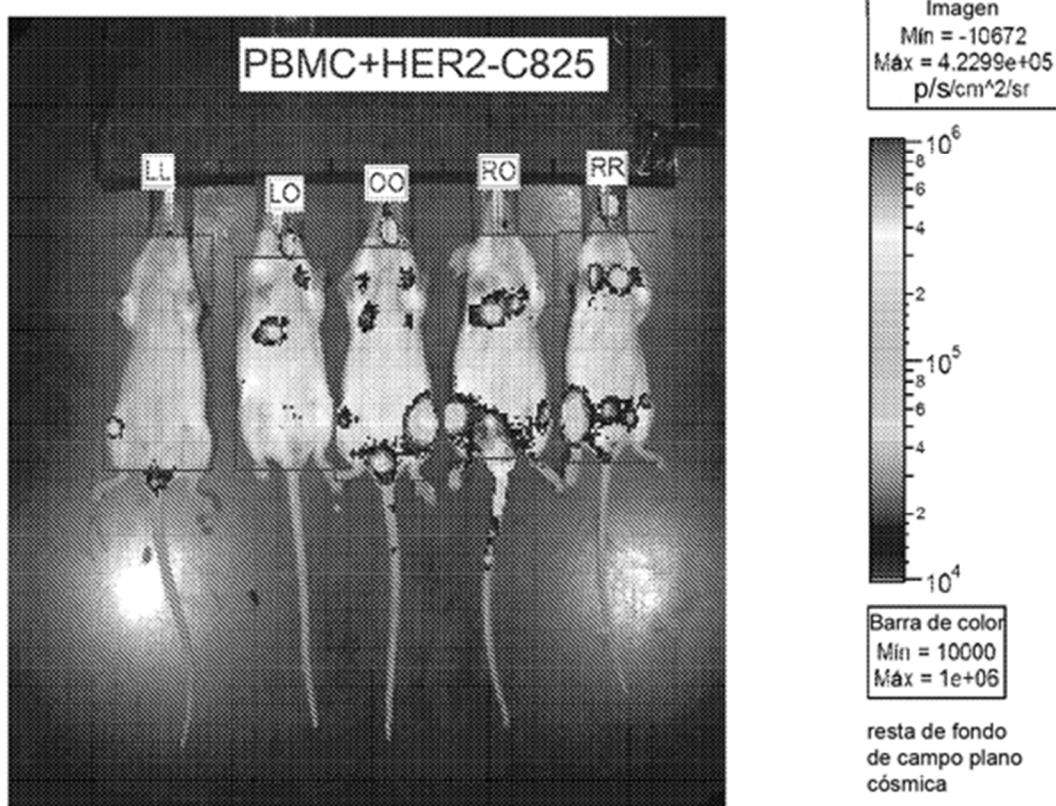


Fig. 16B

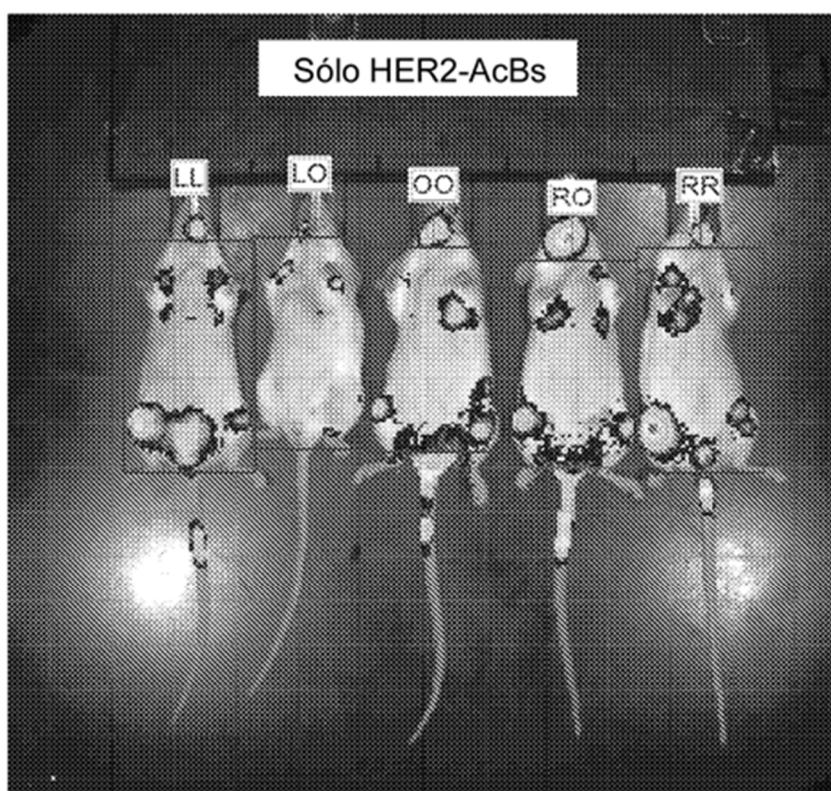


Fig. 16C

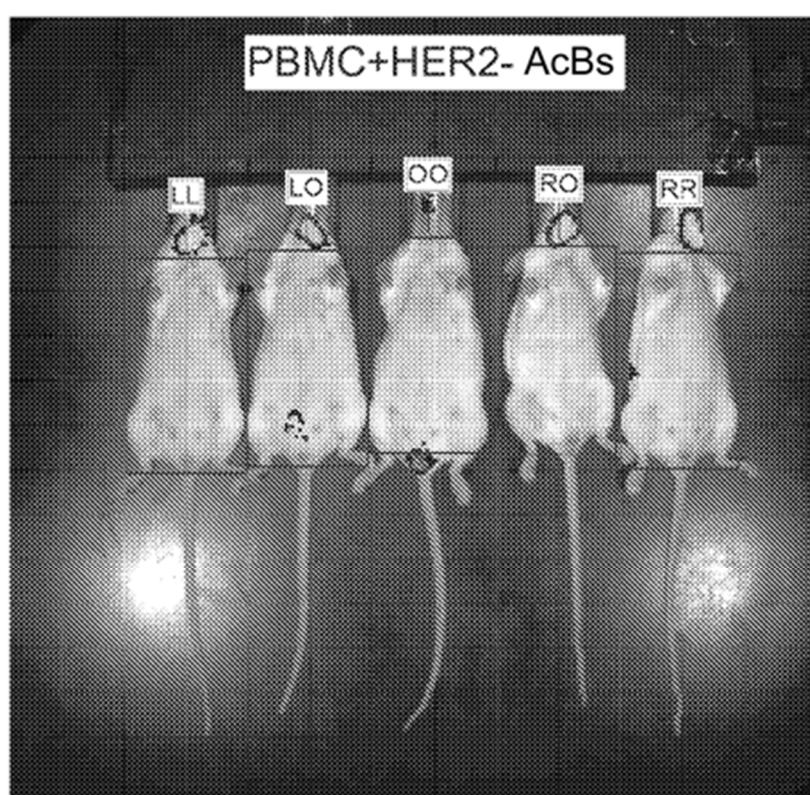


Fig. 16D

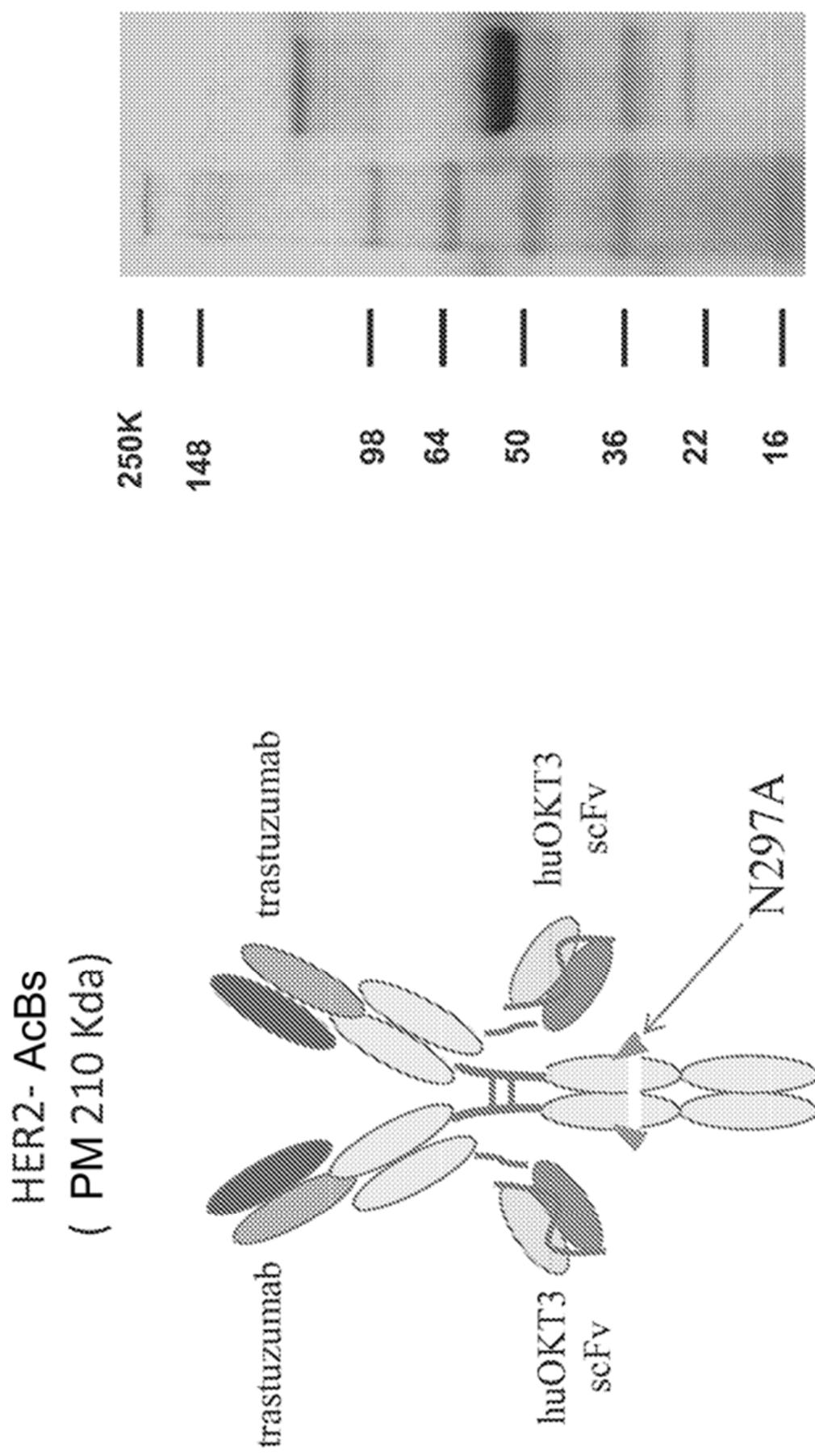


Fig. 17A

Fig. 17B

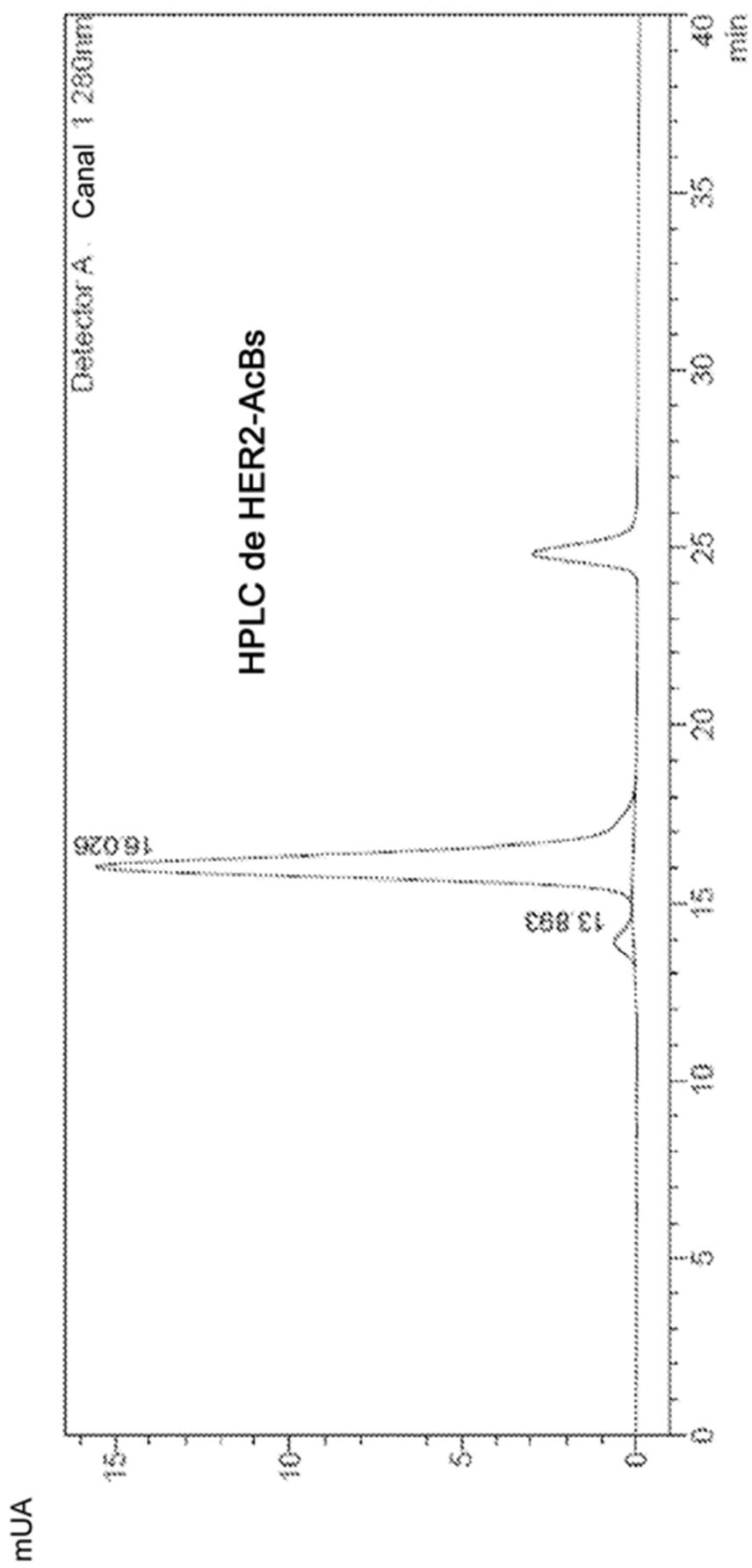
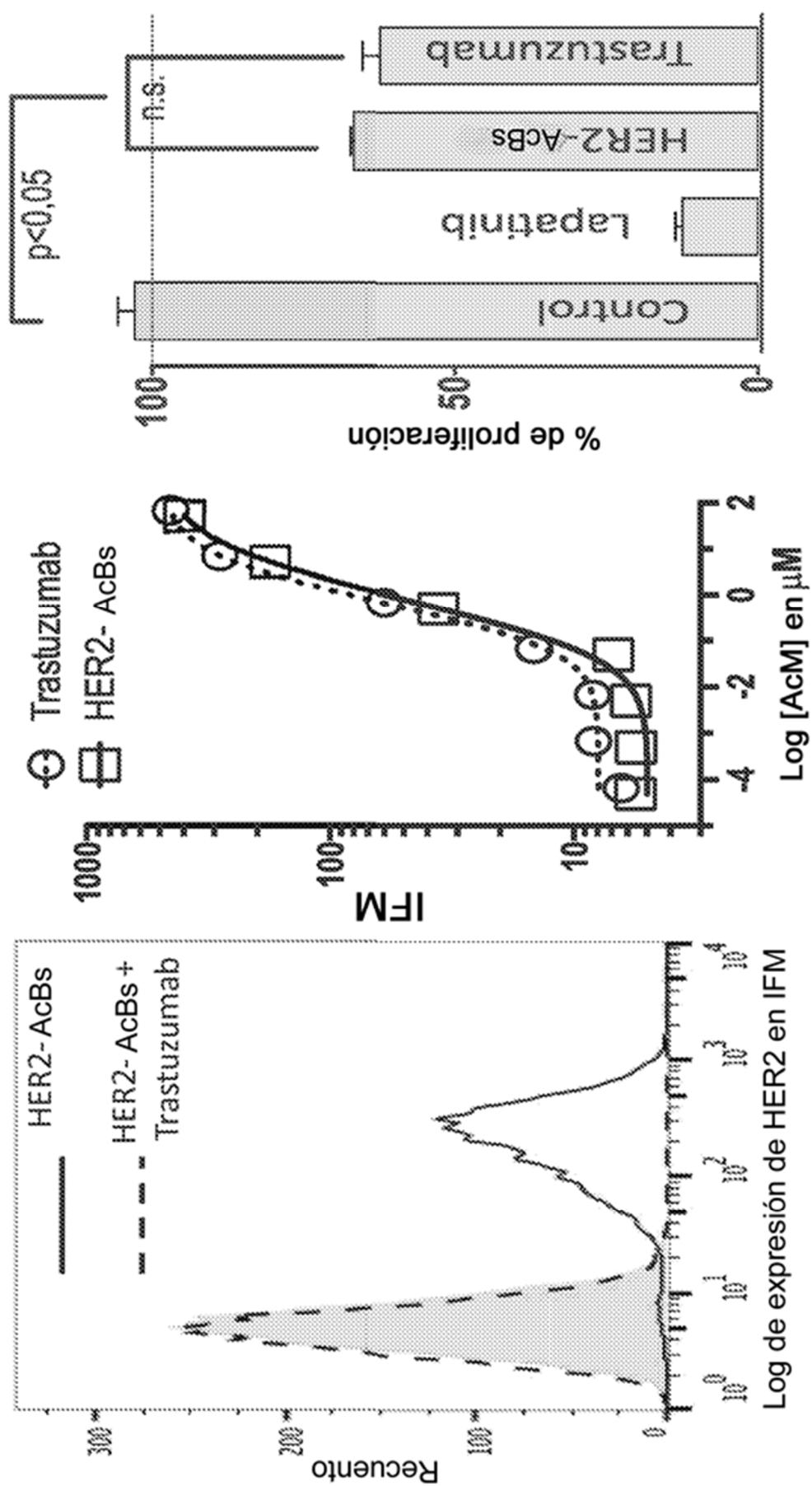


Fig. 17C



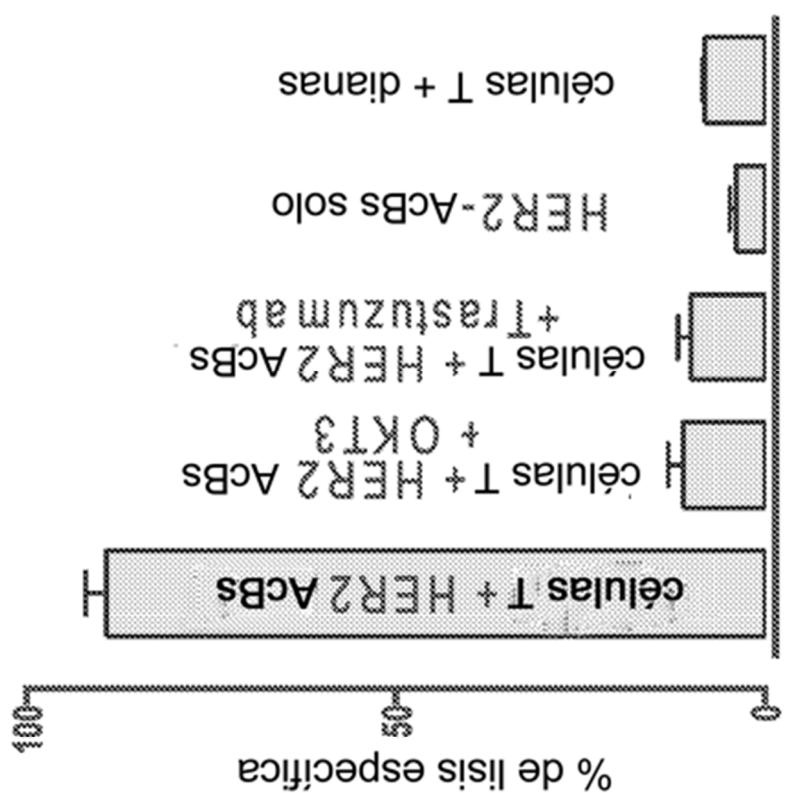


Fig. 19B

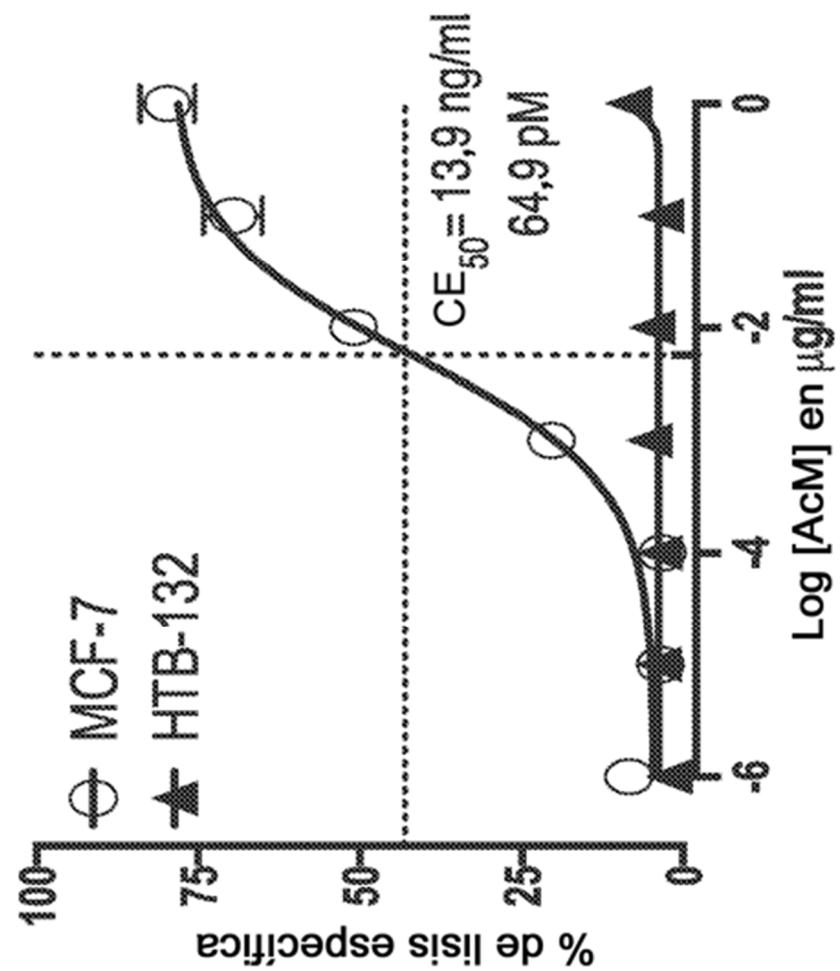
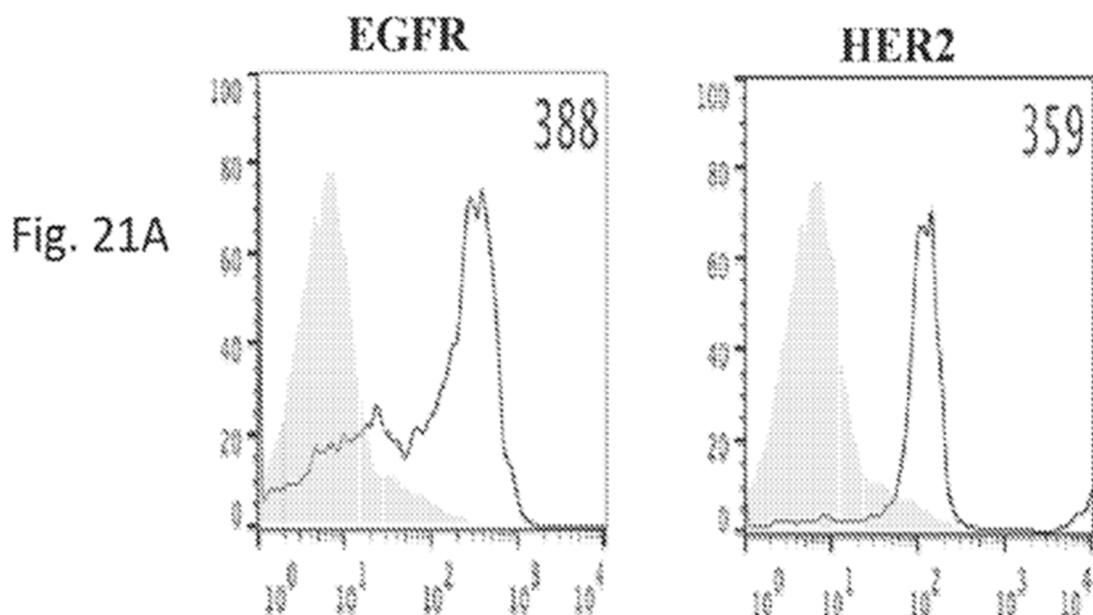
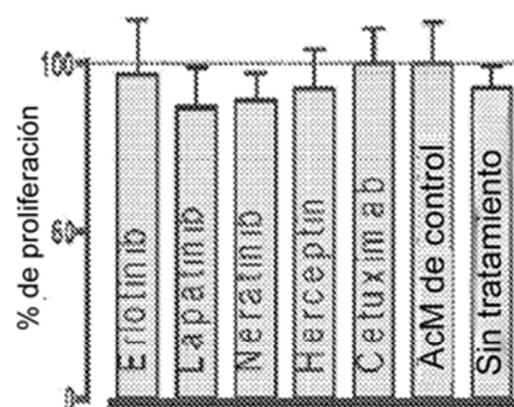
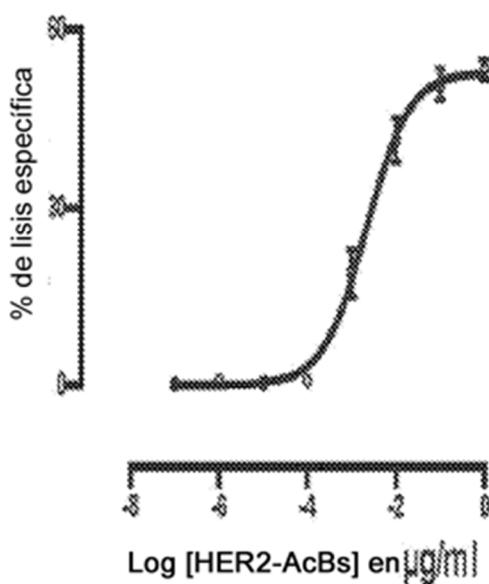


Fig. 19A

Tipo de tumor	Línea celular	Expresión de HER2 (IFM)	CE50(pM)
Cárcinoma de mama	AU565	1175	0,3
Cárcinoma de ovario	OVCAR3	183	1,8
Cárcinoma de mama	MDA-MB-361	777	2,5
Cárcinoma de ovario	SKOV3	1577	2,8
Melanoma	SKMEL28	190	3
Cárcinoma de mama	SKBR3	2506	4,1
Cárcinoma 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
Cárcinoma de mama	HTB-26	76	50,2
Cáncer de cabeza y cuello	15B	305	62,8
Cárcinoma de mama	MCF7	398	64,9
Cáncer de cuello uterino	HeLa	104	120,7
Melanoma	M14	57	130
Cárcinoma 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

**Fig. 21B****Fig. 21C**

Línea celular de carcinoma de mama HCC-1954

Fig. 21D

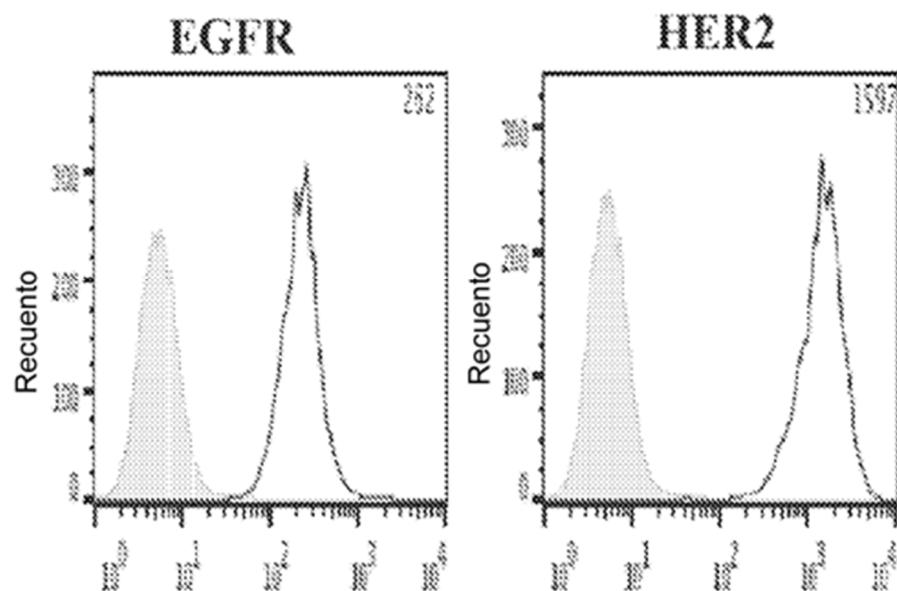


Fig. 21E

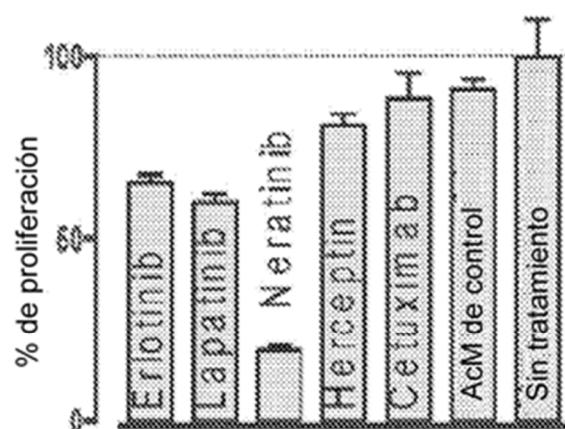
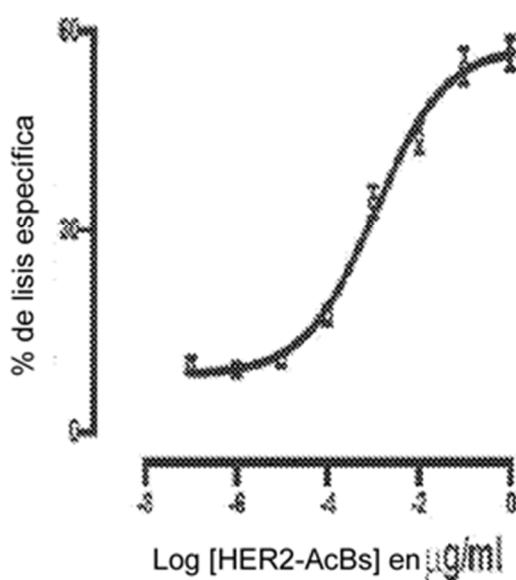
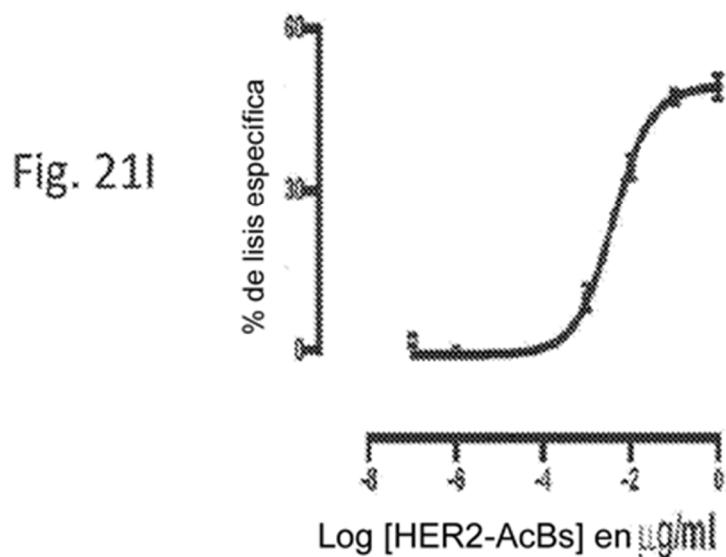
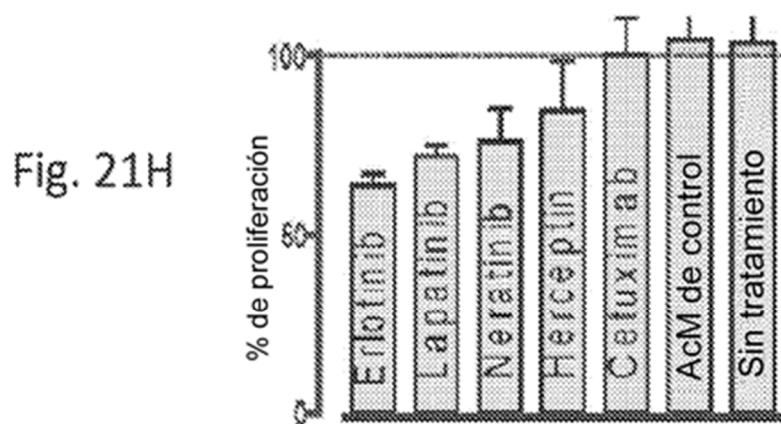
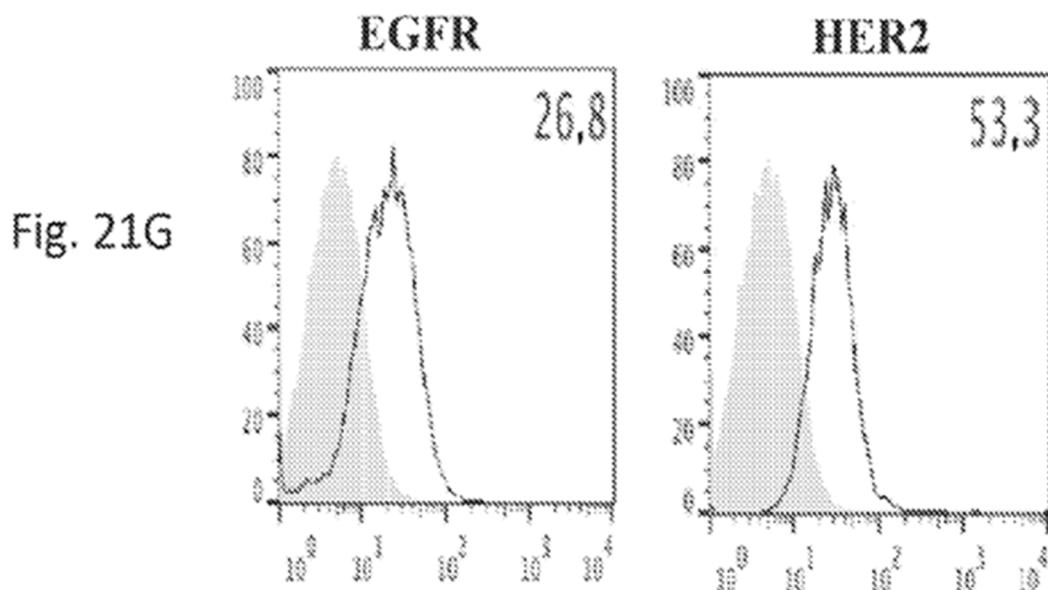


Fig. 21F



Línea celular de osteosarcoma U2OS



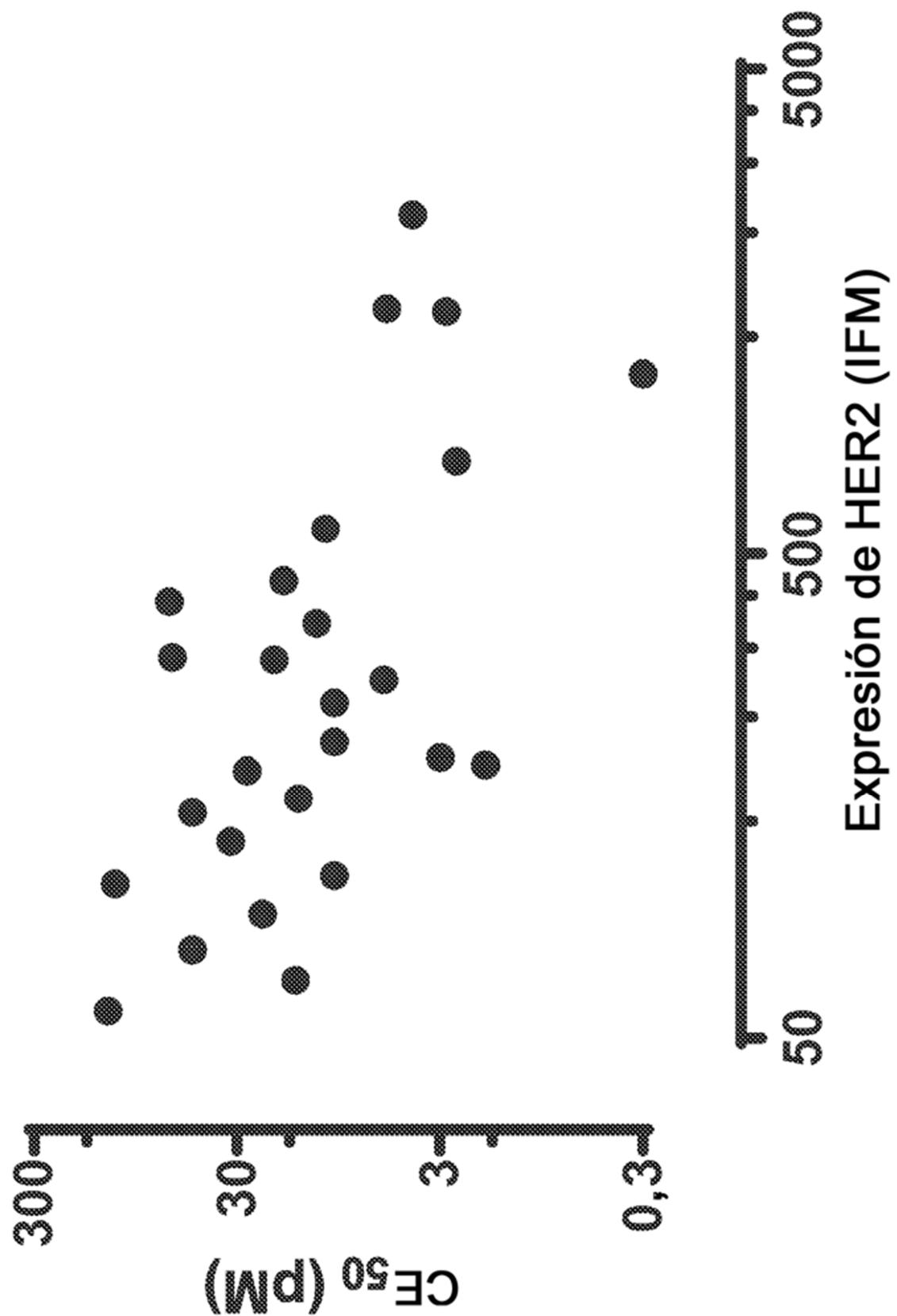
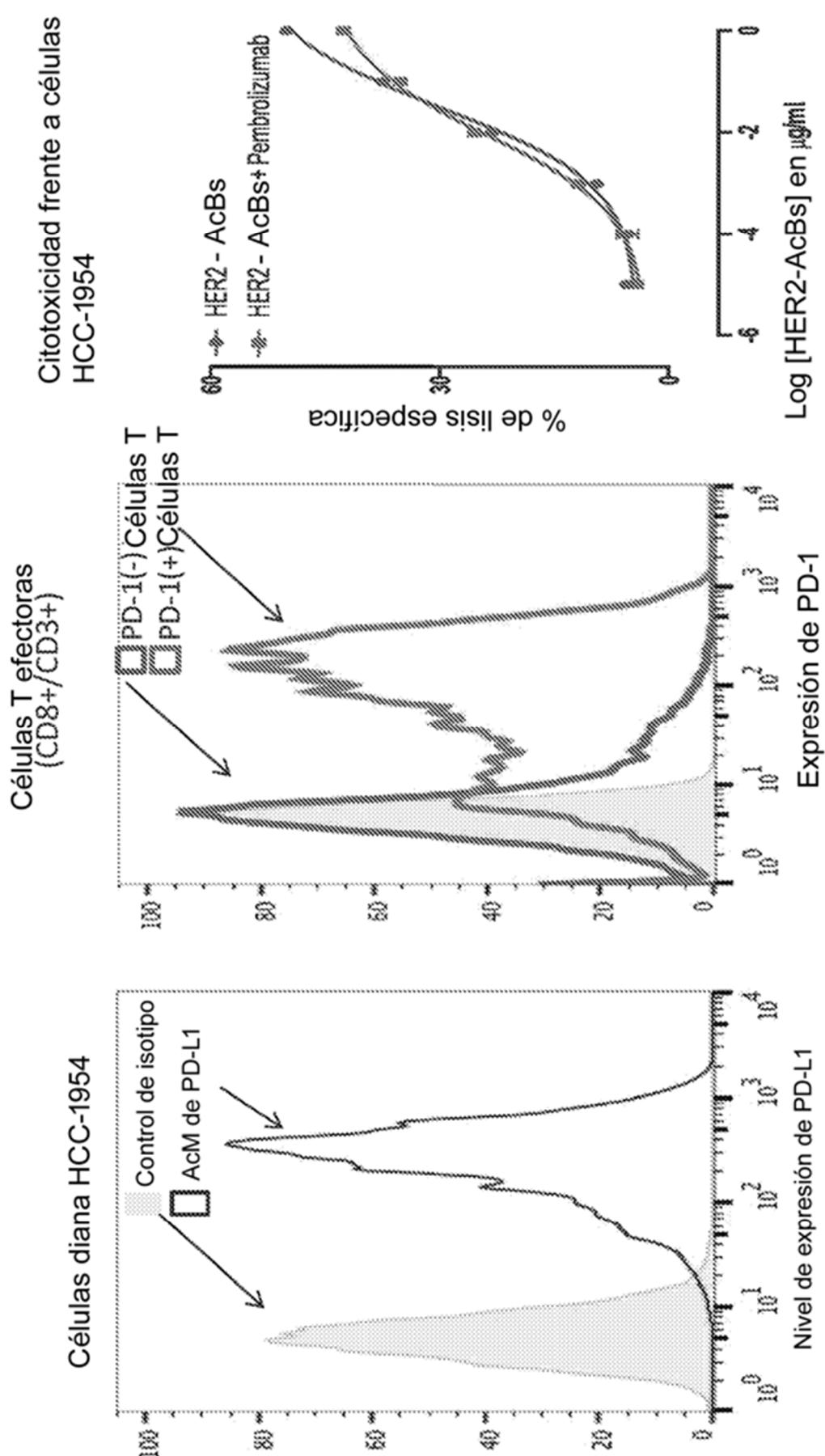


Fig. 22



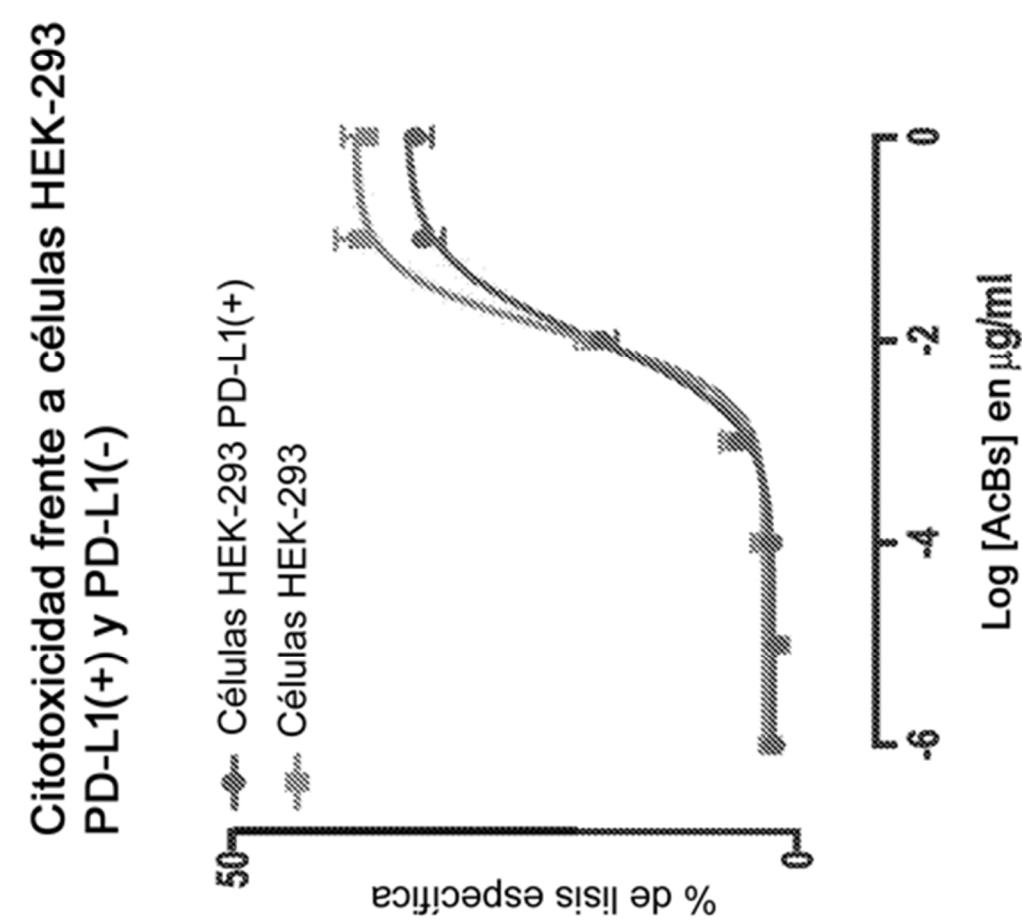


Fig. 24A

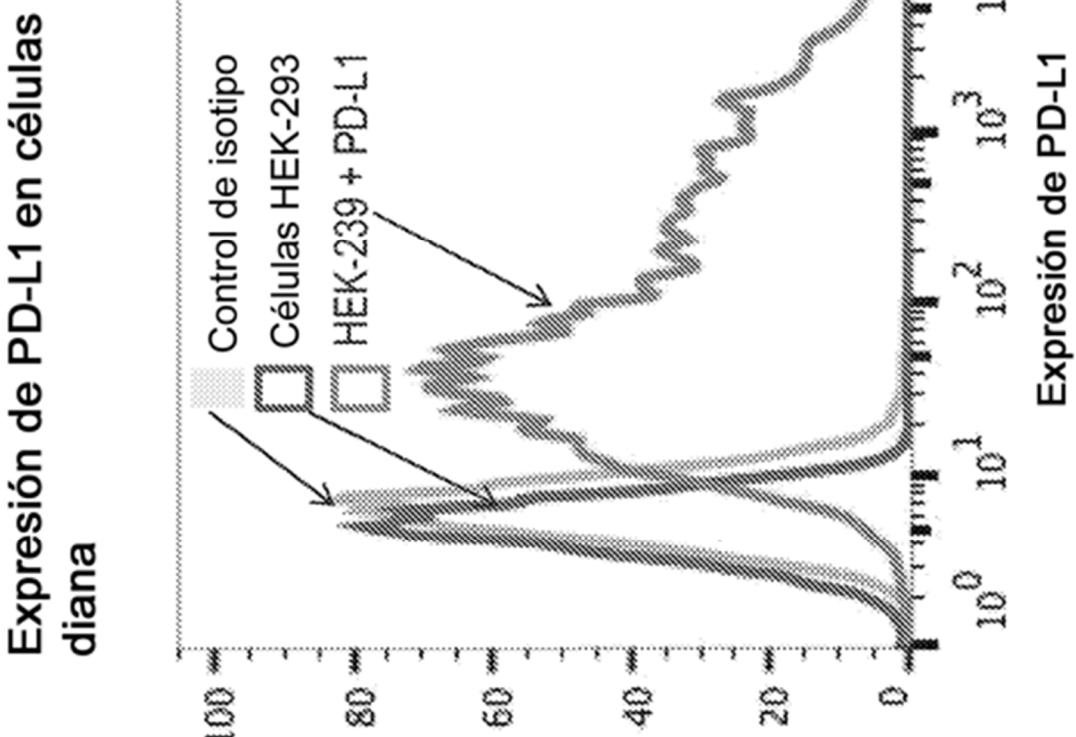


Fig. 24B

Células tumorales MCF7 s.c. + PBMC s.c. Células tumorales MCF7 i.v. + PBMC i.v.

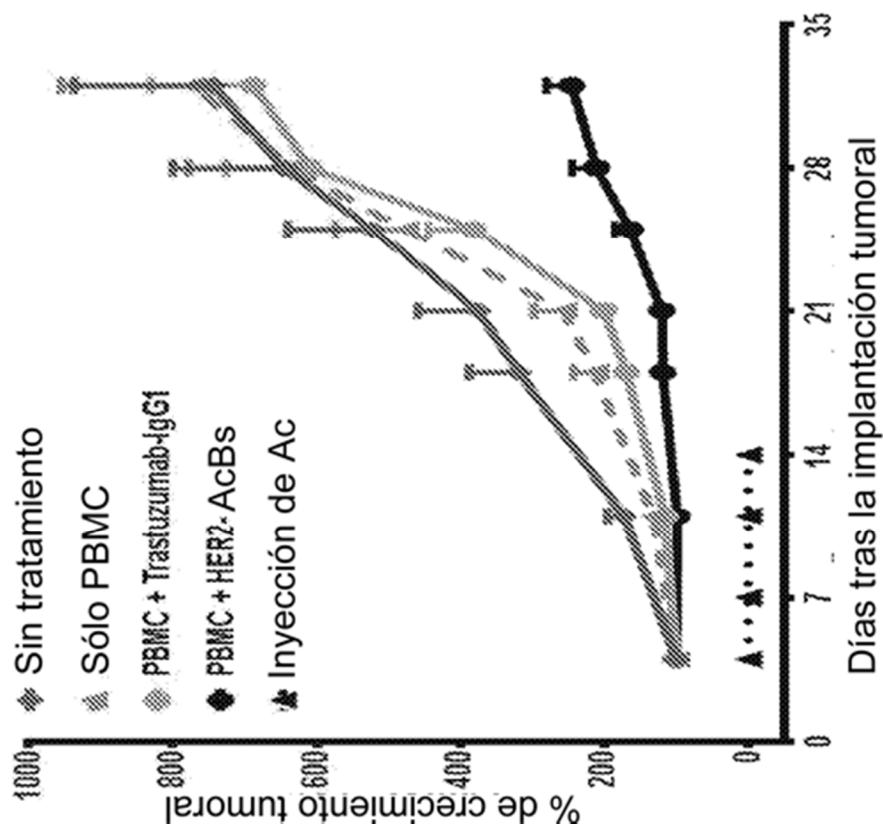


Fig. 25A

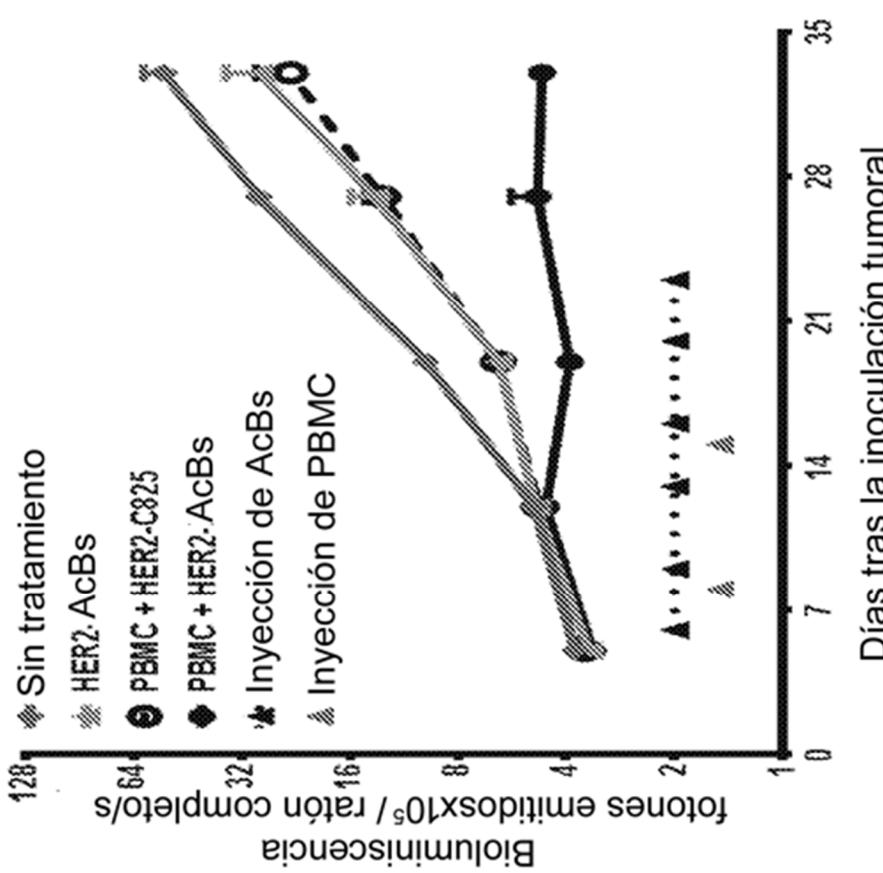


Fig. 25B

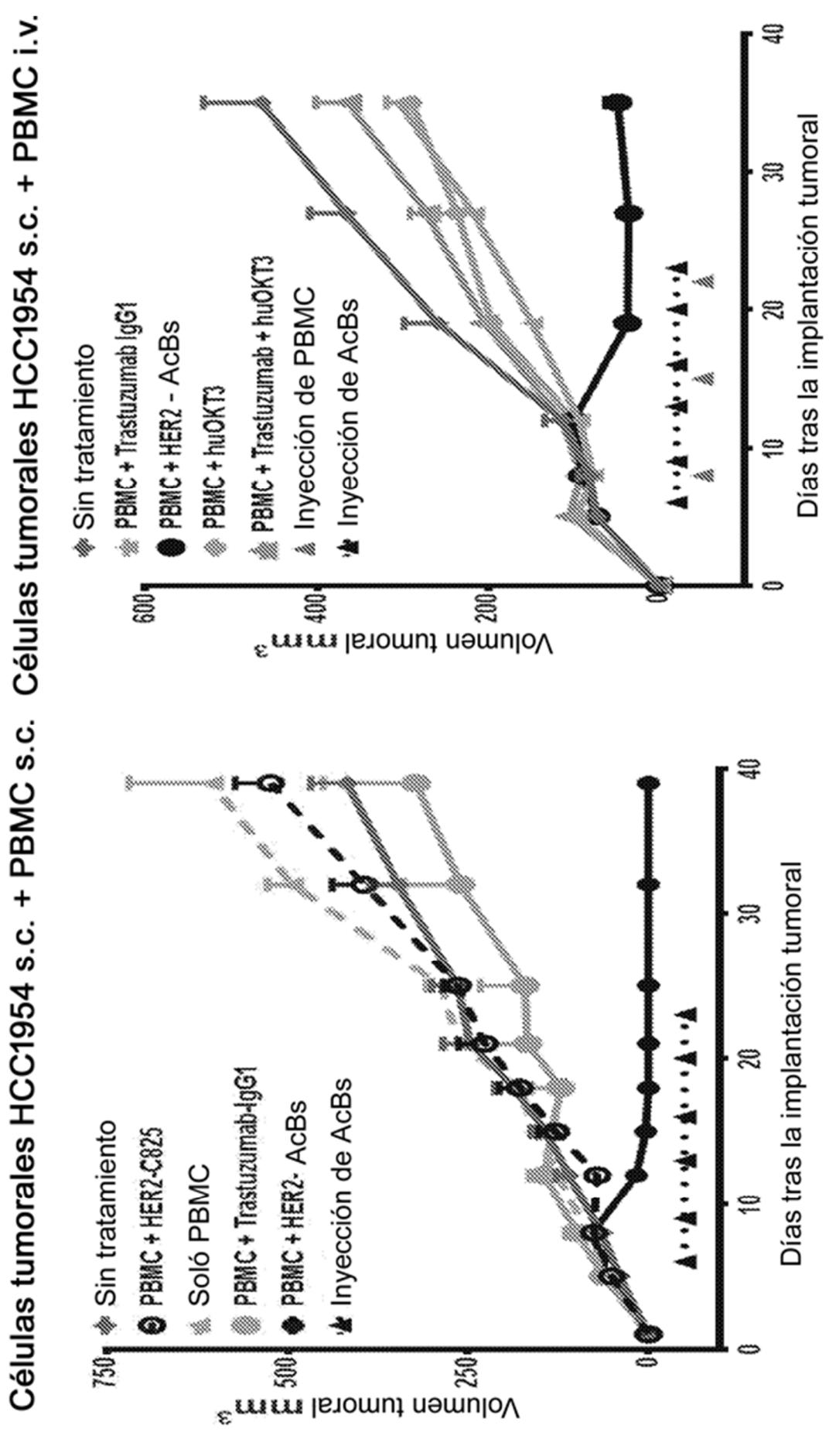


Fig. 25C

Fig. 25D