



No. 11-111960-00000-0000

Fecha: 2011-08-31 17:02:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 283



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-
ERBB-3/ANTI-C-MET"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/28**

71. SOLICITANTE **ROCHE GLYCART AG**

DOMICILIO **SCHLIEREN, SUIZA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **31 AGO 2011**

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-111960-00000-0000

Fecha: 2011-08-31 17:02:14

Tra. 11 PATENTE/II

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 283

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **ROCHE GLYCART AG.**

Dirección: Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Schlieren, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BOSSENMAIER, Birgit; BRINKMANN, Ulrich; LAU, Wilma; HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian; NIEDERFELLNER, Gerhard; SCHANZER, Juergen, Michael; STRACKE, Jan, Olaf; SUSTMANN, Claudio y UMANA, Pablo.

Dirección: Horst-Wolfram-Geissler-Weg 10, 82229 Seefeld; Feichtlstrasse 12, 82362 Weilheim; Rotbuchenstrasse 25, 81547 München; Kienbachstrasse 1B, D-82211 Herrsching a. Ammersee; Chruezacherweg 41, CH-8906 Bonstetten; Dorfstrasse 36b, 82386 Oberhausen; Auenstrasse 31, D-80469 München; Bruneckerstrasse 7, 81373 München; Penzberger Strasse 3, 81373 München y Felsenrainstrasse 28, CH-8832 Wollerau.

Nacionalidad o Domicilio: Alemania y Suiza.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/002005

Fecha: 30/03/10

Publicación Internacional No. WO 2010/115552 A1

Fecha: 14/10/10

⑥

Título (54)

"ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-ERBB-3/ANTI-C-MET"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

07/04/09

(31) Número de Solicitud

09005110.3

⑨

Comprobante de Pago No. 11-0078803

Fecha: 16 de Agosto de 2011

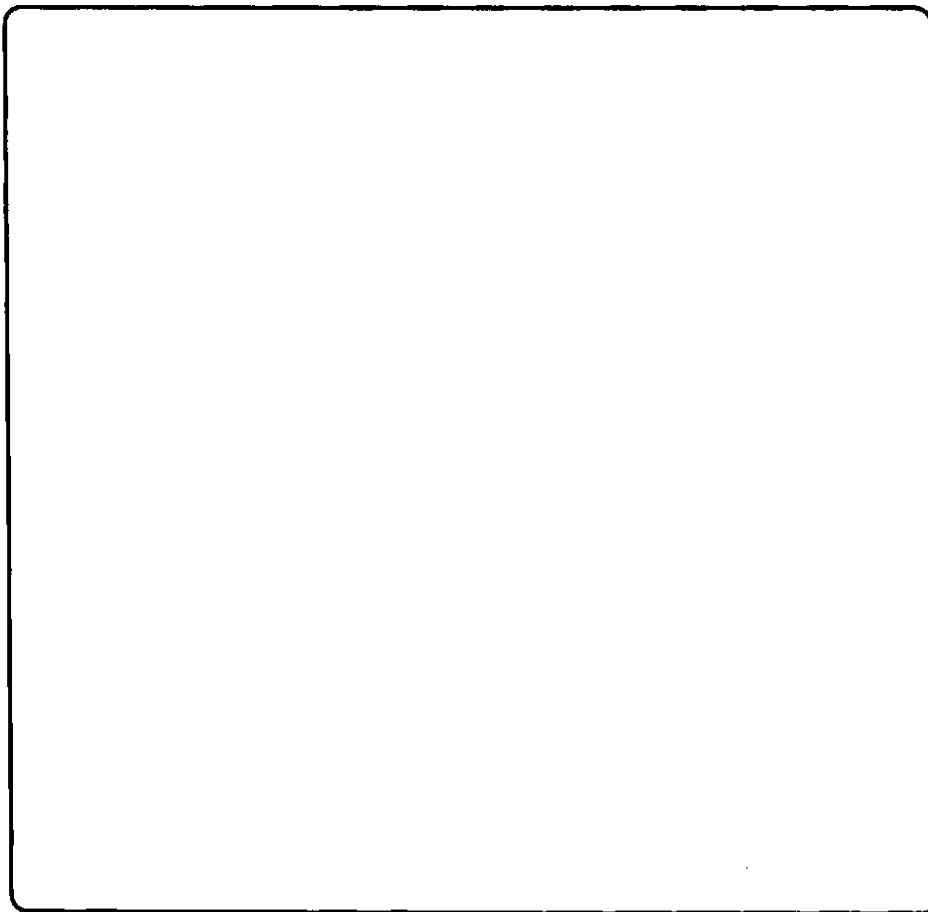
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional, publicación, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0078803
		Bogotá D.C., Agosto 16 de 2011 - 17:12:02

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	414999616	16/08/2011	35.583.500.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-111960- -00000-0000

Fecha: 2011-08-31 17:02:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 283

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 16 de 2011 - 17:12:14

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE ✓

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2011-05-23-341
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Legalización

El suscrito, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea (Suiza), Dr. Christoph Nertz, por el presente legaliza la firma de Roche Glycart AG, una sociedad anónima con domicilio en Schlieren (Suiza), prestada por

El señor Antonio Natoli, ciudadano y residente en Basilea (Suiza), y La Señora Susanne Amann, ciudadana alemana, residente en Heitersheim (Alemania), ambos debidamente facultados para firmar documentos donde la propiedad de la sociedad es alienada.

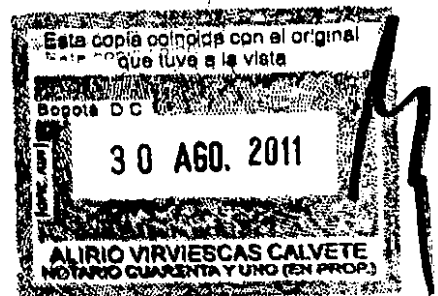
Personalmente conozco a los signatarios y las firmas.

Basilea (Suiza), este día 13 (trece) de abril de 2011 (dos mil once).

Sello.

(firma: ilegible)

BV 306/2011



APOSTILLA

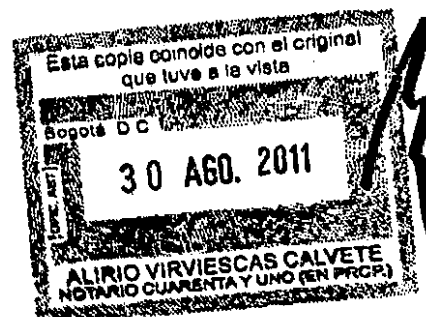
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Suiza
Este documento oficial
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como Notario Público
4. y certificado por el sello del anterior nombrado

Certificado

5. en Basilea
6. el 14 de abril de 2011
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. No. 2473 / 5209
9. Sello/Estampilla
Sello de la Cancillería de Estado
de la Ciudad de Basilea
10. Firma: (ilegible)
Hanna Lauener

PRODUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
[Firma]
ANITA L. DE TAMAYO



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TFYT

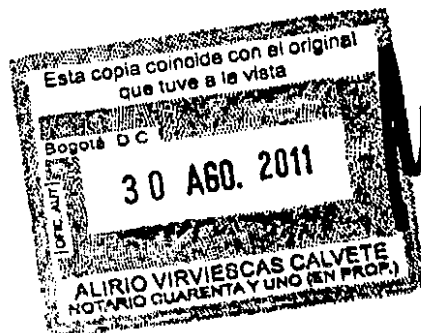
071152

Anta Escobar
CITA PARA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

MAY 26 A 6:50

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



Fotocopia fiel

CERTIFICACION

expedida por el Registro Comercial del Cantón de Zurich

Por el presente certifico que la sociedad anterior está registrada en el Registro Comercial del Cantón de Zurich; una sociedad en comandita por acciones de nombre

Roche Glycart AG-----
(Roche Glycart Ltd)-----
domiciliada en Schlieren-----
Dirección: Wagistrasse 18, 8952 Schlieren-----

Esta sociedad ha sido registrada en el Registro Comercial del Cantón de Zurich el 18 de septiembre de 2000. Ha sido registrada en el registro mencionado bajo las siguientes versiones:

Del 18 de septiembre de 2000 – 21 de marzo de 2001

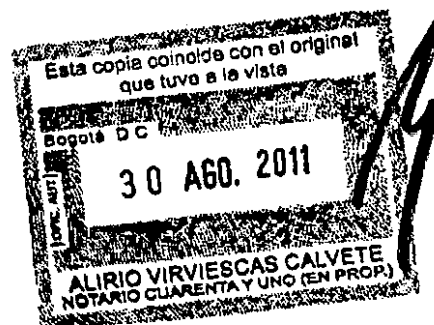
GlycArt Biotechnology GmbH-----
(GlycArt Biotechnology Ltd liab. Co)-----

Con registro en el diario no. 7749 el 21 de marzo de 2001, el siguiente registro fue publicado en la Gaceta Comercial Oficial de Suiza (SHAB), no. 60 el 27 de marzo de 2001:

Comentarios: En la asamblea de accionistas el 16.03.2001, se resolvió que el capital accionario se pagara completamente, que se podía aumentar en CHF 20,000.00 a CHF 100,000.00, y que GlycArt Biotechnology GmbH se transformara en una sociedad incluida en una lista pública. La Sociedad continuará comercializando sus activos y pasivos según la hoja del balance del 31.12.2000, sin haber sido liquidada.

Del 21 de marzo de 2001 – 20 de noviembre de 2003

(JLLCCO: 288669.DOC v.1) 3



GlycArt Biotechnology AG-----

(GlycArt Biotechnology Ltd)-----

Del 20 de noviembre de 2003 – 23 de diciembre de 2009

GlycArt Biotechnology AG-----

(GlycArt Biotechnology Ltd)-----

Ha sido registrada el 23 de diciembre de 2009 bajo el siguiente nombre:

Roche Glycart AG-----

(Roche Glycart Ltd)-----

Además certifico que la sociedad mencionada está organizada de conformidad con las leyes de Suiza.

El Registro Comercial del Cantón de Zurich no puede ofrecer ninguna garantía en cuanto a la fidelidad de la traducción del texto original en alemán de este registro en el Registro Comercial.

Zurich, Suiza, 28 de junio de 2010

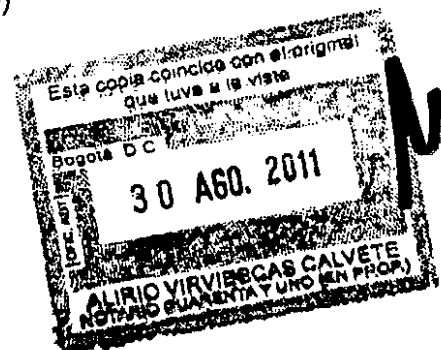
Número de la sociedad: CH-020.4.333-11

Firmado: HI

Derechos: CHF 180.--

Sello

(firma: ilegible)



Basilea (Suiza), este día 13 (trece) de julio de 2010 (dos mil diez).

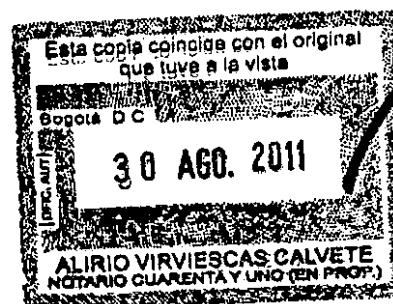
Oblea Notarial
BV 165/2010

(firma: ilegible)

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Suiza
Este documento oficial
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como Notario Público
4. y certificado por el sello del anterior nombrado



Certificado

5. en Basilea
6. el 4 de mayo de 2011
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. No. 2855 / 6082
9. Sello/Estampilla
Sello de la Cancillería de Estado
de la Ciudad de Basilea
10. Firma: (ilegible)
Hanna Lauener

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 24 de mayo de 2011, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

Anita Escobar de Tamayo

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TFXTO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

071152

MAY 26 A 6:50

Anta Escobar -
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



Los abajo firmados,

Roche Glycart AG

con domicilio en

Wagistrasse 18
CH-8952 Schlieren (Suiza)

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned,

Roche Glycart AG

domiciled at

Wagistrasse 18
CH-8952 Schlieren (Switzerland)

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

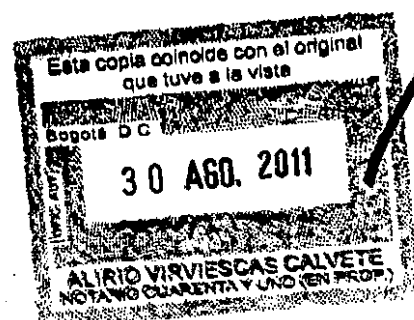
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 12th day of April 2011.

Roche Glycart AG

Antonio Natoli
Antonio Natoli
Susanne Amann
Susanne Amann
authorized signatories



Legalization

The undersigned Notary Public of the Canton of Basel-Stadt (Switzerland), Dr. Christoph Nertz, herewith legalizes the overleaf signature

of Roche Glycart AG, a stock company with legal domicile in Schlieren (Switzerland), rendered by

Mister Antonio Natoli, citizen of and residing in Basel (Switzerland), and

Miss Susanne Amann, German citizen, residing in Heitersheim (Germany),

both duly entitled also to sign documents wherein property of the company is alienated.

Signers and signatures personally known.

Basel (Switzerland), this 13th (thirteenth) day of April 2011 (two thousand and eleven).



Dr. Christoph Nertz

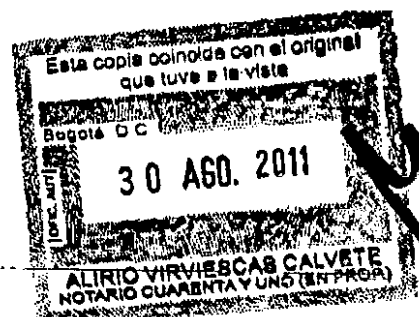
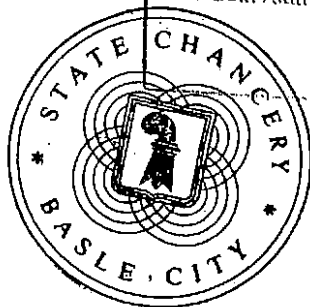
BV 306/2011

APOSTILLE
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
This official document
2. is signed by *Dr. Christoph Nertz*
3. in his/her function as *notary public*
4. and certified by the seal of the *above mentioned*

Certified

5. in Basel (Bâle)
6. on *14. April 2011*
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt
8. no. *2473 / 5209*
9. Seal / stamp:
10. Signature: *Hanna Lauener*
Hanna Lauener





For true photocopy

HANDELSREGISTERAMT DES KANTONS ZÜRICH

CERTIFICATION

issued by the Commercial Registry of Canton Zurich

It is hereby certified that the following company is entered in the Commercial Register of Canton Zurich: a joint stock company by the name of

Roche Glycart AG-----
(Roche Glycart Ltd)-----

domiciled in Schlieren-----
Address: Wagistrasse 18, 8952 Schlieren-----

This company has been entered in the Commercial Register of Canton Zurich since 18th September 2000. It has been entered in the aforementioned register under the following versions:

From 18th September 2000 - 21st March 2001
GlycArt Biotechnology GmbH-----
(GlycArt Biotechnology Ltd liab. Co)-----

With journal entry no. 7749 of 21 March 2001, the following entry was published in the Official Commercial Gazette of Switzerland (SHAB), no. 60 of 27 March 2001:

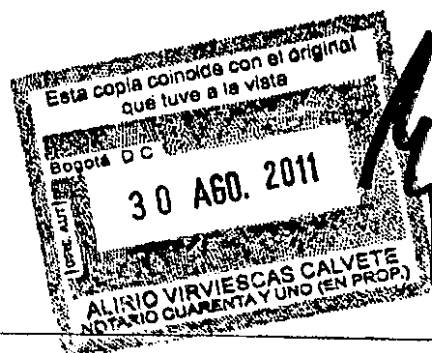
Remarks: At the shareholders' meeting on 16.03.2001, it was resolved that the share capital be fully paid up, that it be increased by CHF 20,000.00 to CHF 100,000.00, and that GlycArt Biotechnology GmbH be transformed into a publicly listed corporation. The Company will continue trading with all of its assets and liabilities as per the balance sheet of 31.12.2000, without being liquidated.

From 21st March 2001 - 20th November 2003
GlycArt Biotechnology AG-----
(GlycArt Biotechnology Ltd.)-----

From 20th November 2003 - 23rd December 2009
GlycArt Biotechnology AG-----
GlycArt Biotechnology Ltd)-----

It has been entered since 23th December 2009 under the following name:
Roche Glycart AG-----
(Roche Glycart Ltd)-----

It is further certified that the aforementioned company is organized according to the laws of Switzerland.

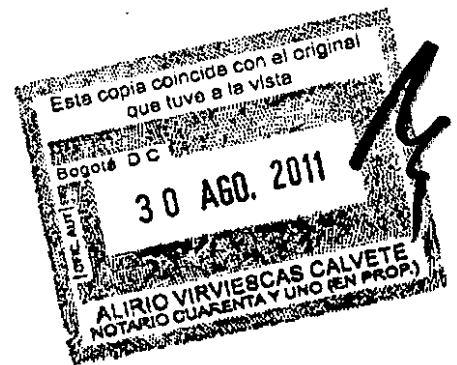


The Commercial Registry Office of the Canton of Zurich can offer no guarantee as to the accuracy of the translation from the original German text of this entry in the Commercial Register.

Zurich, Switzerland, 28th June 2010
Company number: CH-020.4.022.333-1
Signed: HI
Fee: CHF 180.--



[Handwritten signature]



For true photocopy:

Basel (Switzerland), this 13th (thirteenth) day of July 2010 (two thousand and ten).

D. f. a. Schlager, Not

BV 165/2010

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *D. f. a. Schlager*

3. in his/her function as *notary public*

4. and certified by the seal of the *above mentioned*

Certified

> 4. Mai 2011

5. in Basel (Bâle)

6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

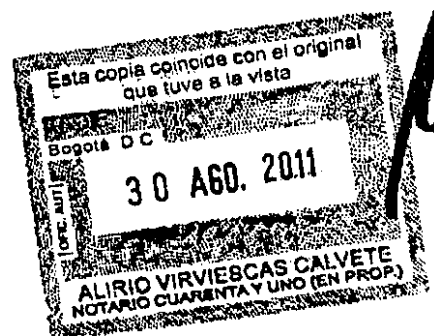
8. no. *28.55/6082*

9. Seal/stamp:

10. Signature:

H. Lauener

Hanna Lauener





SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-08-11 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 09005110.3 07-04-09 EP	(51) Int Cl: C07K 16/28 (71) Solicitante(s): ROCHE GLYCART AG. (72) Inventor(es): BOSSENMAIER, Birgit; BRINKMANN, Ulrich; LAU, Wilma; HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian; NIEDERFELLNER, Gerhard; SCHANZER, Juergen, Michael; STRACKE, Jan, Olaf; SUSTMANN, Claudio y UMANA, Pablo. (74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 07-11-11 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 30-03-10 No. de solicitud: PCT/EP2010/002005	(87) Publicación internacional Fecha: 14-10-10 No. publicación: WO 2010/115552 A1
(54) Título: "ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-ERBB-3/ANTI-C-MET"	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención se relaciona con anticuerpos biespecíficos contra ErbB-3 humana y contra c-Met humana, métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y sus usos.

Sector: Industria farmacéutica y biotecnológica, en particular anticuerpos monoclonales o policlonales o anticuerpos híbridos contra receptores específicos, especialmente contra productos de traducción de oncogenos.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u> X </u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____		
(21) No. de solicitud: _____ (22) Fecha de solicitud: 31-08-11			
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28			
(71) Solicitante(s): ROCHE GLYCART AG.			
(72) Inventor(es): BOSENMAIER, Birgit; BRINKMANN, Ulrich; LAU, Wilma; HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian; NIEDERFELLNER, Gerhard; SCHANZER, Juergen, Michael; STRACKE, Jan, Olaf; SUSTMANN, Claudio y UMANA, Pablo.			
(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	09005110.3	07-04-09	EP
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 07-11-11		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 14-10-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 30-03-10		No. publicación: WO 2010/115552 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2010/002005			
(54) Título: ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-ERBB-3/ANTI-C-MET.			

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		
SUPERINTENDENCIA		DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES		
TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO		PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐		
(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 31-08-11		
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm		
(71) Solicitante(s): ROCHE GLYCART AG.				
(72) Inventor(es): BOSSENMAIER, Birgit; BRINKMANN, Ulrich; LAU, Wilma; HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian; NIEDERFELLNER, Gerhard; SCHANZER, Juergen, Michael; STRACKE, Jan, Olaf; SUSTMANN, Claudio y UMANA, Pablo.				
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE				
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) Pais				
(30) Prioridad		(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais
		09005110.3	07-04-09	EP
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 07-11-11		(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 14-10-10		
Fecha de presentación de la solicitud: 30-03-10		No. Publicación : WO 2010/115552 A1		
No. de solicitud: PCT/EP2010/002005				
(54) Título: ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-ERBB-3/ANTI-C-MET.				
(57) Resumen - Reivindicación(es):				
Resumen.-				
La presente invención se relaciona con anticuerpos biespecíficos contra ErbB-3 humana y contra c-Met humana, métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y sus usos.				
Sector: Industria farmacéutica y biotecnológica, en particular anticuerpos monoclonales o policlonales o anticuerpos híbridos contra receptores específicos, especialmente contra productos de traducción de oncogenos.				

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 26064 WO-WJ	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2010/002005	International filing date (day/month/year) 30/03/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07/04/2009
Applicant ROCHE GLYCART AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 5a
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2010/002005

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)



on paper



in electronic form

b. (time)



in the international application as filed



together with the international application in electronic form



subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/002005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/32 C07K16/46
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/100624 A2 (MERRIMACK PHARMACEUTICALS INC [US]; SCHOEBERL BIRGIT [US]; NIELSEN ULR) 21 August 2008 (2008-08-21)	1,2,4, 8-15
Y	page 15, line 5 - line 7 page 8, line 2 - line 6 page 15, line 21 - line 22 page 18, line 33 - line 38 page 38, line 20 - line 23 page 5, line 3 - line 16 ----- -/--	3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 2010

Date of mailing of the international search report

19/05/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/002005

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GOLD DAVID V ET AL: "A novel bispecific, trivalent antibody construct for targeting pancreatic carcinoma" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US LNKD- DOI:10.1158/0008-5472.CAN-08-0232, vol. 68, no. 12, 15 June 2008 (2008-06-15) , pages 4819-4826, XP002541923 ISSN: 0008-5472 figure 1	3
Y	SHEN ET AL: "Single variable domain antibody as a versatile building block for the construction of IgG-like bispecific antibodies" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.JIM.2006.09.020, vol. 318, no. 1-2, 3 January 2007 (2007-01-03), pages 65-74, XP005820137 ISSN: 0022-1759 the whole document	3
A	WO 2006/104911 A2 (GENENTECH INC [US]; KONG-BELTRAN MONICA [US]; WICKRAMASINGHE DINELI M) 5 October 2006 (2006-10-05) figure 9	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/002005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008100624 A2	21-08-2008	AU 2008216600 A1	21-08-2008
		CA 2678181 A1	21-08-2008
		CN 101674846 A	17-03-2010
		CR 11029 A	29-12-2009
		EC SP099637 A	28-12-2009
		EP 2129396 A2	09-12-2009
		KR 20100014426 A	10-02-2010
		US 2009291085 A1	26-11-2009
WO 2006104911 A2	05-10-2006	AU 2006229989 A1	05-10-2006
		CA 2599988 A1	05-10-2006
		CN 101184506 A	21-05-2008
		EP 1868648 A2	26-12-2007
		JP 2008535821 T	04-09-2008
		KR 20080000613 A	02-01-2008
		SG 159547 A1	30-03-2010
		US 2006270594 A1	30-11-2006
		US 2010028337 A1	04-02-2010
		ZA 200707953 A	24-06-2009

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/002005

(22) International Filing Date:
30 March 2010 (30.03.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09005110.3 7 April 2009 (07.04.2009) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **ROCHE GLYCART AG** [CH/CH]; Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren (CH).

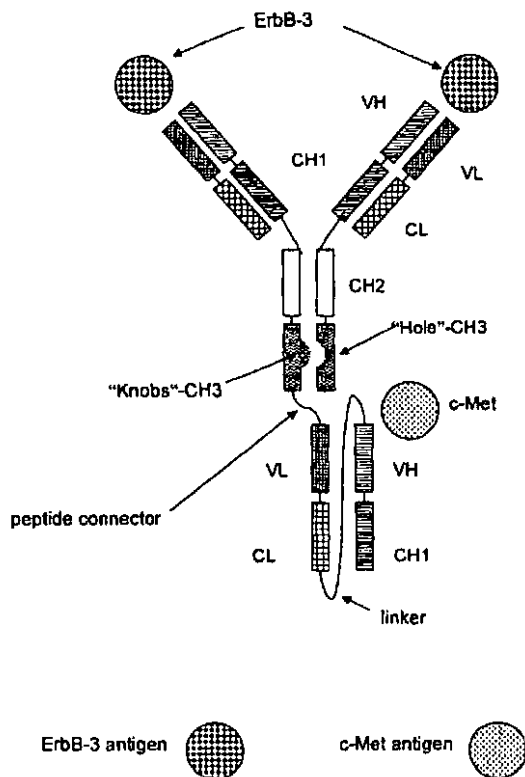
(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **BOSENMAIER, Birgit** [DE/DE]; Horst-Wolfram-Geissler-Weg 10, 82229 Seefeld (DE). **BRINKMAN, Ulrich** [DE/DE]; Feichtlstrasse 12, 82362 Weilheim (DE). **DORMEYER, Wilma** [DE/DE]; Rotbuchenstrasse 25, 81547 Muenchen (DE). **HOFFMANN, Elke** [DE/DE]; Leo-Putz-Weg 4, 82229 Seefeld (DE). **KLEIN, Christian** [DE/CH]; Chruetzacherweg 41, CH-8906 Bonstetten (CH). **NIEDERFELLNER, Gerhard** [DE/DE]; Dorfstrasse 36b, 82386 Oberhausen (DE). **SCHANZER, Juergen, Michael** [DE/DE]; Neuling 10, 83278 Traunstein (DE). **STRACKE, Jan, Olaf** [DE/DE]; Bruneckerstrasse 7, 81373 Muenchen (DE). **SUSTMANN, Claudio** [DE/DE]; Penzberger Strasse 3, 81373 Muenchen (DE). **UMANA, Pablo** [CR/CH]; Freiestrasse 159, CH-8032 Zuerich (CH).

[Continued on next page]

(54) Title: **BISPECIFIC ANTI-ERBB-3/ANTI-C-MET ANTIBODIES**

Fig. 5a

(57) Abstract: The present invention relates to bispecific antibodies against human ErbB-3 and against human c-Met, methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.





(74) Agent: BURGER, Alexander; Roche Diagnostics GmbH, Patent Department (TR-E), Postfach 11 52, 82372 Penzberg (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg									
ASK	20. Mai 2010					WN			
BK						WJ			
BUR	HH	HIL	MI	SR	TH	UE			

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220 26064 WO-WJ

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2010/002005

International filing date (day/month/year)
30.03.2010

Priority date (day/month/year)
07.04.2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 C07K16/32 C07K16/46

Applicant
ROCHE GLYCART AG

Termin

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bumb, Peter

Telephone No. +31 70 340-8936



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>2-7, 9</u>
	No: Claims	<u>1, 8, 10-15</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>5-7</u>
	No: Claims	<u>1-4, 8-15</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-15</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2010/002005

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Reference is made to the following documents:

- D1** WO 2008/100624 A2 (MERRIMACK PHARMACEUTICALS INC [US]; SCHOEBERL BIRGIT [US]; NIELSEN ULR) 21 August 2008 (2008-08-21)
- D2** GOLD DAVID V ET AL: "A novel bispecific, trivalent antibody construct for targeting pancreatic carcinoma" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US LNKD- DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0232, vol. 68, no. 12, 15 June 2008 (2008-06-15), pages 4819-4826, XP002541923 ISSN: 0008-5472

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

V.1 PRIOR ART

D1 discloses a bsAb in general terms which is directed against c-Met and ErbB3 (p. 15 ll. 5-7). ErbB3 specifically is human ErbB3 (p. 8 ll. 2-6). Also described are IgG1, IgG3 isotype (p. 15 ll. 21-22), nucleic acids (p. 18 ll. 33-38), treatment of cancer (p. 38 ll. 20-23 + p. 5 ll. 3-16).

D2 discloses a trivalent antibody format which is bivalent for a first antigen and monovalent for a second antigen.

V.2 NOVELTY

V.2.1

D1 describes a bispecific antibody which is directed against c-Met and ErbB3. ErbB3 is specifically human and it is implicitly derivable for the skilled reader that c-Met should then also be of the same (human) isotype (see also human c-Met and human ErbB3 in example 14).

The fact that a bsAb having such two specificities then results in <15% internalization may not have been previously known but is intrinsic to the construct already described in D1.

The subject-matter of claim 1 is not novel (ART. 33(2) PCT).

D1 also discloses the additional technical features as per present claims 8, 10-15 (ART. 33(2) PCT).

V.2.2

D1 does not specifically speak of bivalency or trivalency. The subject-matter of claims 2-4 is novel (ART. 33(2) PCT).

V.2.3

D1 does not speak of the CDR-combinations as per claim 4. The subject-matter of claims 5-7 is novel (ART. 33(2) PCT).

V.2.4

D1 does not speak of sugar-chains in which each chain has <65% fucose. The subject-matter of claim 9 is novel (ART. 33(2) PCT).

V.3

V.3.1

D1 is considered the closest prior art to the subject-matter at hand and has been discussed above.

V.3.2

The subject-matter of claims 2 & 4 differs from D1 in that the bsAb is **bivalent**. The alleged technical effect resulting from this difference is that ErbB3 is internalized with <15% after 2 hours etc.. The technical problem to be solved is the provision of an alternative human c-Met/human ErbB3 bsAb with improved properties.

The effect of reduced ErbB3-internalization was not known in the art. However, having regard to the state of the art D1 it would have been already obvious for a skilled person to arrive at something falling within the terms of claims 2 & 4, due to a lack of alternatives: bispecificity as per D1 requires at least bivalency. The unexpected effect is merely a bonus effect which does not confer inventiveness on the claimed subject-matter.

In essence, the applicant has *discovered* that a construct as described in D1 has the effect of reducing the ErbB3-internalization.

The subject-matter of claims 2 & 4 does not involve an inventive step (ART. 33(3) PCT).

V.3.3

The subject-matter of claim 3 differs from D1 in that the bsAb is trivalent. The technical problem to be solved is the same as above.

Trivalent antibody formats are known from D2. The person skilled in the art would not have necessarily chosen this trivalent format since the regular bivalent formats are more straight-forward. However, it is shown in underlying Table 6(C) (example 8) that trivalency vs. bivalency as such does not have any appreciable effect on internalization. The choice of trivalency vs. bivalency is thus an arbitrary choice which is not linked to the technical effect desired, as opposed to bispecificity as such, which is already described in D1.

The subject-matter of claim 3 does not involve an inventive step (ART. 33(3) PCT).

V.3.4

Claim 5 differs from D1 in that the two antigen-binding sites specific for (1) human ErbB3 and (2) human c-Met each comprise a set of six specific CDRs (SEQ ID NOs), respectively. The technical problem to be solved is the same as above.

Anti-ErbB3 mAb 205 and anti-cMet Fab 5D5 as such are known in the art. The choice of these two particular antigen-binding sites (as represented by their respective six CDRs) is not suggested in D1. The particular degree of efficacy as described in Table 6(C) must be attributed, at least in part, to the binding-affinity of each antigen-binding site, as well as their cooperative contribution.

Departing from D1 the person skilled in the art would have had no guidance to chose these two particular antigen-binding sites and to arrive at the particular *degree* of reduced ErbB3-internalization witnessed in table 6(C).

The subject-matter of claims 5-7 involves an inventive step (ART. 33(3) PCT).

V.3.5

The subject-matter of claim 9 differs from D1 in that the bsAb comprises a sugar-chain attached to Asn297 which comprises <65% fucose. The technical effect resulting from this difference is increased effector-function.

The technical problem to be solved vis-à-vis D1 is thus the modification of said bsAb so that it has improved effector function.

D1 itself already speaks of ADCC as possible mechanism for therapeutic efficacy (p. 33) and of modulating said effector function. It is self-evident to the skilled reader that glycoengineering of the fucose-content will lead to said improved effector function.

- The subject-matter of claim 9 does not involve an inventive step (ART. 3383) PCT).

V.4 PATENTABILITY

V.4.1

Claim 15 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT.

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VIII

Certain observations on the International Application

VIII.1 LACK OF CLARITY

VIII.1.1

Claim 1 defines a bsAb in terms of two antigens-specificities and in terms of a functional property of "internalization of ErbB3 of no more than 15% ...".

If said reduced internalization is purely due the two antigen-specificities being combined on the same antibody, it will intrinsically be fulfilled by any bsAb according to D1.

If additional technical features (apart from the bispecificity as such) are required, this functional property defines the technical effect to achieved purely in terms of a desideratum without providing a complete set of essential technical features or providing a concrete technical teaching of how to achieve the property (ART. 6 PCT).

VIII.1.2

The label of the y-axis in underlying figures 11-14 seems to be wrong. HGF is used to stimulate cell-proliferation and to thereby define the 100%-uninhibited reference level. Yet HGF is depicted as providing 100% "inhibition". Also, in Figs. 11-12 increasing concentrations of active agents lead to an allegedly reduced "inhibition" (ART. 6 PCT).

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

BNSDOCID: <XS____2006100103CF_L>

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-ERBB-3/ANTI-C-MET

RESUMEN-OBJETO-FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con anticuerpos biespecíficos contra ErbB-3 humana y contra c-Met humana, métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y sus usos.

SECTOR: Industria farmacéutica y biotecnológica, en particular anticuerpos monoclonales o policlonales o anticuerpos híbridos contra receptores específicos, especialmente contra productos de traducción de oncogenos.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-ERBB-3/ANTI-C-MET

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos contra la
5 ErbB-3 humana y contra la c-Met humana, a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

Grupo de proteínas ErbB

10 El grupo de proteínas ErbB está formado por 4 miembros: la ErbB-1, también llamada receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); la ErbB-2, también llamada HER2 en humanos y neu en roedores; la ErbB-3, también llamada HER3 y la ErbB-4, también llamada HER4.

ErbB-3 y anticuerpos anti-ErbB-3

15 La ErbB-3 (también conocida como homólogo 3 del oncogén de la leucemia viral eritroblástica V-erb-b2 (avian); ERBB3, HER3; SEQ ID NO: 46) es una proteína unida a membrana, que tiene un dominio de fijación sobre neurregulina, pero no un dominio quinasa activo (Kraus, M.H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9193-7, 1989, Plowman, G.D. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4905-9,
20 1990; Katoh, M. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 1189-97, 1993). Puede fijarse, pues, sobre su ligando, pero no acarrea la señal a la célula por fosforilación. Sin embargo, forma heterodímeros con otros miembros del grupo de receptores de EGF, que tienen actividad de quinasa. La heterodimerización conduce a la activación de los mecanismos que conducen a la proliferación o la diferenciación celulares. Se ha publicado la amplificación de este gen y/o la sobreexpresión de su proteína en numerosos tipos de cáncer, incluido el cáncer de próstata, de vejiga y de mama. Se han caracterizado variantes alternativas de empalme transcripcional que codifican a diferentes isoformas. Una isoforma carece de
25 la región intermembrana y se secreta fuera de la célula. Esta forma actúa modulando la actividad de la forma fijada sobre la membrana (Corfas, G. y col., 7 (6), 575-80, 2004). Se cree que la ERBB3, cuando esta activada, se convierte en sustrato de la dimerización y posterior fosforilación con la ERBB1, ERBB2 y ERBB4.
30

Al igual que muchas tirosina-quinazas de receptor, la ERBB3 se activa con un ligando extracelular. Los ligandos conocidos que se unen a la ERBB3 incluyen a la herregulina.

Ya se conocen anticuerpos anti-ErbB-3 que pueden utilizarse para la terapia del cáncer, p.ej. por los documentos WO 97/35885, WO 2007/077028 o WO 2008/100624.

c-Met y anticuerpos anti-c-Met

El MET (factor de transición mesenquimo-epitelial) es un protooncogén que codifica a una proteína MET (también conocida como c-Met; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos = HGFR; receptor de HGF; receptor del factor de diseminación (scatter); receptor del SF; SEQ ID NO: 45) (Dean, M. y col., Nature 318, 385-8, 1985; Chan, A.M. y col., Oncogene 1, 229-33, 1987; Bottaro, D.P. y col., Science 251, 802-4, 1991; Naldini, L. y col., EMBO J. 10, 2867-78, 1991; Maulik, G. y col., Cytokine Growth Factor Rev. 13, 41-59, 2002). El MET es un receptor de membrana que es esencial para el desarrollo embrionario y la curación de heridas. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es el único ligando conocido del receptor del MET. El MET se expresa normalmente en células de origen epitelial, mientras que la expresión del HGF se restringe a células de origen mesenquimal. A raíz de la estimulación del HGF, el MET induce diversas respuestas biológicas que colectivamente dan lugar a un programa conocido como crecimiento invasivo. La activación anormal del MET en el cáncer guarda relación con un pronóstico malo, en el que el MET aberrantemente activo desencadena el crecimiento tumoral, la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que abastecen al tumor con nutrientes y el cáncer se propaga a otros órganos (metástasis). El MET se desregula en muchos tipos de enfermedades malignas humanas, incluidos el cáncer de riñón, de hígado, de estómago, de mama y de cerebro. Normalmente, solo las células germinales y las células progenitoras expresan el MET, lo cual permite que estas células crezcan de modo invasivo, con el fin de generar nuevos tejidos en un embrión o de regenerar tejidos dañados en un adulto. Sin embargo, se cree que las células germinales cancerosas secuestran la capacidad de las células germinales normales de expresar el MET y de

este modo llegan a provocar la persistencia del cáncer y su propagación a otras partes del cuerpo.

El producto del proto-oncogén MET es el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos y codifica la actividad de la tirosina-quinasa. La proteína precursora primaria de cadena simple se descompone después de la traducción para
5 producir las subunidades alfa y beta, que se unen mediante un disulfuro para formar el receptor maduro. Varias mutaciones del gen MET se han asociado con el carcinoma papilar renal.

Los anticuerpos anti-c-Met se conocen p.ej. por los documentos
10 US 5,686,292, US 7,476,724, WO 2004/072117, WO 2004/ 108766, WO 2005/016382, WO 2005/063816, WO 2006/015371, WO 2006/104911, WO 2007/126799 o WO 2009/007427.

Se conocen los péptidos de unión con el c-Met p.ej. por los artículos de Matzke, A. y col., Cancer Res 65 (14), 6105-10, 2005; y Tam, Eric M. y col., J.
15 Mol. Biol. 385, 79-90, 2009.

Anticuerpos biespecíficos

En fecha recientes se ha desarrollado una gran variedad de formatos de anticuerpos recombinantes, p.ej. anticuerpos biespecíficos tetravalentes por fusión p.ej. de un formato de anticuerpo IgG con dominios de cadena simple (véase
20 p.ej. Coloma, M.J. y col., Nature Biotech. 15, 159-163, 1997; WO 2001/077342; y Morrison, S.L., Nature Biotech. 25, 1233-1234, 2007).

Se han desarrollado también varios formatos nuevos, en los que ya no se conserva la estructura del núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), por ejemplo en los dia-, tria- o tetracuerpos, minicuerpos, varios formatos de cadena simple (scFv, Bis-scFv), que son capaces de unirse a dos o más antígenos (Holliger, P. y col., Nature Biotech. 23, 1126-1136, 2005; Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74, 3-14, 2007; Shen, J. y col., Journal of Immunological Methods 318, 65-74, 2007; Wu, C. y col., Nature Biotech. 25, 1290-1297, 2007).

30 En todos estos formatos se emplean engarces (linkers) para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) con otra proteína de unión (p.ej. scFv) o para fusionar p.ej. dos fragmentos Fab o las scFv (Fischer, N., Léger, O.,

Pathobiology 74, 3-14, 2007). Hay que tener en cuenta que puede ser deseable la conservación de las funciones efectoras, p.ej. la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), que vienen mediadas por la fijación del receptor del Fc, conservando un grado
5 elevado de similitud con los anticuerpos de origen natural.

En el documento WO 2007/024715 se describen inmunoglobulinas duales de dominio variable diseñadas para que sean proteínas de fijación multiespecífica y multivalente. En la patente US 6,897,044 se describe un proceso para la obtención de dímeros de anticuerpo biológicamente activos. En la patente
10 US 7,129,330 se describe un constructo de anticuerpo multivalente FV que tiene por lo menos cuatro dominios variables unidos entre sí mediante engarces peptídicos. En el documento US 2005/0079170 se describen estructuras de unión de antígenos dímeros y multímeros. La proteína de unión a antígenos monoespecíficos tri- o tetravalentes contiene tres o cuatro fragmentos Fab unidos entre sí
15 mediante enlace covalente gracias a una estructura conectora, dicha proteína no es la inmunoglobulina natural, según se describe en US 6,511,663. En WO 2006/020258 se describen anticuerpos biespecíficos tetravalentes que pueden expresarse eficazmente en células procariotas y eucariotas y que son útiles para métodos terapéuticos o de diagnóstico. En US 2005/0163782 se describe un
20 método para separar o, con preferencia, para sintetizar dímeros que están unidos por lo menos un engarce disulfuro entre cadenas a partir de dímeros que no están unidos por lo menos mediante un engarce disulfuro entre las cadenas a partir de una mezcla que contiene los dos tipos de polipéptidos dímeros. Los receptores tetravalentes biespecíficos se han descrito en US 5,959,083. Los anticuerpos de
25 ingeniería genética que tienen tres o más sitios funcionales de fijación sobre antígenos se han descrito en WO 2001/077342.

Los polipéptidos multiespecíficos y multivalentes de fijación sobre antígenos se han descrito en WO 1997/001580. En WO 1992/004053 se describen homoconjugados, obtenidos por ejemplo a partir de anticuerpos monoclonales del
30 grupo IgG, que se fijan sobre el mismo determinante antigénico y que están unidos con enlace covalente mediante una unión cruzada realizada por síntesis. En el documento WO 1991/06305 se describen anticuerpos monoclonales oligómeros

que tienen una gran avidez de antígeno, dichos oligómeros, normalmente del grupo IgG, se secretan con dos o más monómeros de inmunoglobulina asociados entre sí para formar moléculas de IgG tetravalentes o hexavalentes. Los anticuerpos derivados de ovejas y los constructos de anticuerpos de ingeniería genética se han descrito en US 6,350,860, pueden utilizarse para tratar enfermedades, en las que la actividad del interferón-gamma sea patogénica. En US 2005/0100543 se describen constructos que pueden tomarse como dianas y que son vehículos multivalentes para anticuerpos biespecíficos, es decir, cada molécula de anticuerpo que puede tomarse como diana puede servir de vehículo para dos o más anticuerpos biespecíficos. En el documento WO 1995/009917 se describen anticuerpos tetravalentes biespecíficos de ingeniería genética. En WO 2007/109254 se describen moléculas de unión estabilizadas, formadas por o constituidas por un scFv estabilizado.

Anticuerpos biespecíficos anti-ErbB-3/anti-c-Met

En el documento WO 2008/100624 se describen anticuerpos anti-ErbB-3 con una mayor internalización del receptor de ErbB-3 y su utilización en anticuerpos biespecíficos, entre otros con el c-Met como segundo antígeno.

Resumen de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana, constituido por un primer sitio de unión a antígeno, que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, caracterizado porque dicho anticuerpo biespecífico presenta una internalización del ErbB-3 no superior al 15 %, cuando se mide después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo con células A431, si se compara con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de anticuerpo.

En una forma de ejecución de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico bivalente o trivalente que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que consta de uno o dos sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a la ErbB-3 humana y un sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a c-Met humana.

En una forma de ejecución de la invención dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico bivalente que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana y que contiene un sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana.

En una forma de ejecución de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico trivalente que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que contiene dos sitios de fijación sobre antígeno que se unen específicamente a la ErbB-3 humana y un tercer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, caracterizado porque

i) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 53, una región CDR2H de SEQ ID NO: 54 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 55, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 56, una región CDR2L de SEQ ID NO: 57 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 58 ó una región CDR1L de SEQ ID NO: 59; y

dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 66, una región CDR2H de SEQ ID NO: 67 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 68, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 69, una región CDR2L de SEQ ID NO: 70 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 71;

ii) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 60, una región CDR2H de SEQ ID NO: 61 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 62, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 63, una región CDR2L de SEQ ID NO: 64 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 65 o una región CDR1L de SEQ ID NO: 66; y

dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 66, una región CDR2H de SEQ ID NO: 67 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 68, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 69, una región CDR2L de
5 SEQ ID NO: 70 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 71.

Dicho anticuerpo biespecifico se caracteriza con preferencia porque

i) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 47, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 48; y dicho segundo sitio de fijación
10 sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4;

ii) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 50; y dicho segundo sitio de fijación
15 sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4;

iii) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 51; y dicho segundo sitio de fijación
20 sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4;

iv) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 52; y dicho segundo sitio de fijación
25 sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4; o
30 NO: 4; o

v) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 1, y como dominio variable de

cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 2; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4.

5 Con preferencia, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque:

dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 51; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de
10 SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4.

En una forma de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico según la invención se caracteriza porque contiene una región constante del subgrupo IgG1 o IgG3.

15 En una forma de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico según la invención se caracteriza porque está glucosilado con una cadena azúcar en Asn297, siendo la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena azúcar del 65 % o menos.

Otro aspecto de la invención es una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena de dicho anticuerpo biespecífico.

20 Otros aspectos adicionales de la invención son una composición farmacéutica que contiene dicho anticuerpo biespecífico, dicha composición para el tratamiento del cáncer, el uso de dicho anticuerpo biespecífico para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, un método de tratamiento de un paciente que tenga un cáncer mediante la administración de dicho anticuerpo biespecífico al paciente que necesite tal tratamiento.
25

Los anticuerpos según la invención poseen propiedades muy valiosas, por ejemplo la inhibición del crecimiento de células cancerosas que expresan a ambos receptores <ErbB3> y <c-Met>, la eficacia antitumoral que redundan en beneficio del paciente que sufra un cáncer. Los anticuerpos biespecíficos <ErbB3-c-Met> según la invención presentan una internalización reducida si se comparan
30 con sus anticuerpos <ErbB3> originales en células cancerosas que expresan a ambos receptores <ErbB3> y <c-Met>.

Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la presente invención es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, caracterizado porque dicho anticuerpo biespecífico presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 15 %, cuando se mide después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo con células A431, si se compara con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de dicho anticuerpo biespecífico.

En una forma de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico, que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, se caracteriza porque dicho anticuerpo biespecífico presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 10 %, cuando se mide después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo con células A431, si se compara con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de dicho anticuerpo biespecífico.

En una forma de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico, que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, se caracteriza porque dicho anticuerpo biespecífico presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 7 %, cuando se mide después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo con células A431, si se compara con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de dicho anticuerpo biespecífico.

En una forma de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico, que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, se caracteriza porque dicho anticuerpo biespecífico presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 5 %, cuando se mide después de 2 horas

en un ensayo de citometría de flujo con células A431, si se compara con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de dicho anticuerpo biespecífico.

El término "internalización de la ErbB-3" indica la internalización de receptor de la ErbB-3 inducida por anticuerpo en células A431 (ATCC nº CRL-1555), si se compara con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de anticuerpo. Dicha internalización del receptor de la ErbB-3 se induce con los anticuerpos biespecíficos según la invención y se mide después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo (FACS), tal como se describe en el ejemplo 8. Un anticuerpo biespecífico según la invención presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 15 % en células A431 después de 2 horas de exposición al anticuerpo, si se compara con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de anticuerpo. En una forma de ejecución, dicho anticuerpo presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 10 %. En una forma de ejecución, dicho anticuerpo presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 7 %. En una forma de ejecución, dicho anticuerpo presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 5 %. Para determinar si un anticuerpo biespecífico ErbB3/cMet presenta una internalización de la ErbB-3 del 10 % o inferior después de 2 horas en las células A431, puede compararse en un ensayo de citometría de flujo (FACS) con el anticuerpo biespecífico MH_TvAb24 ErbB3/c-Met descrito a continuación. Para determinar si un anticuerpo biespecífico ErbB3/cMet presenta una internalización de la ErbB-3 del 5 % o inferior después de 2 horas en las células A431, puede compararse en un ensayo de citometría de flujo (FACS) con el anticuerpo biespecífico MH_TvAb29 ErbB3/c-Met descrito a continuación.

Otro aspecto de la presente invención es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana, que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, caracterizado porque dicho anticuerpo biespecífico reduce la internalización de la ErbB-3, inducida por el (correspondiente) anticuerpo mono-específico original ErbB-3, en un 50 % o más (en una forma de ejecución: en un 60 % o más; en otra forma de ejecución: en un 70 % o más; en una forma de ejecución: en un 80 % o más), cuando se mide después de 2 horas en un ensayo de

citometría de flujo en células A431 (ATCC nº CRL-1555). La reducción de la internalización de la ErbB-3 se calcula (empleando los valores medidos después de 2 horas en el ensayo de citometría de flujo con células A431) del modo siguiente:

100 x (% de internalización de la ErbB inducida por el anticuerpo monoespecífico original ErbB-3 - % de internalización de la ErbB inducida por el anticuerpo biespecífico ErbB-3/cMet) / % de internalización de la ErbB inducida por el anticuerpo monoespecífico original ErbB-3. Por ejemplo: a) el anticuerpo MH_TvAb21 biespecífico ErbB-3/cMet presenta una internalización de la ErbB-3 del 1 % y el anticuerpo Mab 205 monoespecífico original ErbB-3 presenta una internalización de la ErbB-3 del 40 %; por consiguiente, el anticuerpo MH_TvAb21 biespecífico ErbB-3/cMet presenta una reducción de la internalización de la ErbB-3 del $100 \times (40-1)/40 = 97,5 \%$; b) el anticuerpo MH_TvAb25 biespecífico ErbB-3/cMet presenta una internalización de la ErbB-3 del 11 % y el anticuerpo Mab 205 monoespecífico original ErbB-3 presenta una internalización de la ErbB-3 del 40 %; por consiguiente, el anticuerpo MH_TvAb25 biespecífico ErbB-3/cMet presenta una reducción de la internalización de la ErbB-3 del $100 \times (40-11)/40 = 72,5 \%$; c) el anticuerpo HER3/Met_6 biespecífico ErbB-3/cMet presenta una internalización de la ErbB-3 del 11 % y el clon 29 del anticuerpo HER3 monoespecífico original ErbB-3 presenta una internalización de la ErbB-3 del 54 %; por consiguiente, el anticuerpo HER3/Met_6 biespecífico ErbB-3/cMet presenta una reducción de la internalización de la ErbB-3 del $100 \times (54-11)/40 = 88,9 \%$ (véanse los valores de internalización medidos después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo con células A431, ejemplo 8).

En una forma de ejecución de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico trivalente que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que consta de dos sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a la ErbB-3 humana y un tercer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a c-Met humana.

En una forma de ejecución de la invención dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico bivalente que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana y que contiene un sitio de fijación sobre antígeno que se une

específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana.

En una forma de ejecución de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico tetravalente que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que contiene dos sitios de fijación sobre antígeno que se unen específicamente a la ErbB-3 humana y dos sitios de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, dichos sitios de fijación sobre antígeno que se unen específicamente a la c-Met humana inhiben la dimerización de la c-Met (tal como se describe, p.ej. en WO 2009/007427).

10 Tal como se emplea aquí, "anticuerpo" indica una proteína de unión que contiene sitios de fijación sobre antígenos. Los términos "sitio de fijación" o "sitio de fijación sobre antígeno" se emplean aquí para indicar la región o regiones de una molécula de anticuerpo a las que actualmente está unido un ligando y se derivan de un anticuerpo. El término "sitio de fijación sobre antígeno" incluye los
15 dominios variables de cadena larga del anticuerpo (VH) y/o los dominios variables de cadena corta del anticuerpo (VL) o los pares de VH/VL, y pueden derivarse de anticuerpos enteros o fragmentos de anticuerpo, como son el Fv de cadena simple, un dominio VH y/o un dominio VL, el Fab o el (Fab)₂. En una forma de ejecución de la presente invención, cada uno de los sitios de fijación sobre el antígeno
20 contiene un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) y/o un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL), y está formado con preferencia por un par constituido por un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH).

Además de los sitios de fijación sobre antígeno derivados de anticuerpo,
25 también los péptidos de unión descritos p.ej. en Matzke, A. y col., Cancer Res. 65 (14), 6105-10, 2005 (15 de julio de 2005), pueden fijarse específicamente sobre un antígeno (p.ej. c-Met). Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es una molécula de fijación biespecífica que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana, que contiene un sitio de fijación sobre antígeno que
30 se une específicamente a la ErbB-3 humana y un péptido de unión que se une específicamente a la c-Met humana. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es una molécula de fijación biespecífica que se une específicamente a la

ErbB-3 humana y a la c-Met humana, que contiene un sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana y un péptido de unión que se une específicamente a la ErbB-3 humana.

La Erb-B3 (también conocida como homólogo 3 del oncogén de la leucemia viral eritroblástica V-erb-b2 (aviar); ERBB3, HER3; SEQ ID NO: 46) es una proteína unida a membrana, que tiene un dominio de fijación sobre neurregulina, pero no un dominio quinasa activo (Kraus, M.H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9193-7, 1989, Plowman, G.D. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4905-9, 1990; Katoh, M. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 1189-97, 1993). Puede fijarse, pues, sobre su ligando, pero no acarrea la señal a la célula por fosforilación. Sin embargo, forma heterodímeros con otros miembros del grupo de receptores de EGF, que tienen actividad de quinasa. La heterodimerización conduce a la activación de los mecanismos que conducen a la proliferación o la diferenciación celulares. Se ha publicado la amplificación de este gen y/o la sobreexpresión de su proteína en numerosos tipos de cáncer, incluido el cáncer de próstata, de vejiga y de mama. Se han caracterizado variantes alternativas de empalme transcripcional que codifican a diferentes isoformas. Una isoforma carece de la región intermembrana y se secreta fuera de la célula. Esta forma actúa modulando la actividad de la forma fijada sobre la membrana (Corfas, G. y col., 7 (6), 575-80, 2004). Se cree que la ERBB3, cuando esta activada, se convierte en sustrato de la dimerización y posterior fosforilación con la ERBB1, ERBB2 y ERBB4. Al igual que muchas tirosina-quinazas de receptor, la ERBB3 se activa con un ligando extracelular. Los ligandos conocidos que se unen a la ERBB3 incluyen a la herregulina.

El sitio de fijación sobre el antígeno y en especial los dominios variables de cadena larga (VH) y/o dominios variables de cadena corta (VL) del anticuerpo, que se unen específicamente a la ErbB-3 humana, pueden derivarse a) de anticuerpos anti-ErbB-3 conocidos, descritos p.ej. en WO 97/35885, WO 2007/077028 o WO 2008/100624; o b) de nuevos anticuerpos anti-ErbB-3 obtenidos por métodos de inmunización nueva, entre otros, la proteína ErbB-3 humana o el ácido nucleico o fragmentos de la misma o por exposición de fagos.

El MET (factor de transición mesenquimo-epitelial) es un protooncogén que codifica a una proteína MET (también conocida como c-Met; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos = HGFR; receptor de HGF; receptor del factor de diseminación (scatter); receptor del SF; SEQ ID NO: 45) (Dean, M. y col., Nature 318, 385-8, 1985; Chan, A.M. y col., Oncogene 1, 229-33, 1987; Bottaro, D.P. y col., Science 251, 802-4, 1991; Naldini, L. y col., EMBO J. 10, 2867-78, 1991; Maulik, G. y col., Cytokine Growth Factor Rev. 13, 41-59, 2002). El MET es un receptor de membrana que es esencial para el desarrollo embrionario y la curación de heridas. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es el único ligando conocido del receptor del MET. El MET se expresa normalmente en células de origen epitelial, mientras que la expresión del HGF se restringe a células de origen mesenquimal. A raíz de la estimulación del HGF, el MET induce diversas respuestas biológicas que colectivamente dan lugar a un programa conocido como crecimiento invasivo. La activación anormal del MET en el cáncer guarda relación con un pronóstico malo, en el que el MET aberrantemente activo desencadena el crecimiento tumoral, la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que abastecen al tumor con nutrientes y el cáncer se propaga a otros órganos (metástasis). El MET se desregula en muchos tipos de enfermedades malignas humanas, incluidos el cáncer de riñón, de hígado, de estómago, de mama y de cerebro. Normalmente, solo las células germinales y las células progenitoras expresan el MET, lo cual permite que estas células crezcan de modo invasivo, con el fin de generar nuevos tejidos en un embrión o de regenerar tejidos dañados en un adulto. Sin embargo, se cree que las células germinales cancerosas secuestran la capacidad de las células germinales normales de expresar el MET y de este modo llegan a provocar la persistencia del cáncer y su propagación a otras partes del cuerpo.

El sitio de fijación sobre el antígeno y, en especial, los dominios variables de cadena larga (VH) y/o dominios variables de cadena corta (VL) de anticuerpo, que se unen específicamente a la c-Met humana pueden derivarse de a) de anticuerpos anti-c-Met conocidos, descritos p.ej. en US 5,686,292, US 7,476,724, WO 2004/072117, WO 2004/108766, WO 2005/016382, WO 2005/063816, WO 2006/015371, WO 2006/ 104911, WO 2007/126799, o WO 2009/007427; o b)

de anticuerpos anti-c-Met nuevos, obtenidos p.ej. por métodos de inmunización nueva empleando entre otros la proteína anti-c-Met humana o el ácido nucleico o fragmentos de la misma o por exposición de fagos.

Otro aspecto de la invención es un método para la selección de un anticuerpo biespecífico según la invención, que consta de los pasos siguientes:

- a) medir la internalización de la ErbB-3 en células A431 (ATCC nº CRL-1555) inducida por un anticuerpo biespecífico anti-ErbB-3/anti-c-Met después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo (FACS), por comparación con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de anticuerpo;
- b) medir la internalización de la ErbB-3 en células A431 (ATCC nº CRL-1555) en un ensayo de citometría de flujo (FACS) en ausencia de anticuerpo;
- c) seleccionar un anticuerpo biespecífico que presente una internalización de la ErbB-3 no superior al 15 % en células A431 después de 2 horas de exposición al anticuerpo, por comparación con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de anticuerpo.

En una forma de ejecución se elige un anticuerpo biespecífico que presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 10 %. En una forma de ejecución se elige un anticuerpo biespecífico que presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 7 %. En una forma de ejecución se elige un anticuerpo biespecífico que presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 5 %.

Otro aspecto de la invención es un método de selección de un anticuerpo biespecífico según la invención, que consta de los pasos siguientes:

- a) medir la internalización de la ErbB-3 en células A431 (ATCC nº CRL-1555) inducida por un anticuerpo biespecífico anti-ErbB-3/anti-c-Met después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo (FACS), por comparación con la internalización de la ErbB-3 en ausencia de anticuerpo;
- b) medir la internalización de la ErbB-3 en células A431 (ATCC nº CRL-1555) inducida por el correspondiente anticuerpo monoespecífico anti-ErbB-3 después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo (FACS);
- c) seleccionar un anticuerpo biespecífico que reduzca la internalización de la ErbB-3 inducida por el correspondiente anticuerpo monoespecífico original ErbB-3 en un 50 % o más (en células A431, después de 2 horas).

En una forma de ejecución se elige un anticuerpo biespecífico que reduce la internalización de la ErbB-3, comparada con la internalización de la ErbB-3 inducida por el correspondiente anticuerpo monoespecífico original ErbB-3, en un 60 % o más. En una forma de ejecución se elige un anticuerpo biespecífico que reduce la internalización de la ErbB-3, comparada con la internalización de la ErbB-3 inducida por el correspondiente anticuerpo monoespecífico original ErbB-3, en un 70 % o más. En una forma de ejecución se elige un anticuerpo biespecífico que reduce la internalización de la ErbB-3, comparada con la internalización de la ErbB-3 inducida por el correspondiente anticuerpo monoespecífico original ErbB-3, en un 80 % o más.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana, que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana caracterizado porque

i) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 53, una región CDR2H de SEQ ID NO: 54 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 55, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 56, una región CDR2L de SEQ ID NO: 57 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 58 ó una región CDR1L de SEQ ID NO: 59; y

dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 66, una región CDR2H de SEQ ID NO: 67 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 68, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 69, una región CDR2L de SEQ ID NO: 70 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 71;

ii) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 60, una región CDR2H de SEQ ID NO: 61 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 62, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 63, una región CDR2L de SEQ ID NO: 64 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 65 o una región CDR1L de SEQ ID NO: 66; y

dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 66, una región CDR2H de SEQ ID NO: 67 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 68, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 69, una región CDR2L de
5 SEQ ID NO: 70 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 71.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana, que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met
10 humana caracterizado porque

dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 53, una región CDR2H de SEQ ID NO: 54 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 55, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 56, una región CDR2L de
15 SEQ ID NO: 57 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 58 ó una región CDR1L de SEQ ID NO: 59; y

dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 66, una región CDR2H de SEQ ID NO: 67 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 68, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 69, una región CDR2L de
20 SEQ ID NO: 70 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 71.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana, que contiene un primer sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y
25 un segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met humana caracterizado porque

dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 60, una región CDR2H de SEQ ID NO: 61 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 62, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 63, una región CDR2L de
30 SEQ ID NO: 64 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 65 o una región CDR1L de SEQ ID NO: 66; y

dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 66, una región CDR2H de SEQ ID NO: 67 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 68, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 69, una región CDR2L de SEQ ID NO: 70 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 71.

Dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza con preferencia porque:

i) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 47, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 48; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente a la c-Met contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4;

ii) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 50; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4;

iii) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 51; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4;

iv) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 52; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4; o

v) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 1, y como dominio variable de

cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 2; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4.

5 Con preferencia, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque:

dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 51; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la secuencia de
10 SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la secuencia de SEQ ID NO: 4.

La especificidad del anticuerpo indica el reconocimiento selectivo que realiza el anticuerpo de un epítoto concreto existente en un antígeno. Los anticuerpos naturales son, por ejemplo, monoespecíficos. Los "anticuerpos biespecíficos"
15 según la invención son anticuerpos que tienen dos especificidades diferentes para la fijación sobre antígenos. Cuando un anticuerpo tiene más de una especificidad, los epítotes reconocidos pueden asociarse con un solo antígeno o con más de un antígeno. Los anticuerpos de la presente invención son específicos de dos antígenos diferentes, es decir, de la ErbB-3 como primer antígeno y de la c-Met como
20 segundo antígeno.

El término anticuerpo "monoespecífico" se emplea aquí para indicar un anticuerpo que tiene uno o más sitios de fijación, cada uno de ellos se une al mismo epítoto del mismo antígeno.

El término "valente" se emplea dentro de la presente solicitud para indicar
25 la presencia de un número determinado de sitios de fijación existentes en una molécula de anticuerpo. Por tanto, los términos "bivalente", "tetraivalente", y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de fijación, cuatro sitios de fijación y seis sitios de fijación, respectivamente, en una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos según la invención son por lo menos "bivalentes" y pueden
30 ser "trivalentes" o "multivalentes" (p.ej. ("tetraivalentes" o "hexavalentes").

Un sitio de un anticuerpo de la invención para la fijación sobre antígeno puede contener seis regiones determinantes de complementariedad (CDR), que

en grados variables contribuyen a la afinidad del sitio de fijación para con el antígeno. Hay tres CDR de dominio variable de cadena larga (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR de dominio variable de cadena corta (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las CDR y de las regiones de armazón (FR) se determina comparándolas con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos, en las que estas regiones se hayan definido según la variabilidad entre las secuencias. Se incluye también dentro del alcance de la invención los sitios funcionales de fijación sobre antígeno que constan de pocas CDR (es decir, en los que la especificidad de fijación viene determinada por tres, cuatro o cinco CDR).
5 Por ejemplo, para la fijación puede ser suficiente con menos de un conjunto completo de 6 CDR. En algunos casos, puede ser suficiente con un dominio VH o un dominio VL.

Pueden utilizarse los anticuerpos biespecíficos bivalentes del tipo IgG contra la ErbB-3 humana y la c-Met humana que contienen las regiones constantes de la inmunoglobulina, tal como se ha descrito p.ej. en la solicitud EP 07024867.9,
15 la solicitud EP 07024864.6, la solicitud EP 07024865.3 o Ridgway, J.B., Protein Eng. 9, 617-621, 1996; WO 96/027011; Merchant, A.M. y col., Nature Biotech. 16, 677-681, 1998; Atwell, S. y col., J. Mol. Biol. 270, 26-35, 1997 y EP 1870459A1.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" se emplean aquí para indicar una preparación de moléculas de anticuerpo que tienen una única composición de aminoácidos.
20

El término "anticuerpo quimérico" indica un anticuerpo que contiene una región variable, es decir, una región de fijación de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante derivada de una especie o fuente diferente, obtenida normalmente por técnicas de DNA recombinante. Son preferidos los anticuerpos quiméricos que contienen una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" contempladas en la presente invención son aquellas, en las que la región constante se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la unión con el C1q y/o la unión con el receptor de Fc (FcR). Dichos anticuerpo quiméricos se denominan también "anticuerpos de clase cambiada" (class-switched antibodies).
25
30

Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que contienen segmentos de DNA que codifican a las regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de DNA que codifican a las regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos de obtención de anticuerpos quiméricos incluyen
5 las técnicas convencionales de DNA recombinante y de transfección genética, que son bien conocidas en la técnica, véase p.ej. Morrison, S.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855, 1984; US 5,202,238 y US 5,204,244.

El término "anticuerpo humanizado" indica anticuerpos en las que las regiones de estructura o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se
10 han modificado para que contengan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente con respecto a la de la inmunoglobulina original. En una forma preferida de ejecución, se injerta una CDR murina en la región de estructura de un anticuerpo humano para obtener el "anticuerpo humanizado", véase p.ej. Riechmann, L. y col., Nature 332, 323-327, 1988; y Neuberger, M.S. y col., Nature 314,
15 268-270, 1985. Las CDR especialmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos antes mencionados de los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" contemplados en la presente invención son aquellas, en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente con respecto al anticuerpo original para generar propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la unión con
20 el C1q y/o a la unión con el receptor de Fc (FcR).

El término "anticuerpo humano" se emplea aquí para indicar anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 368-374, 2001). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse también en animales transgénicos (p.ej., ratones) que, después de la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. La transferencia de la disposición genética de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal puede traducirse en la producción de anticuerpos humanos después del contacto con el antígeno (ver, p.ej.,
30

Jakobovits, A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-2555, 1993; Jakobovits, A. y col., Nature 362, 255-258, 1993; Bruggemann, M. y col., Year Immunol. 7, 33-40, 1993). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en bibliotecas de exposición de fagos (Hoogenboom, H.R. y Winter, G., J. Mol. Biol. 227, 381-388, 1992; Marks, J.D. y col., J. Mol. Biol. 222, 581-597, 1991). Se dispone también de las técnicas de Cole, A. y col. y Boerner, P. y col. para la obtención de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, A. y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., p. 77, 1985; y Boerner, P. y col., J. Immunol. 147, 86-95, 1991). Tal como se ha mencionado antes para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, el término "human anticuerpo" se emplea aquí para indicar los anticuerpos que se han modificado en la región constante para generar propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la unión al C1q y/o a la unión al FcR, p.ej. por "cambio de clase", es decir, cambio o mutación de partes del Fc (p.ej. de la IgG1 a la IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4).

El término "anticuerpo humano recombinante" se emplea aquí para indicar todos los anticuerpos humanos que se obtienen, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, como son los anticuerpos aislados de una célula hospedante por ejemplo una célula NS0 o CHO o de un animal (p.ej. un ratón) que sea transgénico en cuanto a los genes de la inmunoglobulina humana o los anticuerpos expresados empleando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula hospedante. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes según la invención se han sometido a una hipermutación somática "in vivo". Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL del anticuerpo recombinante son secuencias que, en cuanto derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de línea germinal humana, no pueden existir de modo natural en el repertorio de líneas germinales de anticuerpos humanos "in vivo".

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena corta (VL), región variable de una cadena larga (VH) se emplea aquí para indicar cada uno de los pares de cadenas cortas y largas que intervienen directamente en la fijación del anticuerpo sobre el antígeno. Los dominios de cadenas variables humanas, cortas

y largas, tienen la misma estructura general y cada dominio contiene cuatro regiones de estructura (FR), cuyas secuencias están muy conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conecten la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional gracias a las regiones de estructura y junto con las CDR de la otra cadena forman el sitio de fijación sobre el antígeno. Las regiones CDR3 de cadena larga y corta del anticuerpo desempeñan un rol especialmente importante en la especificidad de unión/afinidad de los anticuerpos según la invención y por ello constituyen otro objeto de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de un anticuerpo que se une al antígeno" se emplean aquí para indicar los restos aminoácido de un anticuerpo que producen la unión con el antígeno. La región hipervariable contiene restos aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones de "estructura" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable distintas de los restos de región hipervariable que se acaban de definir. Por lo tanto, las cadenas cortas y largas de un anticuerpo abarcan desde el extremo N al extremo C de los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR de cada cadena están separadas por los aminoácidos de estructura. En especial, la CDR3 de cadena larga es la región que más contribuye a la fijación sobre el antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan con arreglo a la definición estándar de Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Tal como se emplea aquí, el término "unión" o "fijación específica" indica la unión del anticuerpo a un epítopo del antígeno (la ErbB-3 humana o la c-Met humana) en un ensayo "in vitro", con preferencia en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare Upsala, Suecia) con el antígeno de tipo salvaje purificado. La afinidad de la unión se define en términos k_a (constante de velocidad de asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_d (constante de disociación) y K_D (k_d/k_a). La unión o fijación específica indica una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o menos, con preferencia de 10^{-9} M a 10^{-13} mo-

les/l. Por tanto, un anticuerpo biespecífico <ErbB3-c-Met> según la invención se fija específicamente sobre cada antígeno del que es específico con una afinidad de fijación (K_D) de 10^{-8} moles/l o menos, con preferencia de 10^{-9} M a 10^{-13} moles/l.

La fijación del anticuerpo con el FcγRIII puede investigarse mediante un
5 ensayo BIAcore (GE-Healthcare, Upsala, Suecia). La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de velocidad de asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a).

El término "epítotope" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de la unión específica con un anticuerpo. En ciertas formas de ejecución, el determi-
10 nante epítotope incluye a grupos de moléculas de superficie químicamente activos, como son los aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas formas de ejecución, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características específicas de carga. Un epítotope es una región de un antígeno que está unida a un anticuerpo.

15 En ciertas formas de ejecución, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno si reconoce con preferencia su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "región constante" se emplea en la presente solicitud para indicar la suma de los dominios de un anticuerpo distintos a la región variable. La
20 región constante no participa directamente en la fijación sobre un antígeno, pero posee varias funciones efectoras. En función de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas largas, los anticuerpos se dividen en los subgrupos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de ellos pueden dividirse a su vez en subgrupos, por ejemplo el IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones
25 constantes de cadena larga que corresponden a los diferentes grupos de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de cadena corta, que pueden encontrarse en los cinco grupos de anticuerpo, se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

El término "región constante derivada de un origen humano" se emplea en
30 la presente solicitud para indicar una región constante de cadena larga de un anticuerpo humano de los subgrupos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región constante de cadena corta kappa o lambda. Dichas regiones constantes son bien co-

nocidas en el estado de la técnica y se han descrito p.ej. en Johnson, G. y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28, 214-218, 2000; Kabat, E.A. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2785-2788, 1975.

5

En una forma de ejecución, los anticuerpos biespecíficos según la invención tiene una región constante del subgrupo IgG1 o IgG3 (con preferencia del subgrupo IgG1), que se deriva con preferencia de un origen humano. En una forma de ejecución, los anticuerpos biespecíficos según la invención contienen una parte Fc del subgrupo IgG1 o IgG3 (con preferencia del subgrupo IgG1), que se deriva con preferencia de un origen humano.

15 La región constante de un anticuerpo participa directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por la célula dependiente de anticuerpo) y en la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia con la fijación del factor de complemento C1q sobre la región constante de la mayor parte de los subgrupos de anticuerpos IgG. La fijación del C1q sobre un anticuerpo viene provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el sitio llamada de fijación. Dichos sitios de fijación de región constante se conocen en el estado de la técnica y se han descrito p.ej. en Lukas, T.J. y col., *J. Immunol.* 127, 2555-2560, 1981; Brunhouse, R. y Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16, 907-917, 1979; Burton, D.R. y col., *Nature* 288, 338-344, 1980; Thommesen, J.E. y col., *Mol. Immunol.* 37, 995-1004, 2000; Idusogie, E.E. y col., *J. Immunol.* 164, 4178-4184, 2000; Hezareh, M. y col., *J. Virol.* 75, 12161-12168, 2001; Morgan, A. y col., *Immunology* 86, 319-324, 1995; y EP 0 307 434. Dichos sitios de fijación de región constante son característicos p.ej. de los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat).

30

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)" indica la lisis de células diana humanas por acción de un anticuerpo según la invención

en presencia de células efectoras. La ADCC se mide con preferencia mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan a la ErbB-3 y la c-Met con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, por ejemplo las PBMC recién aisladas o las células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias (buffy coats), como son los monocitos o las células asesinas naturales (NK) o una línea celular de NK de crecimiento permanente. El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" indica un proceso iniciado con la fijación del factor de complemento C1q sobre la parte Fc de la mayoría de subgrupos de anticuerpos IgG. La unión del C1q a un anticuerpo es causada por interacciones proteína-proteína definidas en el sitio llamado de fijación. Dichos sitios de fijación de la parte Fc son conocidos en el estado de la técnica (ver más arriba). Dichos sitios de fijación de la parte Fc se caracterizan p.ej. por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat). Los anticuerpos de los subgrupos IgG1, IgG2 e IgG3 presentan normalmente activación del complemento incluida la fijación sobre el C1q y C3, mientras que el IgG4 no activa el sistema de complemento y no se fija sobre el C1q y/o el C3.

Las funciones efectoras de los anticuerpos monoclonales de mediación celular pueden intensificarse diseñando su componente oligosacárido del modo descrito por Umana, P. y col., *Nature Biotechnol.* 17, 176-180, 1999, y US 6,602,684. Los anticuerpos de tipo IgG1, que son los anticuerpos más utilizados en el ámbito terapéutico, son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación unido a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos al Asn297 están sepultados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto del polipéptido y su presencia es esencial para que el anticuerpo pueda mediar en las funciones efectoras, por ejemplo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Lifely, M.R. y col., *Glycobiology* 5, 813-822, 1995; Jefferis, R. y col., *Immunol. Rev.* 163, 59-76, 1998; Wright, A. y Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15, 26-32, 1997). Umana, P. y col. ha puesto de manifiesto en *Nature Biotechnol.* 17, 176-180, 1999 y WO 99/54342 que la sobreexpresión de la β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la for-

mación de oligosacáridos biseccionados, en células de ovarios de hámster chino (CHO), aumenta significativamente la actividad ADCC de los anticuerpos "in vitro". Las alteraciones de la composición del hidrato de carbono Asn297 o su eliminación afecta también su fijación sobre el FcγR y C1q (Umana, P. y col., Nature Biotechnol. 17, 176-180, 1999; Davies, J. y col., Biotechnol. Bioeng. 74, 288-294, 2001; Mimura, Y. y col., J. Biol. Chem. 276, 45539-45547, 2001; Radaev, S. y col., J. Biol. Chem. 276, 16478-16483, 2001; Shields, R.L. y col., J. Biol. Chem. 276, 6591-6604, 2001; Shields, R.L. y col., J. Biol. Chem. 277, 26733-26740, 2002; Simmons, L.C. y col., J. Immunol. Methods 263, 133-147, 2002).

10 Los métodos para intensificar las funciones efectoras de anticuerpo monoclonales de mediación celular mediante la reducción de la cantidad de fucosa se han descrito p.ej. en WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2004/ 065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/ 035835, 15 WO 2000/061739, Niwa, R. y col., J. Immunol. Methods 306, 151-160, 2005; Shinkawa, T. y col., J. Biol. Chem. 278, 3466-3473, 2003; WO 03/055993 o US 2005/0249722.

De modo sorprendente, los anticuerpos biespecíficos <ErbB3-c-Met> según la invención presentan una fuerte reducción de la internalización del receptor 20 de la ErbB-3, si se comparan con sus anticuerpos originales <ErbB3> y/o <c-Met> (ver figura 18, ejemplo 8 y tabla). Por lo tanto, en una forma de ejecución de la invención, se glucosila el anticuerpo biespecífico según la invención (subgrupo IgG1 o IgG3) con una cadena azúcar en Asn297, siendo la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena azúcar del 65 % o menos (numeración según Kabat). En 25 otra forma de ejecución, la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena azúcar se sitúa entre el 5 % y el 65 %, con preferencia entre el 20 % y el 40 %. "Asn297" según la invención significa el aminoácido asparagina situado en la posición 297 de la región Fc. Basándose en variaciones de secuencia poco importantes de los anticuerpos, el Asn297 puede estar situado en una posición de algunos aminoácidos 30 (por lo general no más de ± 3 aminoácidos) más arriba o más abajo de la posición 297, es decir entre la posición 294 y la 300. Estos anticuerpos de glucosilación se llaman también anticuerpos afucosilados.

La glucosilación de la IgG1 o IgG3 humana tiene lugar en el Asn297 como glucosilación de oligosacárido complejo biantenarico fucosilado, terminada con hasta dos restos Gal. Las regiones constantes de cadena larga humanas del subgrupo IgG1 o IgG3 se han descrito con detalle en Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y en Brüggemann, M. y col., J. Exp. Med. 166, 1351-1361, 1987; Love, T.W. y col., Methods Enzymol. 178, 515-527, 1989. Estas estructuras se denominan restos glucano G0, G1 (α -1,6- o α -1,3-) o G2, en función de la cantidad de restos Gal terminales (Raju, T.S., Bioprocess Int. 1, 44-53, 2003). La glucosilación de tipo CHO de las partes Fc del anticuerpo Fc se ha descrito p.ej. en Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14, 201-207, 1997. Los anticuerpos que se expresan de modo recombinante en células hospedantes de CHO no glucomodificadas normalmente se fucosilan en el Asn297 en una cantidad por lo menos del 85 %. Los oligosacáridos modificados del anticuerpo original de longitud completa pueden ser híbridos o complejos. Con preferencia, los oligosacáridos biseccionados, no fucosilados o de fucosilación reducida son híbridos. En otra forma de ejecución, los oligosacáridos biseccionados, no fucosilados o de fucosilación reducida son complejos.

Según la invención "cantidad de fucosa" significa la cantidad de dicho azúcar dentro de la cadena azúcar del Asn297, referida a la suma de todas las glucoestructuras unidas al Asn297 (p.ej. estructuras de complejas, híbridas y de alto contenido de manosa), medida por espectrometría de masas MALDI-TOF y calculada como valor promedio. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa, referidas a todas las glucoestructuras identificadas en una muestra tratada de N-glucosidasa F (p.ej. estructuras complejas, híbridas, de oligomanosa y de alto contenido de manosa, respectivamente), determinada por MALDI-TOF (respecto al procedimiento detallado para determinar la cantidad de fucosa, véase el ejemplo 14).

El anticuerpo biespecífico afucosilado según la invención puede expresarse en una células hospedante glucomodificada, diseñada para que exprese por lo menos un ácido nucleico que codifica a un polipéptido que tenga actividad GnTIII en una cantidad suficiente para fucosilar parcialmente los oligosacáridos de la

región Fc. Como alternativa puede disminuirse la actividad de α 1,6-fucosiltransferasa de la célula hospedante o puede eliminarse según US 6,946,292 para generar células hospedantes glucomodificadas. El grado de fucosilación del anticuerpo puede determinarse p.ej. por las condiciones de fermentación (p.ej. el tiempo de fermentación) o por combinación por lo menos de dos anticuerpos que tengan grados de fucosilación diferentes. Tales anticuerpos afucosilados y sus correspondientes métodos de glucoingeniería se han descrito en WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/ 031875, Umana, P. y col., Nature Biotechnol. 17, 176-180, 1999, WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835 o WO 2000/061739. Estos anticuerpos glucodiseñados tienen una mayor ADCC. Otros métodos de glucoingeniería que permiten obtener anticuerpos afucosilados según la invención se han descrito p.ej. en Niwa, R. y col., J. Immunol. Methods 306, 151-160, 2005; Shinkawa, T. y col., J. Biol. Chem. 278, 3466-2373, 2003; WO 03/055993 o US 2005/0249722.

Una forma de ejecución es un método de preparación del anticuerpo biespecífico del subgrupo IgG1 o IgG3 que se ha glucosilado con una cadena azúcar en Asn297, con lo cual la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena azúcar es del 65 % o menos, aplicando el procedimiento descrito en WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/ 031875, Umana, P. y col., Nature Biotechnol. 17, 176-180, 1999, WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835 o WO 2000/061739.

Una forma de ejecución es un método de preparación del anticuerpo biespecífico del subgrupo IgG1 o IgG3 que se ha glucosilado con una cadena azúcar en Asn297, con lo cual la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena azúcar es del 65 % o menos, aplicando el procedimiento descrito en Niwa, R. y col., J. Immunol. Methods 306, 151-160, 2005; Shinkawa, T. y col., J. Biol. Chem. 278, 3466-2373, 2003; WO 03/055993 o US 2005/0249722.

Formatos de anticuerpo biespecífico

Los anticuerpos de la presente invención tienen dos o más sitios de fijación y son biespecíficos. Es decir, los anticuerpos pueden ser biespecíficos incluso en los casos, en los que hay más de dos sitios de fijación (es decir, cuando el anticuerpo es trivalente o multivalente). Los anticuerpos biespecíficos de la invención incluyen, por ejemplo, a los anticuerpos multivalentes de cadena simple, los diacuerpos y los triacuerpos, así como los anticuerpos que tienen la estructura de dominio constante de los anticuerpos de longitud completa a los que se unen otros sitios de fijación sobre antígeno (p.ej. Fv de cadena simple, un dominio VH y/o un dominio VL, Fab o (Fab)₂.) mediante uno o más engarces peptídicos. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa de una especie única o pueden ser quimerizados o humanizados. En el caso de un anticuerpo con más de dos sitios de fijación sobre el antígeno, algunos sitios de fijación pueden ser idénticos, en el supuesto de que la proteína tenga sitios de fijación sobre dos antígenos diferentes. Es decir, un primer sitio de fijación es específico para la ErbB-3, mientras que el segundo sitio de fijación es específico de la c-Met, o viceversa.

En una forma preferida de ejecución, el anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana según la invención contiene la región Fc de un anticuerpo. Tal anticuerpo conserva las propiedades de

Formatos biespecíficos bivalentes

Pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos bivalentes contra la ErbB-3 humana y la c-Met humana que contienen regiones constantes de inmunoglobulina del modo descrito p.ej. en WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253 o Ridgway, J.B., Protein Eng. 9, 617-621, 1996; WO 96/027011; Merchant, A.M. y col., Nature Biotech. 16, 677-681, 1998; Atwell, S. y col., J. Mol. Biol. 270, 26-35, 1997 y EP 1870459A1.

Por lo tanto, en una forma de ejecución de la invención el anticuerpo biespecífico <ErbB3-c-Met> según la invención es un anticuerpo biespecífico bivalente, que contiene:

- a) la cadena corta y la cadena larga de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3; y

b) la cadena corta y la cadena larga de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la c-Met humana,

en el que los dominios constantes CL y CH1, y/o los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí.

5 En otra forma de ejecución de la invención, el anticuerpo biespecífico <ErbB3-c-Met> según la invención es un anticuerpo biespecífico bivalente, que contiene:

a) la cadena corta y la cadena larga de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la c-Met humana; y

10 b) la cadena corta y la cadena larga de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a ErbB-3,

en el que los dominios constantes CL y CH1, y/o los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí.

Sobre la estructura esquemática ilustrativa de la tecnología de "botones
15 dentro de ojales" (knob-into-holes) descrita a continuación véanse las figuras 2a-c.

Para mejorar los rendimientos de tales anticuerpos biespecíficos anti-ErbB-3/anti-C-met, bivalentes, heterodímeros, pueden alterarse los dominios CH3 de dicho anticuerpo de longitud completa con la tecnología de "botones dentro de ojales" que se describe con detalle mediante varios ejemplos p.ej. en
20 WO 96/027011, Ridgway, J.B. y col., Protein Eng. 9, 617-621, 1996; y Merchant, A.M. y col., Nat. Biotechnol. 16, 677-681, 1998. En este método se alteran las superficies de interacción de los dos dominios CH3 para aumentar la heterodimerización de las dos cadenas largas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas largas) puede ser el "botón",
25 mientras que el otro será el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza los heterodímeros (Merchant, A.M. y col., Nature Biotech. 16, 677-681, 1998; Atwell, S. y col., J. Mol. Biol. 270, 26-35, 1997) y aumenta el rendimiento.

Por tanto, en un aspecto de la invención, dicho anticuerpo biespecífico bivalente está además caracterizado porque:

30 el dominio CH3 de una cadena larga y el dominio CH3 de la otra cadena larga se encuentran entre sí en la interfase que contiene una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo;

dicha interfase se altera para promover la formación del anticuerpo biespecífico bivalente, dicha alteración se caracteriza porque:

a) se altera el dominio CH3 de una cadena larga,

de modo que dentro de la interfase original, el dominio CH3 de una cadena larga que entra en contacto con la interfase original del dominio CH3 de la otra
5 cadena larga dentro del anticuerpo biespecífico bivalente,

se reemplaza un resto aminoácido por un resto aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena larga que puede posicionarse dentro de una cavidad existente dentro de la interfase del dominio CH3 de
10 la otra cadena larga

y

b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena larga,

de modo que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que
15 entra en contacto con la interfase original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico bivalente

se reemplaza un resto aminoácido por un resto aminoácido que tiene un volumen menor de cadena lateral, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3, dentro del cual puede posicionarse una
20 protuberancia existente dentro de la interfase del primer dominio CH3.

Con preferencia dicho resto aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral se elige entre el grupo formado por arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

Con preferencia, dicho resto aminoácido que tiene un volumen menor de
25 cadena lateral se elige entre el grupo formado por alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

En un aspecto de la invención, los dos dominios CH3 se alteran además con la introducción de la cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de modo que pueda formarse un puente disulfuro entre los dos dominios CH3.
30

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico bivalente contiene una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y

las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal". Puede recurrirse también a un puente disulfuro adicional entre cadenas (Merchant, A.M y col., Nature Biotech. 16, 677-681, 1998) p.ej. introduciendo una mutación Y349C en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la "cadena del ojal". Por tanto, en otra forma de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico bivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones E356C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 o dicho anticuerpo biespecífico bivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación adicional E356C o S354C el otro dominio CH3 forman un puente disulfuro entre las cadenas) (numeración siempre con arreglo al índice EU de Kabat). Pero, de forma alternativa o adicional pueden aplicarse también otras tecnologías de botones dentro de ojales (knobs-in-holes) descritas en el documento EP 1870459A1. Un ejemplo preferido de dicho anticuerpo biespecífico bivalente son las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal" (numeración siempre con arreglo al índice EU de Kabat).

En otra forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico bivalente contiene una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal" y además las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

En otra forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico bivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 o dicho anticuerpo biespecífico bivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y además las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

En los ejemplos que siguen (ver p.ej. la tabla 5 y la figura 7) se describen ejemplos de anticuerpos biespecíficos bivalentes en un formato descrito en la tabla 5 y en la figura 7, que se expresan y purifican.

Formatos biespecíficos trivalentes

5 Otro aspecto preferido de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de dos cadenas largas de anticuerpo y dos cadenas cortas de anticuerpo; y

10 b) un fragmento Fab de cadena simple que se une específicamente a la c-Met humana,

en el que dicho fragmento Fab de cadena simple del apartado b) se fusiona con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico en el extremo C o N de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo
15 de longitud completa.

Sobre la estructura esquemática ilustrativa de la tecnología de "botones dentro de ojales" descrita a continuación véase la figura 5a.

Otro aspecto preferido de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que contiene

20 a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de dos cadenas largas de anticuerpo y dos cadenas cortas de anticuerpo; y

b) un fragmento Fv de cadena simple que se une específicamente a la c-Met humana,

25 en el que dicho fragmento Fv de cadena simple del apartado b) se fusiona con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico en el extremo C o N de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo de longitud completa.

Sobre la estructura esquemática ilustrativa de la tecnología de "botones
30 dentro de ojales" descrita a continuación véase la figura 5b.

Por consiguiente, los correspondientes anticuerpos biespecíficos trivalentes se expresan y purifican con la nomenclatura scFv-Ab de la tabla 1 (ver los ejemplos que siguen).

En una forma preferida de ejecución, dichos fragmentos Fab o Fv de cadena simple que se fijan sobre la c-Met humana se fusionan con dicho anticuerpo de longitud completa mediante un conector peptídico en el extremo C de las cadenas largas de dicho anticuerpo de longitud completa.

Otro aspecto preferido de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que contiene

10 a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de dos cadenas largas de anticuerpo y dos cadenas cortas de anticuerpo;

b) un polipéptido que consta de

ba) un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH); o

15 bb) un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) y un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1),

en el que dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VH mediante un conector peptídico con el extremo C de una de las dos cadenas largas de dicho anticuerpo de longitud completa;

20 c) un polipéptido que consta de

ca) un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL), o

cb) un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL);

25 en el que dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VL mediante un conector peptídico con el extremo C de la otra de las dos cadenas largas de dicho anticuerpo de longitud completa;

y en el que el dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) del polipéptido del apartado b) y el dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) del polipéptido del apartado c) forman, juntos, un sitio de fijación sobre el antígeno
30 que se une específicamente a la c-Met humana.

Con preferencia dichos conectores peptídicos de los apartados b) y c) son idénticos y son un péptido de por lo menos 25 aminoácidos, con preferencia entre 30 y 50 aminoácidos.

Sobre las estructuras esquemáticas ilustrativas, véanse las figuras 3a-c.

5 Por consiguiente, los correspondientes anticuerpos biespecíficos trivalentes se expresan y purifican con la nomenclatura VHVL-Ab en la tabla 4 (ver los ejemplos que siguen y la figura 3c).

Opcionalmente, el dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) del polipéptido del apartado b) y el dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) del polipéptido del apartado c) están unidos y estabilizados mediante un
10 puente disulfuro entre las cadenas gracias a la introducción de un enlace disulfuro entre las posiciones siguientes:

i) la posición 44 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta,

15 ii) la posición 105 del dominio variable de cadena larga y la posición 43 del dominio variable de cadena corta, o

iii) la posición 101 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta (numeración siempre con arreglo al índice EU de Kabat).

20 Las técnicas para la introducción de puentes disulfuro no naturales con fines de estabilización se describen p.ej. en WO 94/029350, Rajagopal y col., Prot. Engin. 1453-59, (1997); Kobayashi, H. y col., Nuclear Medicine & Biology 25, 387-393, 1998; o Schmidt, M. y col., Oncogene 18, 1711 -1721, 1999. En una forma de ejecución, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos de los apartados b) y c) se sitúa entre la posición 44 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta. En una forma de ejecución, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos de los apartados b) y c) se sitúa entre la posición 105 del dominio variable de cadena larga y la posición 43 del dominio variable de cadena corta
25 (numeración siempre con arreglo al índice EU de Kabat). En una forma de ejecución es preferido un anticuerpo biespecífico trivalente sin dicha estabilización op-
30

cional con disulfuro entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab de cadena simple.

Por la fusión de un fragmento Fab, Fv, de cadena simple con una de las cadenas pesadas (figuras 5a ó 5b) o por la fusión de diferentes polipéptidos con las dos cadenas largas del anticuerpo de longitud completa (figuras 3a-c) se forma un anticuerpo biespecífico trivalente heterodímero. Para mejorar los rendimientos de tales anticuerpos biespecíficos anti-ErbB-3/anti-C-met trivalentes heterodímeros, pueden alterarse los dominios CH3 de dicho anticuerpo de longitud completa con la tecnología de los "botones dentro de ojales", que se describe con detalle mediante varios ejemplos p.ej. en WO 96/027011, Ridgway, J.B. y col., Protein Eng. 9, 617-621, 1996; y Merchant, A.M. y col., Nat. Biotechnol. 16, 677-681, 1998. En este método se alteran las superficies de interacción de los dos dominios CH3 para aumentar la heterodimerización de las dos cadenas largas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas largas) puede ser el "botón", mientras que el otro será el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza a los heterodímeros (Merchant, A.M. y col., Nature Biotech. 16, 677-681, 1998; Atwell, S. y col., J. Mol. Biol. 270, 26-35, 1997) y aumenta el rendimiento.

Por tanto, en un aspecto de la invención dicho anticuerpo biespecífico trivalente está caracterizado además porque

el dominio CH3 de una cadena larga del anticuerpo de longitud completa y el dominio CH3 de la otra cadena larga del anticuerpo de longitud completa entran en contacto en la interfase que contiene una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo;

en el que dicha interfase se altera para promover la formación del anticuerpo biespecífico bivalente, dicha alteración se caracteriza porque:

a) se altera el dominio CH3 de una cadena larga,

de modo que dentro de la interfase original el dominio CH3 de una cadena larga que entra en contacto con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena larga existente dentro del anticuerpo biespecífico bivalente,

se reemplaza un resto aminoácido por un resto aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, con lo cual se genera una protuberancia dentro

de la interfase del dominio CH3 de una cadena larga que puede posicionarse en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena larga

y

b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena larga,

5 de modo que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que entra en contacto con la interfase original del primer dominio CH3 existente dentro del anticuerpo biespecífico trivalente

se reemplaza un resto aminoácido por un resto aminoácido que tiene un volumen menor de cadena lateral, con lo cual se genera una cavidad dentro de la
10 interfase del segundo dominio CH3 dentro del cual puede posicionarse una protuberancia existente dentro de la interfase del primer dominio CH3.

Con preferencia dicho resto aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral se elige entre el grupo formado por arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

15 Con preferencia dicho resto aminoácido que tiene un volumen menor de cadena lateral se elige entre el grupo formado por alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

En un aspecto de la invención, los dos dominios CH3 se alteran además con la introducción de la cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3 de modo que pueda formarse un puente disulfuro entre los dos dominios CH3.
20

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".
25 Puede recurrirse también a un puente disulfuro adicional entre cadenas (Merchant, A.M y col., Nature Biotech. 16, 677-681, 1998) p.ej. introduciendo una mutación Y349C en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la "cadena del ojal". Por tanto, en otra forma de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones
30 Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones E356C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 o dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W en uno de

los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación adicional E356C o S354C el otro dominio CH3 forman un puente disulfuro entre las cadenas) (numeración siempre con arreglo al índice EU de Kabat).

5 Pero, de forma alternativa o adicional pueden aplicarse también otras tecnologías de botones dentro de ojales (knobs-in-holes) descritas en el documento EP 1870459A1. Un ejemplo preferido de dicho anticuerpo biespecífico trivalente son las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal" (nume-
10 ración siempre con arreglo al índice EU de Kabat).

En otra forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal" y además las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del bo-
15 tón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

En otra forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 o dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W
20 en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y además las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

Otra forma de ejecución de la presente invención es un anticuerpo bies-
25 pecífico trivalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de:

aa) dos cadenas largas de anticuerpo formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH),
30 un dominio constante 1 de cadena larga de anticuerpo (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante 2 de cadena larga de anticuerpo (CH2) y un dominio constante 3 de cadena larga de anticuerpo (CH3); y

ab) dos cadenas cortas de anticuerpo formadas en dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL) (VL-CL); y

b) un fragmento Fab de cadena simple que se une específicamente a la c-
5 Met humana),

en el que el fragmento Fab de cadena simple consta de un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) y un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL) y un engarce, y en el que los dominios
10 de dicho anticuerpo y dicho engarce tienen uno de los órdenes siguientes en la dirección del extremo N al extremo C:

ba) VH-CH1-engarce-VL-CL, o bb) VL-CL-engarce-VH-CH1;

en el que dicho engarce es un péptido de por lo menos 30 aminoácidos, con preferencia entre 32 y 50 aminoácidos;

15 y en el que dicho fragmento Fab de cadena simple del apartado b) se fusiona con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico del extremo C o N de la cadena larga o corta (con preferencia en el extremo C de la cadena larga) de dicho anticuerpo de longitud completa;

en el que dicho conector peptídico es un péptido de por lo menos 5 aminoácidos, con preferencia entre 10 y 50 aminoácidos.
20

Dentro de esta forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico trivalente contiene con preferencia una mutación T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y con mayor preferencia el anticuerpo biespecífico trivalente contiene las Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C (o E356C),
25 T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3. Opcionalmente, en dicha forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

30 Otra forma de ejecución de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de:

aa) dos cadenas largas de anticuerpo formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH),
5 un dominio constante 1 de cadena larga de anticuerpo (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante 2 de cadena larga de anticuerpo (CH2) y un dominio constante 3 de cadena larga de anticuerpo (CH3); y

ab) dos cadenas cortas de anticuerpo formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y
10 un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL) (VL-CL); y

b) un fragmento Fv de cadena simple que se une específicamente a la c-Met humana),

en el que dicho fragmento Fv de cadena simple del apartado b) se fusiona con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector
15 peptídico del extremo C o N de la cadena larga o corta (con preferencia en el extremo C de la cadena larga) de dicho anticuerpo de longitud completa; y

en el que dicho conector peptídico es un péptido de por lo menos 5 aminoácidos, con preferencia entre 10 y 50 aminoácidos.

Dentro de esta forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico trivalente
20 contiene con preferencia una mutación T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y con mayor preferencia el anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C (o E356C), T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3. Opcionalmente,
25 te, en dicha forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

Por tanto, una forma preferida de ejecución es un anticuerpo biespecífico trivalente que contiene

30 a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de:

aa) dos cadenas largas de anticuerpo formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de cadena larga de anticuerpo (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante 2 de cadena larga de anticuerpo (CH2)

5 y un dominio constante 3 de cadena larga de anticuerpo (CH3); y

ab) dos cadenas cortas de anticuerpo formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL) (VL-CL); y

b) un fragmento Fv de cadena simple que se une específicamente a la c-
10 Met humana),

en el que dicho fragmento Fv de cadena simple del apartado b) se fusiona con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico en el extremo C de la cadena larga de dicho anticuerpo de longitud completa (formándose dos péptidos de fusión de cadena larga de anticuerpo y Fv
15 de cadena simple); y

en el que dicho conector peptídico es un péptido de por lo menos 5 aminoácidos.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de
20 cadena simple un polipéptido de la SEQ ID NO: 26, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de cadena simple un polipéptido de la SEQ ID NO: 27 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 28.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de
25 cadena simple un polipéptido de la SEQ ID NO: 29, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de cadena simple un polipéptido de la SEQ ID NO: 30 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 31.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de
30 cadena simple un polipéptido de la SEQ ID NO: 32, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de cadena simple un polipéptido de la SEQ ID NO: 33 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 34.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de cadena simple un polipéptido de la SEQ ID NO: 35, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de cadena simple un polipéptido de la
5 SEQ ID NO: 36 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 37.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de cadena simple un polipéptido de la SEQ ID NO: 38, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-Fv de cadena simple un polipéptido de la
10 SEQ ID NO: 39 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 40.

Otra forma de ejecución de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de:

15 aa) dos cadenas largas de anticuerpo formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de cadena larga de anticuerpo (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante 2 de cadena larga de anticuerpo (CH2) y un dominio constante 3 de cadena larga de anticuerpo (CH3); y

20 ab) dos cadenas cortas de anticuerpo formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL); y

b) un polipéptido formado por

ba) un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH); o

25 bb) un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) y un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), en el que dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VH mediante un conector peptídico con el extremo C de una de las dos cadenas largas de dicho anticuerpo de longitud completa (formándose un péptido de fusión de la
30 cadena larga de anticuerpo y la VH), en el que dicho conector peptídico es un péptido de por lo menos 5 aminoácidos, con preferencia entre 25 y 50 aminoácidos;

c) un polipéptido formado por:

ca) un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL), o

cb) un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL);

5 en el que dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VL mediante un conector peptídico con el extremo C de la otra de las dos cadenas largas de dicho anticuerpo de longitud completa (formándose un péptido de fusión de la cadena larga de anticuerpo y la VL);

en el que dicho conector peptídico es idéntico al conector peptídico del apartado b);

10 y en el que el dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) del polipéptido del apartado b) y el dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) del polipéptido del apartado c) forman, juntos, un sitio de fijación sobre el antígeno que se une específicamente a la c-Met humana.

Dentro de esta forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico trivalente
15 contiene con preferencia una mutación T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y con mayor preferencia el anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones Y349C, T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C (o E356C), T366S, L368A, Y407V en el otro de los dos dominios CH3. Opcionalmen-
20 te, en dicha forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico trivalente contiene las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VH
25 un polipéptido de la SEQ ID NO: 11, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VL un polipéptido de la SEQ ID NO: 12 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 13.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VH
30 un polipéptido de la SEQ ID NO: 14, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VL un polipéptido de la SEQ ID NO: 15 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 16.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VH un polipéptido de la SEQ ID NO: 17, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VL un polipéptido de la SEQ ID NO: 18 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 19.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VH un polipéptido de la SEQ ID NO: 20, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VL un polipéptido de la SEQ ID NO: 21 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 22.

En una forma preferida de ejecución, dicho anticuerpo biespecífico trivalente contiene como primer péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VH un polipéptido de la SEQ ID NO: 23, como segundo péptido de fusión de cadena larga de anticuerpo-VL un polipéptido de la SEQ ID NO: 24 y dos cadenas cortas de anticuerpo de la SEQ ID NO: 25.

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

a) un anticuerpo de longitud completa que se fija sobre la ErbB-3 humana, que consta de dos cadenas largas de anticuerpo VH-CH1-HR-CH2-CH3 y dos cadenas cortas de anticuerpo VL-CL;

(en el que con preferencia uno de los dos dominios CH3 contiene las mutaciones Y349C, T366W y el otro de los dos dominios CH3 contiene las mutaciones S354C (o E356C), T366S, L368A, Y407V);

b) un polipéptido formado por:

ba) un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH); o

bb) un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) y un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1),

en el que dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VH mediante un conector peptídico con el extremo C de una de las dos cadenas largas de dicho anticuerpo de longitud completa:

c) un polipéptido formado por:

ca) un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL), o

cb) un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL);

en el que dicho polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VL mediante un conector peptídico con el extremo C de la otra de las dos cadenas
5 largas de dicho anticuerpo de longitud completa;

y en el que el dominio variable de cadena larga del anticuerpo (VH) del polipéptido del apartado b) y el dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) del polipéptido del apartado c) forman, juntos, un sitio de fijación sobre el antígeno que se une específicamente a la c-Met humana.

10 Formatos biespecíficos tetravalentes

En una forma de ejecución, el anticuerpo multiespecífico según la invención es tetravalente, en el que el o los sitios de fijación sobre el antígeno, que se unen específicamente a la c-Met humana, inhibe la dimerización de la c-Met (tal como se describe p.ej. en WO 2009/007427).

15 Otro aspecto de la presente invención es, pues, un anticuerpo biespecífico tetravalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de dos cadenas largas de anticuerpo y dos cadenas cortas de anticuerpo; y

20 b) dos fragmentos Fab de cadena simple idénticos que se une específicamente a la c-Met humana,

dichos fragmentos Fab de cadena simple del apartado b) se fusionan con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico del extremo C o N de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo de longitud completa.
25

Otro aspecto de la presente invención es, pues, un anticuerpo biespecífico tetravalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la c-Met humana y consta de dos cadenas largas de anticuerpo y dos cadenas cortas
30 de anticuerpo; y

b) dos fragmentos Fab de cadena simple idénticos que se une específicamente a la ErbB-3,

dichos fragmentos Fab de cadena simple del apartado b) se fusionan con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico del extremo C o N de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo de longitud completa.

5 Respecto a la estructura esquemática ilustrativa, véase la figura 6a.

Otro aspecto de la presente invención es, pues, un anticuerpo biespecífico tetravalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3, y consta de dos cadenas largas de anticuerpo y dos cadenas cortas de anticuerpo; y

b) dos fragmentos Fv de cadena simple idénticos que se une específicamente a la c-Met humana,

dichos fragmentos Fv de cadena simple del apartado b) se fusionan con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico del extremo C o N de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo de longitud completa.

Otro aspecto de la presente invención es, pues, un anticuerpo biespecífico tetravalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la c-Met humana y consta de dos cadenas largas de anticuerpo y dos cadenas cortas de anticuerpo; y

b) dos fragmentos Fv de cadena simple idénticos que se une específicamente a la ErbB-3,

dichos fragmentos Fv de cadena simple del apartado b) se fusionan con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico del extremo C o N de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo de longitud completa.

Respecto a la estructura esquemática ilustrativa véase la figura 6b.

En una forma preferida de ejecución, dichos fragmentos Fab o Fv de cadena simple que se unen a la c-Met humana o a la ErbB-3 humana se fusionan con dicho anticuerpo de longitud completa mediante un conector peptídico en el extremo C de las cadenas largas de dicho anticuerpo de longitud completa.

Otra forma de ejecución de la presente invención es un anticuerpo biespecífico tetravalente que contiene

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana y consta de:

5 aa) dos cadenas largas de anticuerpo idénticas formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de cadena larga de anticuerpo (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante 2 de cadena larga de anticuerpo (CH2), y un dominio constante 3 de cadena larga de anticuerpo (CH3); y

10 ab) dos cadenas cortas de anticuerpo idénticas formadas en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL) (VL-CL); y

b) dos fragmentos Fab de cadena simple que se unen específicamente a la c-Met humana,

15 dichos fragmentos Fab de cadena simple están formados por un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) y un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL) y un engarce, y dichos dominios de dicho anticuerpo y dicho engarce tienen uno de los siguientes órdenes en la
20 dirección del extremo N al extremo C:

ba) VH-CH1-engarce-VL-CL, o bb) VL-CL-engarce-VH-CH1;

dicho engarce es un péptido de por lo menos 30 aminoácidos, con preferencia entre 32 y 50 aminoácidos;

y dichos fragmentos Fab de cadena simple del apartado b) se fusionan
25 con dicho anticuerpo de longitud completa del apartado a) mediante un conector peptídico del extremo C o N de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo de longitud completa;

dicho conector peptídico es un péptido de por lo menos 5 aminoácidos, con preferencia entre 10 y 50 aminoácidos.

30 El término "anticuerpo de longitud completa" se emplea en formato trivalente o tetravalente e indica un anticuerpo formado por dos "cadenas largas de anticuerpo de longitud completa" y dos "cadenas cortas de anticuerpo de longitud

completa" (ver la figura 1). Una "cadena larga de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido formado en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de cadena larga de anticuerpo (CH1), una región bisagra de anticuerpo (HR), un dominio constante 2 de cadena larga de anticuerpo (CH2) y un dominio constante 3 de cadena larga de anticuerpo (CH3), abreviado por VH-CH1-HR-CH2-CH3; y opcionalmente un dominio constante 4 de cadena larga de anticuerpo (CH4) en el caso de un anticuerpo del subgrupo IgE. Con preferencia, la "cadena larga de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido formado en la dirección del extremo N al extremo C por VH, CH1, HR, CH2 y CH3. Una "cadena corta de anticuerpo de longitud completa" es un polipéptido formado en la dirección del extremo N al extremo C por un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL), abreviado por VL-CL. El dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL) puede ser el κ (kappa) o el λ (lambda). Las dos cadenas de anticuerpo de longitud completa están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro entre polipéptidos, es decir entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagra de las cadenas largas del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de anticuerpos típicos de longitud completa son los anticuerpos naturales del tipo IgG (p.ej. IgG 1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos de longitud completa según la invención pueden ser de una sola especie, p.ej. humanos, o pueden ser anticuerpos quimerizados o humanizados. Los anticuerpos de longitud completa según la invención contienen dos sitios de fijación sobre antígeno, cada uno de ellos está formado por un par de VH y VL, estas dos se unen específicamente al mismo antígeno. El extremo C de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo de longitud completa indica el último aminoácido del extremo C de la cadena larga o corta. El extremo N de la cadena larga o corta de dicho anticuerpo de longitud completa indica el último aminoácido del extremo N de la cadena larga o corta.

El término "conector peptídico" se emplea en la invención para indicar un péptido con secuencias de aminoácidos, que es con preferencia de origen sintético. Estos conectores peptídicos según la invención se emplean para fusionar los fragmentos Fab de cadena simple con el extremo C o N del anticuerpo de longitud

completa para formar un anticuerpo multiespecífico según la invención. Con preferencia, dichos conectores peptídicos del apartado b) son péptidos con una secuencia de aminoácidos de una longitud por lo menos de 5 aminoácidos, con preferencia con una longitud de 5 a 100, con mayor preferencia de 10 a 50 aminoácidos. En una forma de ejecución, dicho conector peptídico es $(GxS)_n$ o $(GxS)_nG_m$, siendo G = glicina, S = serina, y $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ ó } 6, y m = 0, 1, 2 \text{ ó } 3)$ o $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ ó } 5 y m = 0, 1, 2 \text{ ó } 3)$, con preferencia $x = 4$ y $n = 2 \text{ ó } 3$, con mayor preferencia con $x = 4, n = 2$. Con preferencia, en los anticuerpos biespecíficos trivalentes, en los que un polipéptido VH o VH-CH1 y un polipéptido VL o VL-CL (figuras 7a-c) se han fusionado mediante dos conectores peptídicos idénticos con el extremo C de un anticuerpo de longitud completa; dichos conectores peptídicos son péptidos por lo menos de 25 aminoácidos, con preferencia péptidos entre 30 y 50 aminoácidos y con mayor preferencia dicho el conector peptídico es $(GxS)_n$ o $(GxS)_nG_m$, siendo G = glicina, S = serina y $(x = 3, n = 6, 7 \text{ ó } 8, y m = 0, 1, 2 \text{ ó } 3)$ o $(x = 4, n = 5, 6 \text{ ó } 7 y m = 0, 1, 2 \text{ ó } 3)$, con preferencia $x = 4$ y $n = 5, 6, 7$.

Un "fragmento Fab de cadena simple" (ver figura 2a) es un polipéptido que consta de un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena corta de anticuerpo (CL) y un engarce, dichos dominios de anticuerpo y dicho engarce tienen uno de los órdenes siguientes en la dirección del extremo N al extremo C: a) VH-CH1-engarce-VL-CL, b) VL-CL-engarce-VH-CH1, c) VH-CL-engarce-VL-CH1 o d) VL-CH1-engarce-VH-CL; y dicho engarce es un polipéptido de por lo menos 30 aminoácidos, con preferencia entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab de cadena simple a) VH-CH1-engarce-VL-CL, b) VL-CL-engarce-VH-CH1, c) VH-CL-engarce-VL-CH1 y d) VL-CH1-engarce-VH-CL, se estabilizan mediante el enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. El término "extremo N" indica el último aminoácido del extremo N, el término "extremo C" indica el último aminoácido del extremo C.

El término "engarce" se emplea en la invención en relación con los fragmentos Fab de cadena simple e indica un péptido con secuencias de aminoácidos, que es con preferencia de origen sintético. Estos péptidos según la son se

emplean para unir a) VH-CH1 con VL-CL, b) VL-CL con VH-CH1, c) VH-CL con VL-CH1 o d) VL-CH1 con VH-CL para formar los siguientes fragmentos Fab de cadena simple según la invención a) VH-CH1-engarce-VL-CL, b) VL-CL-engarce-VH-CH1, c) VH-CL-engarce-VL-CH1 o d) VL-CH1-engarce-VH-CL. Dicho engarce
5 dentro de los fragmentos Fab de cadena simple es un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de por lo menos 30 aminoácidos, con preferencia una longitud de 32 a 50 aminoácidos. En una forma de ejecución, dicho engarce es $(G_xS)_n$, siendo G = glicina, S = serina, ($x = 3$, $n = 8, 9$ ó 10 y $m = 0, 1, 2$ ó 3) o ($x = 4$ y $n = 6, 7$ ú 8 y $m = 0, 1, 2$ ó 3), con preferencia siendo $x = 4$, $n = 6$
10 ó 7 y $m = 0, 1, 2$ ó 3 , con mayor preferencia siendo $x = 4$, $n = 7$ y $m = 2$. En una forma de ejecución, dicho engarce es $(G_4S)_6G_2$.

En una forma preferida de ejecución, dichos dominios de anticuerpo y dicho engarce en dicho fragmento Fab de cadena simple tienen uno de los órdenes siguientes en la dirección del extremo N al extremo C:

15 a) VH-CH1-engarce-VL-CL, o b) VL-CL-engarce-VH-CH1, con mayor preferencia VL-CL-engarce-VH-CH1.

En otra forma preferida de ejecución, dichos dominios de anticuerpo y dicho engarce en dicho fragmento Fab de cadena simple tienen uno de los órdenes siguientes en la dirección del extremo N al extremo C:

20 a) VH-CL-engarce-VL-CH1 o b) VL-CH1-engarce-VH-CL.

Opcionalmente en dicho fragmento Fab de cadena simple, además del enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1, también el dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH) y el dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) se estabilizan con disulfuro mediante la introducción de un
25 enlace disulfuro entre las posiciones siguientes:

- i) la posición 44 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta,
- ii) la posición 105 del dominio variable de cadena larga y la posición 43 del dominio variable de cadena corta, o
- 30 iii) la posición 101 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta (numeración siempre con arreglo al índice EU de Kabat).

Dicha estabilización adicional con disulfuro de los fragmentos Fab de cadena simple se logra con la introducción de un enlace disulfuro entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab de cadena simple. Las técnicas para introducir puentes disulfuro no naturales para la estabilización de un Fv de cadena simple se han descrito p.ej. en WO 94/029350, Rajagopal, V. y col., Prot. Engin. 1453-59, (1997); Kobayashi, H. y col., Nuclear Medicine & Biology 25, 387-393, 1998; o Schmidt, M. y col., Oncogene 18, 1711-1721, 1999. En una forma de ejecución, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los fragmentos Fab de cadena simple existentes en el anticuerpo según la invención se sitúa entre la posición 44 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta. En una forma de ejecución, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los fragmentos Fab de cadena simple existente en el anticuerpo según la invención se sitúa entre la posición 105 del dominio variable de cadena larga y la posición 43 del dominio variable de cadena corta (numeración siempre con arreglo al índice EU de Kabat).

En una forma de ejecución, son preferidos los fragmentos Fab de cadena simple sin dicha estabilización opcional con disulfuro entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab de cadena simple.

Un "fragmento Fv de cadena simple" (ver figura 2b) es un polipéptido que consta de un dominio variable de cadena larga de anticuerpo (VH), un dominio variable de cadena corta de anticuerpo (VL) y un Fv de cadena simple-engarce, dichos dominios de anticuerpo y dicho Fv de cadena simple-engarce tienen uno de los órdenes siguientes en la dirección del extremo N al extremo C: a) VH-Fv de cadena simple-engarce-VL, b) VL-Fv de cadena simple-engarce-VH; con preferencia a) VH-Fv de cadena simple-engarce-VL, y dicho Fv de cadena simple-engarce es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, en una forma de ejecución una longitud de por lo menos 20 aminoácidos. El término "extremo N" indica el último aminoácido del extremo N. El término "extremo C" indica el último aminoácido del extremo C.

El término "Fv de cadena simple-engarce" empleado en el fragmento Fv de cadena simple indica un péptido con secuencias de aminoácidos, que es con preferencia de origen sintético. Dicho Fv de cadena simple-engarce es un péptido

con una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, en una forma de ejecución una longitud de por lo menos 20 aminoácidos y con preferencia una longitud entre 15 y 30 aminoácidos. En una forma de ejecución, dicho Fv de cadena simple-engarce es $(GxS)_n$, en el que G = glicina, S = serina, ($x = 3$ y $n = 4, 5$ ó 6) o ($x = 4$ y $n = 3, 4, 5$ ó 6), con preferencia con $x = 4$, $n = 3, 4$ ó 5 , con mayor preferencia con $x = 4$, $n = 3$ ó 4 . En una forma de ejecución, dicho Fv de cadena simple-engarce es $(G_4S)_3$ o $(G_4S)_4$.

Además dichos fragmentos Fv de cadena simple están con preferencia estabilizados con disulfuro. Dicha estabilización adicional con disulfuro de los anticuerpos de cadena simple se realiza mediante la introducción de un enlace disulfuro entre los dominios variables de los anticuerpos de cadena simple y se ha descrito p.ej. en WO 94/029350, Rajagopal, V. y col., Prot. Engin. 10, 1453-59, 1997; Kobayashi, H. y col., Nuclear Medicine & Biology 25, 387-393, 1998; o Schmidt, M. y col., Oncogene 18, 1711-1721, 1999.

En una forma de ejecución de los fragmentos Fv de cadena simple estabilizados con disulfuro, el enlace disulfuro entre los dominios variables de los fragmentos Fv de cadena simple existentes en el anticuerpo según la invención se elige con independencia de cada fragmento Fv de cadena simple entre:

- i) la posición 44 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta,
- ii) la posición 105 del dominio variable de cadena larga y la posición 43 del dominio variable de cadena corta, o
- iii) la posición 101 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta.

En una forma de ejecución, el enlace disulfuro entre los dominios variables de los fragmentos Fv de cadena simple existente en el anticuerpo según la invención se sitúa entre la posición 44 del dominio variable de cadena larga y la posición 100 del dominio variable de cadena corta.

El anticuerpo según la invención se produce por medios recombinantes. Es, pues, un aspecto de la presente invención un ácido nucleico que codifica al anticuerpo según la invención y otro aspecto es una célula que contiene dicho ácido nucleico que codifica a un anticuerpos según la invención. Los métodos de

producción recombinante son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y consisten en la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas y el posterior aislamiento del anticuerpo y normalmente la purificación del mismo hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión recién mencionada de los anticuerpos en una célula hospedante se insertan los ácidos nucleicos que codifican a las respectivas cadenas corta y larga modificadas en vectores de expresión por métodos estándar. La expresión se realiza en células hospedantes procariotas o eucariotas apropiadas, por ejemplo las células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levadura o células de *E. coli*, y se recupera el anticuerpo de las células (líquido sobrenadante o células después de la lisis). Los métodos generales de producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos en el estado de la técnica y se han descrito, por ejemplo, en artículos de revistas científicas, de autores como Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 183-202, 1999; Geisse, S. y col., *Protein Expr. Purif.* 8, 271-282, 1996; Kaufman, R., *J. Mol. Biotechnol.* 16, 151-160, 2000; Werner, R.G., *Drug Res.* 48, 870-880, 1998.

Los anticuerpos biespecíficos se separan del medio de cultivo de modo conveniente por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina, por ejemplo proteína A-sefariosa, cromatografía a través de hidroxilapatita, electroforesis a través de gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA y el RNA que codifican a los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia aplicando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuentes de dichos DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión, que se transfectan a células hospedantes del tipo células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producirían proteína de inmunoglobulina para realizar la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células hospedantes.

Las variantes de secuencias de aminoácidos (o mutantes) del anticuerpo biespecífico se obtienen introduciendo los cambios apropiados de nucleótidos en el DNA del anticuerpo o por síntesis de nucleótidos. Sin embargo, estas modificaciones pueden realizarse solamente en un intervalo muy limitado, p.ej. del modo antes descrito. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características del

anticuerpo antes mencionadas, por ejemplo el isotipo de IgG y la fijación sobre el antígeno, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

El término "célula hospedante" se emplea en la presente solicitud para in-
5 dicar cualquier tipo de sistema celular que puede diseñarse para generar los anti-
cuerpos según la presente invención. En una forma de ejecución, las células
HEK293 y las células CHO se emplean como células hospedantes. Tal como se
emplea aquí, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se emplean
indistintamente y todas las denominaciones incluyen a la progenie. Por tanto, las
10 palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto pri-
maria y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de
transferencias. Se da también por supuesto que toda la progenie puede que no
sea exactamente idéntica en cuanto al contenido de DNA, debido a las mutacio-
nes deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma
15 función o actividad biológica que se ha explorado en la célula transformada origi-
nal.

La expresión en células NS0 se ha descrito p.ej. en Barnes, L.M. y col.,
Cytotechnology 32, 109-123, 2000; Barnes, L.M. y col., Biotech. Bioeng. 73, 261-
270, 2001. La expresión transitoria se ha descrito p.ej en Durocher, Y. y col., Nucl.
20 Acids. Res. 30, E9, 2002. La clonación de los dominios variables se ha descrito en
Orlandi, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833-3837, 1989; Carter, P. y
col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289, 1992; y Norderhaug, L. y col., J.
Immunol. Methods 204, 77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferido
(HEK 293) se ha descrito en Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., en Cytotech-
25 nology 30, 71-83, 1999 y en Schlaeger, E.-J., en J. Immunol. Methods 194, 191-
199, 1996.

Las secuencias de control idóneas para procariotas, por ejemplo, incluyen
un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión a un
ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, intensificadores
30 y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una
relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de

una pre-secuencia o líder secretorio está unido operativamente con un DNA de un polipéptido si se expresa como pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está unido operativamente con una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de un ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificadora si está posicionado de tal manera que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que se van a unir son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, son contiguas y están dentro del marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza por ligación en sitios de restricción oportunos. Si no existen tales sitios, se emplearán adaptadores o engarces oligonucleótidos sintéticos con arreglo a la práctica convencional.

La purificación de anticuerpos se realiza con el fin de eliminar componentes celulares u otros contaminantes, p.ej. otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándar, incluido el tratamiento alcalino/SDS, el contraste (banding) con CsCl, la cromatografía de columna, la electroforesis a través de gel de agarosa y otros métodos bien conocidos de la técnica, véase Ausubel, F. y col., coord., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987). Los diferentes métodos se han consolidado y se emplean con frecuencia para la purificación de proteínas, por ejemplo la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (p.ej. cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (p.ej. intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y de intercambio mixto), la adsorción tiófila (p.ej. con beta-mercapto-etanol y otros ligandos SH), la interacción hidrófoba o la cromatografía de adsorción aromática (p.ej. con fenil-sefarrowa, resinas aza-arenófilas o con ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con quelatos metálicos (p.ej. con material de afinidad Ni(II) y Cu(II)), la cromatografía de exclusión de tamaños y los métodos electroforéticos (por ejemplo la electroforesis a través de gel, la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75, 93-102, 1998).

Tal como se emplean aquí, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se emplean indistintamente y todas las denominaciones incluyen la

progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. Se da también por supuesto que toda la progenie puede que no sea exactamente idéntica en cuanto al contenido de DNA, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que se ha explorado en la célula transformada original. Cuando existan distintas denominaciones, su significado resultará claro por el contexto.

El término "transformación" se emplea aquí para indicar un proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una célula hospedante. Si se emplean como células hospedantes células sin barrera de pared celular formidable, la transfección se puede llevar a cabo p.ej. por el método de precipitación con fosfato cálcico descrito por Graham, F.L., van der Eb, A.J., *Virology* 52, 456-467, 1978. Sin embargo pueden emplearse también otros métodos de introducción del DNA en las células, como son la inyección nuclear o la fusión de protoplastos. Si se emplean células procariotas o células que contienen construcciones sustanciales de pared celular, p.ej. un método de transfección el tratamiento con calcio empleando el cloruro cálcico, descrito por Cohen, S.N. y col., *PNAS.* 69, 2110-2114, 1972.

Tal como se emplea aquí, "expresión" indica el proceso por el que un ácido nucleico se transcribe al mRNA y/o el proceso por el que el mRNA transcrito (también llamado transcrito) se traduce seguidamente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente productos genéticos. Si el polinucleótido deriva del DNA genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el empalme del mRNA.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular una molécula autorreplicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada a y/o entre células hospedantes. El término incluye a los vectores que funcionan primariamente para la inserción de DNA o RNA en una célula (p.ej., integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan primariamente para la replicación de DNA o RNA y vectores de expresión que funcionan para la transcripción

y/o traducción del DNA o RNA. Se incluyen también los vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula hospedante apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión" se emplea normalmente para indicar una célula hospedante apropiada que consta de un vector de expresión que puede funcionar para generar un producto de expresión deseado.

Composición farmacéutica

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención. Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de una composición farmacéutica. Otro aspecto de la invención es un método para la fabricación de una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, p.ej. una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo según la presente invención, formulado junto con un vehículo farmacéutico.

Una forma de ejecución de la invención es el anticuerpo biespecífico según la invención para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es método de tratamiento de un paciente que sufre un cáncer que consiste en administrar un anticuerpo según la invención a un paciente que necesite dicho tratamiento.

Tal como se emplea aquí, "vehículo farmacéutico" incluye a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Con preferencia, el vehículo es idóneo para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p.ej. por inyección o infusión).

Una composición de la presente invención puede administrarse por una gran variedad de métodos ya conocidos de la técnica. Los expertos sabrán apreciar que la vía y/o el modo de administración pueden variar en función de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención por ciertas
5 vías de administración, puede ser necesario revestir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen la solución salina y las soluciones acuosas tamponadas. Los vehículos
10 farmacéuticos incluyen las soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas ya es conocido en la técnica.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral"
15 se emplea aquí para indicar los modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección e incluyen, sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e
20 intraesternal y la infusión.

El término cáncer se emplea aquí para indicar enfermedades proliferativas, por ejemplo linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no de células pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioloalveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o
25 cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de glándula tiroides, cáncer de
30 glándula paratiroides, cáncer de cápsula suprarrenales, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de

riñones o de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewings, incluidas las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres recién mencionados o las combinaciones de uno o más de los cánceres anteriores.

Otro aspecto de la invención es el anticuerpo biespecífico según la invención o dicha composición farmacéutica como agente anti-angiogénico. Tal agente anti-angiogénico puede utilizarse para el tratamiento del cáncer, en especial tumores sólidos y otras enfermedades vasculares.

Una forma de ejecución de la invención es el anticuerpo biespecífico según la invención para el tratamiento de enfermedades vasculares.

Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades vasculares.

Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades vasculares.

Otro aspecto de la invención es método de tratamiento de paciente que sufre enfermedades vasculares mediante la administración un anticuerpo según la invención a un paciente que necesite dicho tratamiento.

El término "enfermedades vasculares" incluye el cáncer, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, isquemia, trauma, sepsis, COPD, asma, diabetes, AMD, retinopatía, apoplejía, adiposidad, lesión pulmonar aguda, hemorragias, derrame vascular, p.ej. inducido por citoquinas, alergia, enfermedad de Graves, tiroiditis autoinmune de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, arteritis de células gigantes, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis por lupus, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, colitis ulcerante, en especial los tumores sólidos, síndromes neovasculares intraoculares, por ejemplo retinopatías proliferativas o la degeneración macular debida a la edad (AMD), artritis reumatoide y psoriasis (Folkman, J., Shing, Y. y col., J. Biol. Chem. 267, 10931-10934, 1992; Klagsbrun, M. y col., Annu. Rev. Physiol. 53, 217-239, 1991; y Gar-

ner, A., Vascular diseases, en: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A. y Klintworth, G.K., (coord.), 2ª edición, Marcel Dekker, Nueva York 1994, pp. 1625-1710).

Estas composiciones pueden contener también adyuvantes como son los
5 conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto con procedimientos de esterilización, ver más arriba, como por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, paraben, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede ser también deseable la inclusión en las
10 composiciones de agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro sódico y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción, como son el monoesterato de aluminio y la gelatina.

Con independencia de la vía de administración elegida, los compuestos
15 de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales, que los expertos ya conocen.

Los niveles actuales de dosificación de los ingredientes activos en las
20 composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse con el fin de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada en un paciente, una composición y un modo de administración concretos, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación elegido dependerá de un gran número de factores farmacocinéticos, incluida la actividad de las composiciones concretas de la presente invención que se empleen,
25 la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto concreto que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales que se utilicen en combinación con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado patológico, el
30 estado general de salud y el historial médico previo del paciente a tratar así como los factores bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición tiene que ser estéril y líquida en un grado tal que la composición pueda administrarse con una jeringuilla. Además del agua, el vehículo es con preferencia una solución salina tamponada isotónica.

La fluidez correcta puede mantenerse, por ejemplo, con el uso de recubrimiento, tal como la lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y con el uso de tensioactivos. En muchos casos es preferible incorporar a la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como la manita o la sorbita y cloruro sódico.

Ahora se ha encontrado que los anticuerpos biespecíficos según la presente invención contra la ErbB-3 humana y la c-Met humana tienen características valiosas, por ejemplo su actividad biológica o farmacológica. Los anticuerpos biespecíficos <ErbB3-c-Met> según la invención presentan una internalización reducida si se comparan con sus anticuerpos originales <ErbB3> y/o <c-Met>.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se presentan para facilitar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se define en las reivindicaciones adjuntas. Se da por supuesto que pueden introducirse modificaciones a los procedimientos definidos sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de las secuencias de aminoácidos

- | | | |
|----|---------------|---|
| 20 | SEQ ID NO: 1 | dominio variable de cadena larga, clon 29 de HER3 <ErbB3> |
| | SEQ ID NO: 2 | dominio variable de cadena corta, clon 29 de HER3 <ErbB3> |
| | SEQ ID NO: 3 | dominio variable de cadena larga, Mab 5D5 <c-Met> |
| | SEQ ID NO: 4 | dominio variable de cadena corta, Mab 5D5 <c-Met> |
| | SEQ ID NO: 5 | cadena larga, clon 29 de HER3 <ErbB3> |
| 25 | SEQ ID NO: 6 | cadena corta, clon 29 de HER3 <ErbB3> |
| | SEQ ID NO: 7 | cadena larga, Mab 5D5 <c-Met> |
| | SEQ ID NO: 8 | cadena corta, Mab 5D5 <c-Met> |
| | SEQ ID NO: 9 | cadena larga, Fab 5D5 <c-Met> |
| | SEQ ID NO: 10 | cadena corta, Fab 5D5 <c-Met> |
| 30 | SEQ ID NO: 11 | cadena larga 1, Her3/Met_KHSS <ErbB3-c-Met> |
| | SEQ ID NO: 12 | cadena larga 2, Her3/Met_KHSS <ErbB3-c-Met> |
| | SEQ ID NO: 13 | cadena corta, Her3/Met_KHSS <ErbB3-c-Met> |

	SEQ ID NO: 14	cadena larga 1, Her3/Met_SSKH <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 15	cadena larga 2, Her3/Met_SSKH <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 16	cadena corta, Her3/Met_SSKH <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 17	cadena larga 1, Her3/Met_SSKHSS <ErbB3-c-Met>
5	SEQ ID NO: 18	cadena larga 2, Her3/Met_SSKHSS <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 19	cadena corta, Her3/Met_SSKHSS <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 20	cadena larga 1, Her3/Met_1C <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 21	cadena larga 2, Her3/Met_1C <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 22	cadena corta, Her3/Met_1C <ErbB3-c-Met>
10	SEQ ID NO: 23	cadena larga 1, Her3/Met_6C <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 24	cadena larga 2, Her3/Met_6C <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 25	cadena corta, Her3/Met_6C <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 26	cadena larga 1, Her3/Met_scFvSSKHSS <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 27	cadena larga 2, Her3/Met_scFvSSKHSS <ErbB3-c-Met>
15	SEQ ID NO: 28	cadena corta, Her3/Met_scFvSSKHSS <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 29	cadena larga 1, Her3/Me_scFvSSKH <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 30	cadena larga 2, Her3/Me_scFvSSKH <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 31	cadena corta, Her3/Me_scFvSSKH <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 32	cadena larga 1, Her3/Me_scFvKH <ErbB3-c-Met>
20	SEQ ID NO: 33	cadena larga 2, Her3/Me_scFvKH <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 34	cadena corta Her3/Me_scFvKH <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 35	cadena larga 1 Her3/Me_scFvKHSB <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 36	cadena larga 2 Her3/Me_scFvKHSB <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 37	cadena corta Her3/Me_scFvKHSB <ErbB3-c-Met>
25	SEQ ID NO: 38	cadena larga 1, Her3/Met_scFvKHSBSS <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 39	cadena larga 2, Her3/Met_scFvKHSBSS <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 40	cadena corta, Her3/Met_scFvKHSBSS <ErbB3-c-Met>
	SEQ ID NO: 41	región constante de cadena larga de IgG1 humana
	SEQ ID NO: 42	región constante de cadena larga de IgG3 humana
30	SEQ ID NO: 43	región constante de cadena corta kappa humana
	SEQ ID NO: 44	región constante de cadena corta lambda humana
	SEQ ID NO: 45	c-Met humana

	SEQ ID NO: 46	ErbB-3 humana
	SEQ ID NO: 47	dominio variable de cadena larga VH, Mab 205 (murino) <ErbB3>
5	SEQ ID NO: 48	dominio variable de cadena corta VL, Mab 205 (murino) <ErbB3>
	SEQ ID NO: 49	dominio variable de cadena larga VH, Mab 205.10 (humaniza- do) <ErbB3>
	SEQ ID NO: 50	dominio variable de cadena corta VL, Mab 205.10.1 (humani- zado) <ErbB3>
10	SEQ ID NO: 51	dominio variable de cadena corta VL, Mab 205.10.2 (humani- zado) <ErbB3>
	SEQ ID NO: 52	dominio variable de cadena corta VL, Mab 205.10.3 (humani- zado) <ErbB3>
	SEQ ID NO: 53	cadena larga CDR3H, Mab 205.10 <ErbB3>
15	SEQ ID NO: 54	cadena larga CDR2H, Mab 205.10 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 55	cadena larga CDR1H, Mab 205.10 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 56	cadena corta CDR3L, Mab 205.10 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 57	cadena corta CDR2L, Mab 205.10 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 58	cadena corta CDR1L, (variante 1), Mab 205.10 <ErbB3>
20	SEQ ID NO: 59	cadena corta CDR1L, (variante 2), Mab 205.10 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 60	cadena larga CDR3H, clon 29 de HER3 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 61	cadena larga CDR2H, clon 29 de HER3 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 62	cadena larga CDR1H, clon 29 de HER3 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 63	cadena corta CDR3L, clon 29 de HER3 <ErbB3>
25	SEQ ID NO: 64	cadena corta CDR2L, clon 29 de HER3 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 65	cadena corta CDR1L, clon 29 de HER3 <ErbB3>
	SEQ ID NO: 66	cadena larga CDR3H, Mab 5D5 <c-Met>
	SEQ ID NO: 67	cadena larga CDR2H, Mab 5D5 <c-Met>
	SEQ ID NO: 68	cadena larga CDR1H, Mab 5D5 <c-Met>
30	SEQ ID NO: 69	cadena corta CDR3L, Mab 5D5 <c-Met>
	SEQ ID NO: 70	cadena corta CDR2L, Mab 5D5 <c-Met>
	SEQ ID NO: 71	cadena corta CDR1L, Mab 5D5 <c-Met>

Descripción de las figuras

- Figura 1 Estructura esquemática de un anticuerpo de longitud completa sin dominio CH4 que se une específicamente a un primer antígeno 1 con dos pares de cadena larga y corta que contienen dominios variables y constantes en un orden típico.
- Figura 2a-c Estructura esquemática de un anticuerpo biespecífico bivalente <ErbB3/c-Met>, que contiene: a) la cadena corta y la cadena larga de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la ErbB-3 humana; y b) la cadena corta y la cadena larga de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a la c-Met humana, en el que los dominios constantes CL y CH1, y/o los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, que se han modificado con la tecnología "botones dentro de ojales"
- Figura 3 Representación esquemática de un anticuerpo biespecífico trivalente <ErbB3/c-Met> según la invención, que contiene un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al primer antígeno 1, con el que:
- a) figura 3a: se han fusionado dos polipéptidos VH y VL (los dominios VH y VL de los dos forman, juntos, un sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente al segundo antígeno 2);
- b) figura 3b: se han fusionado dos polipéptidos VH-CH1 y VL-CL (los dominios VH y VL de los dos forman, juntos, un sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente al segundo antígeno 2);
- figura 3c: representación esquemática de un anticuerpo biespecífico trivalente según la invención, que contiene un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al primer antígeno 1, con el que se han fusionado dos polipéptidos VH y VL (los dominios VH y VL de los dos forman, juntos, un sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente al segundo antígeno 2) con "botones y ojales";

- figura 3d: Representación esquemática de un anticuerpo biespecífico trivalente según la invención, que contiene un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al primer antígeno, con el que se han fusionado dos polipéptidos VH y VL (los dominios VH y VL de los dos forman, juntos, un sitio de fijación sobre antígeno que se une específicamente al segundo antígeno 2; estos dominios VH y VL contienen un puente disulfuro entre las cadenas, situado entre las posiciones VH44 y VL100) con "botones y ojales"
- 5
- 10 Figura 4 4a: Estructura esquemática de los cuatro fragmentos posibles Fab de cadena simple
4b: Estructura esquemática de los dos fragmentos Fv de cadena simple
- 15 Figura 5 Estructura esquemática de un anticuerpo biespecífico trivalente <ErbB3/c-Met> que contiene un anticuerpo de longitud completa y un fragmento Fab de cadena simple (figura 5a) o un fragmento Fv de cadena simple (figura 5b) - ejemplo biespecífico trivalente con botones y ojales
- 20 Figura 6 Estructura esquemática de un anticuerpo biespecífico tetravalente <ErbB3/c-Met> que contiene un anticuerpo de longitud completa y dos fragmentos Fab de cadena simple (figura 6a) o dos fragmentos Fv de cadena simple (figura 6b) - los sitios de unión a la c-Met se derivan de anticuerpos que inhiben la dimerización de la c-Met;
- 25 Figura 7 Estructura esquemática de un anticuerpo biespecífico bivalente <ErbB3-c-Met>, en el que un brazo Fab se ha reemplazado por un fragmento scFab;
- 30 Figura 8 Fijación de anticuerpos biespecíficos sobre la superficie de células cancerosas;
- Figura 9 Inhibición de la fosforilación del receptor de c-Met inducida por el HGF con formatos de anticuerpo biespecífico Her3/c-Met
- Figura 10 Inhibición de la fosforilación del receptor de Her3 inducida por el HRG con formatos de anticuerpo biespecífico Her3/c-Met;

- Figuras 11, 12 y 13 Inhibición de la proliferación de células HUVEC inducida por el HGF con formatos de anticuerpo biespecífico Her3/c-Met
- Figura 14 Inhibición de la proliferación de la línea celular cancerosa A431 con formatos de anticuerpo biespecífico Her3/c-Met
- 5 Figuras 15 y 16 Análisis de la inhibición de la diseminación (scattering) célula-célula inducida por el HGF en la línea celular cancerosa A431 con formatos de anticuerpo biespecífico Her3/c-Met;
- Figura 17 Análisis de la expresión de la Her3 y de la c-Met en la superficie de las células de cuatro líneas celulares diferentes;
- 10 Figura 18 Análisis de la internalización de receptor mediada por anticuerpo en las líneas celulares cancerosas A431, A549 y DU145;
- Figura 19 Análisis de la migración de las células A431 inducida por el HGF. A. Migración de las células cancerosas medida como función de la impedancia en presencia de una dosis creciente del anticuerpo biespecífico MH_TvAb18. Se representan la lectura final después de 24 h. B. Como control se añade una IgG humana inespecífica en un intervalo de concentraciones similar al del anticuerpo biespecífico;
- 15
- Figura 20 Análisis de la unión cruzada célula-célula con el anticuerpo biespecífico Her3/c-Met_scFv_SSKH en células HT29 (tinción con los colorantes PKH26 & PKH67 (SIGMA))
- 20
- Figura 21 SDS-PAGE de los anticuerpos Her3/Met_scFvSS_KH (lado izquierdo) y Her3/Met_scFv_KH (lado derecho), biespecíficos de Her3/c-Met;
- 25 Figura 22 Análisis HP-SEC (proteína purificada) de los anticuerpos Her3/Met_scFvSSKH (figura 22a) y Her3/MetscFv_KH biespecíficos de Her3/c-Met (figura 22b).

Procedimiento experimental

Ejemplos

30 Materiales y métodos

Técnicas de DNA recombinante

Para manipular el DNA se aplican los métodos estándar descritos en Sambrook, J. y col., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos de biología molecular se emplean con arreglo a las instrucciones del fabricante.

5 Análisis de secuencias de DNA y de proteínas y gestión de los datos de las secuencias

La información general respecto a las secuencias de nucleótido de las cadenas cortas y largas de inmunoglobulinas humanas se encontrará en: Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta ed., NIH, publicación nº 91-3242. Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se numeran y nombran según la numeración EU (Edelman, G.M. y col., PNAS 63, 78-85, 10 1969; Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta ed., publicación NIH nº 91-3242). Para la creación de la secuencia, mapeo, análisis e ilustración se emplean el paquete informático GCG (Genetics Computer 15 Group, Madison, Wisconsin), versión 10.2 y el programa Infomax's Vector NTI Advance suite, versión 8.0.

Secuenciación del DNA

Se determinan las secuencias de DNA por secuenciación de doble hebra realizada en SequiServe (Vaterstetten, Alemania) y Geneart AG (Regensburg, 20 Alemania).

Síntesis genética

Los segmentos de genes deseados se preparan en Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis genética automatizada. Los segmentos de genes, que están flanqueados por sitios de rotura de endonucleasa de restricción singular se clonan en plásmidos pGA18 (ampR). Se purifica el DNA plásmido a partir de las bacterias transformadas y la concentración se determina por espectroscopía UV. La secuencia de DNA de los fragmentos de genes subclonados se confirma por secuenciación del DNA. Se sintetizan los segmentos de genes que codifican la cadena larga de anticuerpo de Her3 modificada "botones-en-ojales" (clon 29), que lleva una mutación T366W en el dominio CH3, con una región VH de 5D5 en el extremo C unida 30 mediante un conector peptídico (G₄S)_n con sitios de restricción 5'-BamHI y 3'-

XbaI. De manera similar se preparan por síntesis genética secuencias de DNA que codifican a la cadena larga de anticuerpo Her3 (clon 29) modificada por "botones en ojales", que lleva las mutaciones S354C y T366W en el dominio CH3 con una región VH de 5D5 del extremo C unida mediante un conector peptídico $(G_4S)_n$ así como la cadena larga de anticuerpo Her3 (clon 29) modificada por "botones en ojales" que lleva las mutaciones Y349C, T366S, L368A y Y407V, con una región VL de 5D5 del extremo C unida mediante un conector peptídico $(G_4S)_n$, flanqueadas con sitios de restricción BamHI y XbaI. Finalmente se sintetizan secuencias de DNA que codifican a las cadenas larga y corta sin modificar del anticuerpos Her3 (clon 29) y 5D5, flanqueadas con sitios de restricción BamHI y XbaI. Todos los constructos se diseñan con una secuencia de DNA del extremo 5' que codifica a un péptido líder (MGWSCIIILFLVATATGVHS), que se dirige a proteínas que se segregan en células eucariotas. La síntesis genética de otros anticuerpos biespecíficos que se describen a continuación se realiza de modo similar, empleando el elemento correspondiente de la región variable y constante (p.ej. el que se especifica en la siguiente sección de diseño y en las tablas de 1 a 5).

Construcción de plásmidos de expresión

Se emplea un vector de expresión Roche para la construcción de todos los plásmidos de expresión que codifican a la proteína de fusión scFv de cadena larga y corta. El vector se compone de los elementos siguientes:

- un gen de resistencia a la higromicina como marcador de selección,
- un origen de replicación, oriP, de virus de Epstein-Barr (EBV),
- un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*,
- un gen de beta-lactamasa que confiere resistente a la ampicilina en *E. coli*,
- el intensificador inmediato anterior y el promotor del citomegalovirus humano (HCMV),
- la secuencia de señal de poliadenilación de 1-inmunoglobulina humana ("poly A") y
- sitios de restricción únicos BamHI y XbaI.

Los genes de fusión de inmunoglobulina que contienen los constructos de cadena corta o larga así como los constructos de "botones-en-ojales" con domi-

nios VH y VL de extremo C se obtienen por síntesis genética y se clonan en plásmidos pGA18 (ampR) del modo descrito. Los plásmidos pG18 (ampR) que llevan los segmentos de DNA sintetizado y el vector de expresión Roche se digieren con enzimas de restricción BamHI y XbaI (Roche Molecular Biochemicals) y se someten a electroforesis a través de gel de agarosa. Después se ligan los segmentos de DNA codificador de cadena corta y larga al fragmento BamHI/XbaI del vector de expresión Roche aislado obteniéndose los vectores de expresión finales. Se transforman los vectores de expresión finales en células de *E. coli*, se aísla el DNA de plásmido de expresión (Miniprep) y se somete a análisis con enzimas de restricción y a secuenciación del DNA. Se cultivan los clones correctos en 150 ml de medio LB-Amp, se aísla de nuevo el DNA plásmido (Maxiprep) y se confirma la integridad de secuencia por secuenciación del DNA.

Expresión transitoria de variantes de inmunoglobulina en células HEK293

Se expresan variantes de inmunoglobulina recombinante por transfección transitoria de células 293-F de riñón embrionario humano empleando el sistema de expresión FreeStyle™ 293 con arreglo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, EE.UU.). Resumiendo, se cultivan en suspensión las células FreeStyle™ 293-F en un medio de expresión FreeStyle™ 293 a 37°C con un 8 % de CO₂ y se siembran las células en medio fresco, con una densidad de 1-2x10⁶ células viables/ml el día de la transfección. Se preparan complejos de DNA-293fectina™ en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, EE.UU.) empleando 325 µl de la 293fectina™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de DNA plásmido de cadena larga y corta en una proporción molar 1:1 para un volumen final de transfección de 250 µl. Se preparan complejos de tipo "botones-en-ojales" de DNA-293fectina en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, EE.UU.) empleando 235 µl de la 293fectina™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg del DNA plásmido de cadena larga 1 y 2 y de cadena corta "botones-en-ojales" en una proporción molar de 1:1:2 para un volumen final de transfección de 250 µl. Se recogen por centrifugación a 14000 g durante 30 minutos los líquidos sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpos a los 7 días de la transfección y se filtran en un filtro estéril (0,22 µm). Se almacenan los líquidos sobrenadantes a -20°C hasta el momento de la purificación.

Purificación de anticuerpos biespecíficos y de control

Se purifican los anticuerpos biespecíficos y los de control de los líquidos sobrenadantes de los cultivos celulares por cromatografía de afinidad empleando la Proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Suecia) y la cromatografía de exclusión de tamaños Superdex200. Resumiendo, se depositan los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares filtrados en condiciones estériles sobre la parte superior de una columna HiTrap Proteína A HP (5 ml) equilibrada con tampón PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl y 2,7 mM KCl, de pH = 7,4). Se eliminan por lavado con tampón de equilibrado las proteínas no fijadas. Se eluyen los anticuerpos y las variantes de anticuerpo con tampón citrato 0,1 M, de pH 2,8, y se neutralizan las fracciones que contienen proteínas con 0,1 ml de tampón Tris 1 M, de pH 8,5. Después se recogen las fracciones que contienen proteína eluida, se concentran en un dispositivo de filtro centrifugador Amicon Ultra (MWCO: 30 K, Millipore) hasta un volumen de 3 ml y se depositan en la parte superior de una columna de filtración a través de gel Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60 (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con 20 mM histidina, 140 mM NaCl, de pH 6,0. Se recogen las fracciones que contienen anticuerpos biespecíficos y de control purificados, que tienen menos de un 5 % de agregados de peso molecular elevado y se almacenan a -80°C en forma de partes alícuotas de 1,0 mg/ml. Se generan los fragmentos Fab por digestión en papaína del anticuerpo monoclonal 5D5 purificado y posterior eliminación de los dominios Fc contaminantes por cromatografía de Proteína A. Se siguen purificando los fragmentos Fab no fijados por cromatografía en columna de filtración a través de gel Superdex 200 HiLoad 120 ml 16/60 (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con 20 mM histidina, 140 mM NaCl, de pH 6,0, se reúnen y se almacenan a -80°C en forma de partes alícuotas de 1,0 mg/ml.

25 Análisis de las proteínas purificadas

Se determina la concentración de proteína de las muestras de proteína purificada midiendo la densidad óptica (OD) a 280 nm, empleando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. Se analizan la pureza y el peso molecular de los anticuerpos biespecíficos y los de control por SDS-PAGE en presencia y en ausencia de un agente reductor (5 mM 1,4-ditiotreitol) y tinción con el colorante azul brillante Coomassie (véase por ejemplo la figura 21: SDS-PAGE de los anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met: el

Her3/metscFvSS_KH (lado izquierdo) y el Her3/MetscFv_KH (lado derecho)). Se emplea el sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast gel system (Invitrogen, USA) con arreglo a las instrucciones del fabricante (geles de Tris-glicina del 4-20 %). Se analiza el contenido de agregados en las muestras de anticuerpos biespecíficos y de control mediante SEC de alta eficacia empleando una columna analítica de exclusión de tamaños Superdex 200 (GE Healthcare, Suecia) en un tampón de trabajo 200 mM KH_2PO_4 , 250 mM KCl, de pH 7,0 a 25°C. Se inyectan 25 µg de proteína en la columna con un caudal de 0,5 ml/min y se someten a elución isocrática durante 50 minutos. Para los análisis de estabilidad se incuban concentraciones de 1 mg/ml de proteínas purificadas a 4°C y 40°C durante 7 días y después se evalúan por SEC de alta eficacia (p.ej. análisis HP-SEC (proteína purificada) de los anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met: el Her3/metscFvSS_KH (figura 22a) y el Her3/MetscFv_KH (figura 22b)). Se verifica la integridad del esqueleto de aminoácidos de las cadenas larga y corta del anticuerpo biespecífico reducido por espectrometría de masas Q-TOF con nanoelectro-espray después de haber eliminado los N-glucanos por tratamiento enzimático con la Péptido-N-Glucosidasa F (Roche Molecular Biochemicals). Los rendimientos son p.ej. para los anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met: para el Her3/metscFvSS_KH = 28,8 mg/l (proteína A y SEC) y para el Her3/MetscFv_KH = 12,3 mg/l (proteína A y SEC).

20 Ensayo de fosforilación de la c-Met

Se siembran 5×10^5 células A549 por hoyo en una placa de 6 hoyos el día antes de la estimulación HGF en un medio RPMI con un 0,5 % de FCS (suero fetal bovino). Al día siguiente se reemplaza el medio de cultivo durante una hora por medio RPMI que contiene un 0,2 % de BSA (albúmina de suero bovino). Después se añaden 5 µg/ml del anticuerpo biespecífico al medio y se incuban las células durante 10 minutos, después se añade el HGF durante 10 minutos más en una concentración final de 50 ng/ml. Se lavan las células una vez con PBS enfriado con hielo, que contiene vanadato sódico 1 mM, después se colocan sobre hielo y se lisan en una placa de cultivo celular con 100 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-Cl de pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % de NP40, 0,5 % DOC, aprotinina, 0,5 mM PMSF, 1 mM vanadato sódico). Se transfieren los lisados celulares a tubos eppendorf y se deja que la lisis progrese durante 30 minutos sobre hielo. Se deter-

mina la concentración de proteína aplicando el método BCA (Pierce). Se separan 30-50 µg del lisado en un gel Bis-Tris NuPage 4-12 % (Invitrogen) y se transfieren las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa. Se bloquean las membranas durante una hora con TBS-T que contiene un 5 % de BSA y revelan con un anticuerpo c-Met fosfo-específico dirigido contra Y1230,1234,1235 (44-888, Biosource) con arreglo a las instrucciones del fabricante. Las inmunotransferencias (immunoblots) se exploran de nuevo con un anticuerpo que se fija sobre la c-Met no fosforilada (AF276, R&D).

Ensayo de fosforilación de la Her3 (ErbB3)

10 Se siembran 2×10^5 células MCF7 por hoyo en una placa de 12 hoyos, en un medio de cultivo completo (RPMI 1640, 10 % de FCS). Se dejan crecer las células hasta una confluencia del 90 % durante dos días. Se reemplaza el medio por un medio de inanición que contiene un 0,5 % de FCS. Al día siguiente se suplementan los anticuerpos en cuestión en las concentraciones indicadas 1 hora
15 antes de la adición de 500 ng/ml de herregulina (R&D). Después de la adición de la herregulina se cultivan las células durante 10 minutos más, se recolectan las células y se lisan. Se determina la concentración de proteína aplicando el método BCA (Pierce). Se separan 30-50 µg de lisado en un gel 4-12% Bis-Tris NuPage (Invitrogen) y se transfieren las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulo-
20 sa. Se bloquean las membranas durante una hora con TBS-T que contiene un 5 % de BSA y se revelan con un anticuerpo fosfo-específico Her3/ErbB3 que reconoce específicamente a la Tyr1289 (4791, Cell Signaling).

Ensayo de diseminación

Se siembran el A549 (4000 células por hoyo) o el A431 (8000 células por
25 hoyo) el día antes del tratamiento con los compuestos en un volumen total de 200 µl en placas E de 96 hoyos (Roche, 05232368001) en un medio RPMI con un 0,5% de FCS. Se hace el seguimiento de la adhesión y del crecimiento celular durante una noche con la máquina llamada Real Time Cell Analyzer, con barridos cada 15 min para la comprobación de la impedancia. Al día siguiente se preincu-
30 ban las células con 5 µl de las diluciones de los anticuerpo correspondientes en PBS con barridos cada cinco minutos. Pasados 30 minutos se añaden 2,5 µl de una solución de HGF que produce una concentración final de 20 ng/ml y se conti-

núa el ensayo durante 72 horas más. Se hace el seguimiento de los cambios inmediatos con barridos cada minuto durante 180 minutos y después con barridos cada 15 minutos durante el tiempo restante.

Ensayo de migración

- 5 Se realizan los ensayos de migración en base a la tecnología llamada Real Time Cell Analyser Technology (Roche). A tal fin, en la cámara inferior del dispositivo CIM que tiene poros de 8 μm se introducen 160 μl de medio acondicionado con HGF (50 ng/ml). Se monta el dispositivo y se siembran en la cámara superior 100000 células A431, en un volumen total de 150 μl . Se les añaden los anticuerpos
10 biospecíficos o los anticuerpos de control. Se deja progresar la migración durante 24 h, intercalando barridos regulares cada 15 min. Los datos se recogen y se presentan como lectura final después de 24 h.

Ensayo de citometría de flujo (FACS)

a) Cuantificación relativa del estado de receptor de superficie celular

- 15 Se mantienen las células en una fase de crecimiento logarítmico. Se destacan las células subconfluyentes con acutasa (Sigma), se centrifugan (1500 rpm, 4°C, 5 min) y después se lavan una vez con PBS que contiene un 2 % de FCS. Para determinar el estado receptor relativo en comparación con otras líneas celulares se incuban sobre hielo 1×10^5 células con 5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo específico
20 primario Her3 o c-Met durante 30 min. Como control de especificidad se emplea la IgG inespecífica (isotipo de control). Después del tiempo indicado se lavan las células una vez con PBS que contiene un 2 % de FCS y después se incuban sobre hielo con un segundo anticuerpo asociado a un fluoróforo durante 30 minutos. Se lavan las células del modo descrito y se suspenden de nuevo en un volumen
25 apropiado de una solución de BD CellFix (BD Biosciences) que contiene el 7-AAD (BD Biosciences) para discriminar las células vivas de las muertas. Se determina la intensidad de fluorescencia media (mfi) de las células por citometría de flujo (FACS Canto, BD). Se determina la mfi por lo menos por duplicado, con dos tinciones independientes. Después se procesan los espectros de citometría de flujo
30 empleando el programa informático FlowJo (TreeStar).

a) Ensayo de fijación

Se destacan y se cuentan las células A431. Se siembran $1,5 \times 10^5$ células por hoyo de una placa de 96 hoyos cónicos. Se centrifugan las células (1500 rpm, 4°C, 5 min) y se incuban sobre hielo durante 30 min en 50 µl de una serie de diluciones del correspondiente anticuerpo biespecífico en PBS con 2 % de FCS (sue-
ro fetal bovino). Se centrifugan de nuevo las células, se lavan una vez con 200 µl
de PBS que contienen un 2 % de FCS y se someten a una segunda incubación de
30 min con un anticuerpo asociado a ficoeritrina dirigido contra el Fc humano, que
se diluye en PBS que contiene un 2 % de FCS (Jackson Immunoresearch,
109116098). Se centrifugan las células, se lavan dos veces con 200 µl de PBS
que contiene un 2 % de FCS, se suspenden de nuevo en una solución BD CellFix
(BD Biosciences) y se incuban por lo menos durante 10 min sobre hielo. Se de-
termina la fluorescencia media (mfi) de las células por citometría de flujo (FACS
Canto, BD). Se determina la mfi por lo menos por duplicado de dos tinciones in-
dependientes. Los espectros de citometría de flujo se procesan después con el
programa informático FlowJo (TreeStar). Se determina la fijación semi-máxima
empleando el programa XLFit 4.0 (IDBS) y el modelo 205 de un sitio de dosis-
respuesta.

b) Ensayo de internalización

Se destacan las células y se cuentan. Se depositan 5×10^5 células en 50 µl
de medio completo en un tubo eppendorf y se incuban a 37°C con 5 µg/ml del
correspondiente anticuerpo biespecífico. Después del tiempo indicado se almace-
nan células puntuales sobre hielo hasta que finaliza la cuenta del tiempo. Des-
pués se transfieren las células a tubos FACS, se centrifugan (1500 rpm, 4°C, 5
min), se lavan con PBS + 2 % de FCS y se incuban durante 30 minutos en 50 µl
de anticuerpo secundario asociado a ficoeritrina, dirigido contra el Fc humano,
que se diluye en PBS que contiene un 2 % de FCS (Jackson Immunoresearch,
109116098). Se centrifugan de nuevo las células, se lavan con PBS + 2 % de
FCS y se determina la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo (FACS
Canto, BD).

c) Ensayo de unión cruzada

Se destacan las células HT29, se cuentan y se dividen en dos poblacio-
nes, que se tiñen individualmente con los colorantes PKH26 y PKH67 (Sigma) con

arreglo a las instrucciones del fabricante. De cada una de las poblaciones teñidas se toman 5×10^5 células, se reúnen y se incuban durante 30 y 60 minutos con 10 $\mu\text{g/ml}$ del correspondiente anticuerpo biespecífico en un medio completo. Después de los tiempos indicados se almacenan las células sobre hielo hasta que se completa el período temporal. Se centrifugan las células (1500 rpm, 4°C, 5 min), se lavan con PBS + 2 % de FCS y se determina la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo (FACS Canto, BD).

Ensayo de luminosidad de concentración celular

La viabilidad y proliferación celulares se cuantifican aplicando el ensayo de luminosidad de concentración celular (cell titer glow) (Promega). Se realiza el ensayo con arreglo a las instrucciones del fabricante. Resumiendo, se cultivan las células en placas de 96 hoyos, en un volumen total de 100 μl , durante el período de tiempo deseado. Para el ensayo de proliferación se sacan las células del incubador y se colocan a temperatura ambiente durante 30 min. Se añaden 100 μl del reactivo de luminosidad de concentración celular y se colocan las placas multihoyo en un agitador orbital durante 2 min. Se cuantifica la luminiscencia después de 15 min en un lector de microplacas (Tecan).

Ensayo Wst-1

Se realiza un ensayo Wst-1 de la viabilidad y proliferación celulares en forma de ensayo de punto final, detectando el número de células metabólicas activas. Resumiendo, se añaden 20 μl del reactivo Wst-1 (Roche, 11644807001) a 200 μl de medio de cultivo. Se incuban las placas de 96 hoyos durante un tiempo de 30 min a 1 h, hasta que el colorante tenga un revelado robusto. Se cuantifica la intensidad de la tinción en un lector de microplacas (Tecan), a una longitud de onda de 450 nm.

Resonancia de plasmón de superficie

Se determina la afinidad de fijación con un ensayo estándar de fijación a 25°C, por ejemplo la técnica de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore®, GE-Healthcare Upsala, Suecia). Para las mediciones de afinidad se unen 30 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos anti-Fc γ (de cabra, Jackson Immuno Research) con la superficie de un chip sensor CM-5 por química estándar de condensación de aminas y bloqueo en un instrumento SPR (Biacore T100). Después de la conjugación, se

inyectan a 25°C anticuerpos mono- o biespecíficos ErbB3/cMet con un caudal de 5 µl/min, después se realiza una serie de diluciones (de 0 nM a 1000 nM) del ECD de la HER3 o de la c-Met humanas a 30 µl/min. Como tampón de trabajo para el ensayo de fijación se emplea el PBS/0,1 % de BSA. Después se regenera el chip con un pulso de 60 s de una solución 10 mM de glicina-HCl, de pH 2,0.

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

Todos los anticuerpos biespecíficos <ErbB3-c-Met> purificados que se mencionan a continuación contienen una región constante o por lo menos la parte Fc del subgrupo IgG1 (región constante de la IgG1 humana, de la SEQ ID NO: 11) que eventualmente se modifica del modo que se indica a continuación.

En la tabla 1: los anticuerpos biespecíficos trivalentes <ErbB3-c-Met> basados en un anticuerpo ErbB-3 de longitud completa (clon 29 de HER3) obtenido por inmunización (ratones NMRI inmunizados con el ECD de HER3 humana) y un fragmento Fv de cadena simple (en cuanto al esquema de la estructura básica, véase la figura 5a; eventualmente no todas las características mencionadas en la tabla se incluyen en la figura) a partir del anticuerpo c-Met (5D5 cMet), con las correspondientes características recogidas en la tabla 1, se expresan y purifican con arreglo a los métodos generales antes descritos. Las VH y VL correspondientes del clon 29 de HER3 y del 5D5 de cMet se indican en el listado de secuencias.

Tabla 1:

nombre de la molécula, nomenclatura scFab-Ab de anticuerpos biespecíficos	Her3/Met_scFvSSKHS S	Her3/Me_scFvSSKH	Her3/Met_scFvKH	Her3/Me_scFvKHSB	Her3/Met_scFvKHSBSS
características:					

nombre de la molécula, nomenclatura scFab-Ab de anticuerpos biespecíficos	Her3/Met_scFvSSKHS S	Her3/Me_scFvSSKH	Her3/Met_scFvKH	Her3/Me_scFvKHSB	Her3/Met_scFvKHSBSS
mutaciones botones en ojales	S354C:T366W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V	T366W/ T366'S:L368'A:Y407'V	T366W/ T366'S:L368'A:Y407'V	T366W:K370E: K409D/ E357'K:T366'S: L368'A:D399'K: Y407'V	S354C:T366W:K370E:K409D/ Y349'C:E357'K:T366'S:L368'A:D399'K:Y407'V
esqueleto del anticuerpo de longitud completa derivado de	clon 29 de Her3 (quimérico)	clon 29 de Her3 (quimérico)	clon 29 de Her3 (quimérico)	clon 29 de Her3 (quimérico)	clon 29 de Her3 (quimérico)
fragmento Fv de cadena simple derivado de	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)
posición del scFv unido al anticuerpo	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C
Fv de cadena simple-engarce	(G ₄ S) ₃	(G ₄ S) ₃	(G ₄ S) ₃	(G ₄ S) ₃	(G ₄ S) ₃
conector peptídico	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂
VH44/VL100 de ScFv estabilizado con disulfuro (sí/no = +/-)	+	+	-	+	+

En la tabla 2: Se expresan y purifican anticuerpos biespecíficos trivalentes <ErbB3-c-Met> basados en un anticuerpo ErbB-3 de longitud completa (Mab 205, obtenido por inmunización de ratones NMRI con el ECD de HER3 humana) y un

fragmento Fv o scFab de cadena simple (véase un esquema básico en las figuras 5b y a; la estructura detallada se describe en la tabla) a partir del anticuerpo c-Met (5D5 cMet) con las características correspondientes recogidas en la tabla 2 con arreglo a los métodos generales antes descritos. Las correspondientes cadenas

5 VH y VL del Mab 205 y del 5D5 cMet se describen en el listado de secuencias.

Tabla 2

nombre de la molécula, nomenclatura scFab-Ab de anticuerpos biespecíficos	MH_TvAB18	MH_TvAB21	MH_TvAB22	MH_TvAB23	MH_TvAB24	MH_TvAB25
características:						
mutaciones botones en ojales	S354C:T 366W/ Y349'C:T 366'S: L368'A:Y 407'V	S354C:T3 66W/ Y349'C:T 366'S: L368'A:Y 407'V	S354C:T3 66W/ Y349'C:T 366'S: L368'A:Y 407'V	S354C:T3 66W/ Y349'C:T 366'S: L368'A:Y 407'V	S354C:T3 66W/ Y349'C:T 366'S: L368'A:Y 407'V	S354C:T3 66W/ Y349'C:T 366'S: L368'A:Y 407'V
esqueleto del anticuerpo de longitud completa derivado de	Mab 205 (quimérico)	Mab 205 (quimérico)	Mab 205 (quimérico)	Mab 205 (quimérico)	Mab (quimérico)	Mab (quimérico)
fragmento Fv de cadena simple derivado de	5D5 cMet (humanizado)	-	-	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)

nombre de la molécula, nomenclatura scFab-Ab de anticuerpos biespecíficos	MH_TvAB18	MH_TvAB21	MH_TvAB22	MH_TvAB23	MH_TvAB24	MH_TvAB25
fragmento scFab de cadena simple derivado de	-	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)	-	-	-
posición del scFv o del scFab unido al anticuerpo	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo N	cadena larga de botón del extremo N	cadena larga de botón del extremo N	cadena larga de botón del extremo N
Fv de cadena simple-engarce	(G ₃ S) ₄	-	-	(G ₃ S) ₄	(G ₃ S) ₇	(G ₃ S) ₇
engarce (scFab)	-	(G ₄ S) ₅ GG	(G ₄ S) ₅ GG	-	-	-
conector peptídico	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂
VH44/ VL100 de ScFv o de scFab estabilizado con disulfuro (+/- = sí/no)	+	-	-	+	-	-

En la tabla 3: Se expresan y purifican anticuerpos biespecíficos trivalentes <ErbB3-c-Met> basados en un anticuerpo ErbB-3 de longitud completa (Mab 205.10.2, obtenido por inmunización de ratones NMRI con el ECD de HER3 humana) y un fragmento scFab (véase un esquema básico en las figura 5a) a

partir del anticuerpo c-Met (5D5 cMet) con las características correspondientes recogidas en la tabla 3 con arreglo a los métodos generales antes descritos. Las correspondientes cadenas VH y VL del Mab 205.10.2 y del 5D5 cMet se describen en el listado de secuencias.

5 Tabla 3

nombre de la molécula, nomenclatura scFab-Ab de anticuerpos biespecíficos	MH_TvAB29	MH_TvAB30
características:		
mutaciones botones en ojales	S354C:T366W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V	S354C:T366W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V
esqueleto del anticuerpo de longitud completa derivado de	Mab 205.10.2 (humanizado)	Mab 205.10.2 (humanizado)
fragmento scFab derivado de	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)
posición del scFab unido al anticuerpo	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C
engarce (scFab)	((G ₄ S) ₅ GG	(G ₄ S) ₅ GG
conector peptídico	(G ₄ S) ₂	(G ₄ S) ₂
VH44/VL100 de scFv o de scFab estabilizado con disulfuro (sí/no = +/-)	+	-

Tabla 4

Anticuerpos biespecíficos trivalentes con la nomenclatura VHVL-Ab de la tabla 2, se expresan y se purifican (véase también los ejemplos que siguen y la figura 3c)

nombre de la molécula, nomenclatura scFab-Ab de anticuerpos biespecíficos	Her3/Met_K HSS	Her3/Met_SSKH	Her3/Met_SS KHSS	Her3/Met_1C	Her3/Met_6C
características:					
mutaciones botones en ojales	S354C:T366 W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V	T366W/ T366'S:L368'A: Y407'V	S354C:T366 W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V	S354C:T366 W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V	S354C:T366W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V
esqueleto del anticuerpo de longitud completa derivado de	clon 29 de Her3 (quimérico)	clon 29 de Her3 (quimérico)	clon 29 de Her3 (quimérico)	clon 29 de Her3 (quimérico)	clon 29 de Her3 (quimérico)
fragmento VHVL derivado de	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)
posición de la VH unida al anticuerpo	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C	cadena larga de botón del extremo C
posición de la VL unida a anticuerpo	cadena larga de ojal del extremo C	cadena larga de ojal del extremo C	cadena larga de ojal del extremo C	cadena larga de ojal del extremo C	cadena larga de ojal del extremo C
conector peptídico	(G ₄ S) ₃	(G ₄ S) ₃	(G ₄ S) ₃	(G ₄ S) ₁	(G ₄ S) ₆
VH44/VL100 de ScFv estabilizado con disulfuro (+/- = sí/no)	-	+	+	-	-

En la tabla 5: Se expresan y purifican anticuerpos biespecíficos bivalentes <ErbB3-c-Met> basados en un anticuerpo ErbB-3 de longitud completa (Mab 205 de HER3 o versiones humanizadas Mab 205.10.1, Mab 205.10.2 o Mab 205.10.3) y un fragmento scFab (véase un esquema básico en las figura 7) a partir del anti-

cuerpo c-Met (5D5 cMet) con las características correspondientes recogidas en la tabla 5 con arreglo a los métodos generales antes descritos. Las correspondientes cadenas VH y VL del Mab 205 de HER3 y del 5D5 cMet se describen en el listado de secuencias.

5 Tabla 5

nombre de la molécula, nomenclatura scFab-Ab de anticuerpos biespecíficos	MH_BvAB21	MH_BvAB28
características:		
mutaciones botones en ojales	S354C:T366W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V	S354C:T366W/ Y349'C:T366'S: L368'A:Y407'V
esqueleto del anticuerpo de longitud completa derivado de	Mab 205 (quimérico)	Mab 205 (quimérico)
fragmento Fab de cadena simple derivado de	5D5 cMet (humanizado)	5D5 cMet (humanizado)
posición del scFab unido al anticuerpo	extremo C del fragmento botón- CH2-CH3	extremo C del fragmen- to botón-CH2-CH3
Fab de cadena simple - engarce	((G ₄ S) ₅ GG	(G ₄ S) ₅ GG
VH44/VL100 de scFab estabilizado con disulfuro (sí/no = +/-)	-	+

Ejemplo 1 (figura 8)

Unión de anticuerpos biespecíficos a la superficie de las células cancerosas

Se analizan las propiedades de fijación de los anticuerpos biespecíficos sobre la superficie celular de sus receptores respectivos en células cancerosas A431 mediante un ensayo basado en la citometría de flujo. Se incuban las células con anticuerpos primarios mono- o biespecíficos y se detecta la fijación de estos anticuerpos sobre sus receptores afines con un anticuerpo secundario asociado a un fluoróforo, que se une específicamente al Fc del anticuerpo primario. Se traza una gráfica de la intensidad de fluorescencia media de una serie de diluciones de los anticuerpos primarios frente la concentración del anticuerpo, obteniéndose una

curva de fijación sigmoidal. La expresión en la superficie celular del c-Met y del Her3 se valida por incubación con el anticuerpo bivalente 5D5 y con el anticuerpo clon 29 de Her3 solamente. El anticuerpo Her3/c-Met_KHSS se une rápidamente a la superficie de las células A431. En estas condiciones experimentales, el anticuerpo solamente puede fijarse a través de su parte Her3 y por consiguiente la intensidad de fluorescencia media no supera la tinción del clon 29 de Her3 solo.

Ejemplo 2 (figura 9)

Inhibición de la fosforilación del receptor de c-Met inducida por HGF con formatos de anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met

10 Para confirmar la funcionalidad de la parte c-Met de los anticuerpos biespecíficos se realiza un ensayo de fosforilación de la c-Met. En este ensayo se tratan células de cáncer de pulmón A549 o células de cáncer colorrectal HT29 con los anticuerpos biespecíficos o con anticuerpos de control antes de exponerlas al HGF. Después se lisan las células y se examina la fosforilación del receptor de c-Met. Ambas líneas celulares se estimulan con HGF como puede observarse con la aparición de la banda específica de fosfo-c-Met en la inmunotransferencia (immunoblot). La adición del anticuerpo scFv o del fragmento Fab del 5D5 inhibe la fosforilación del receptor, lo cual demuestra la funcionalidad del componente scFv de c-Met.

20 Ejemplo 3 (figura 10)

Inhibición de la fosforilación del receptor de Her3 inducida por HRG con formatos de anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met

Para confirmar la funcionalidad de la parte Her3 de los anticuerpos biespecíficos se realiza un ensayo de fosforilación de la Her3. En este ensayo se tratan células MCF7 con anticuerpos biespecíficos o con anticuerpos de control antes de exponerlas a la HRG (herregulina). Después se lisan las células y se examina la fosforilación del receptor de Her3. El Her3/c-Met_scFv_SSKH y el Her3/c-Met_KHSS inhiben la fosforilación del receptor de la Her3 en igual medida que el clon 29 de la Her3 original, lo cual indica que la fijación sobre la Her3 y la funcionalidad del anticuerpo no resulta comprometida por el formato de anticuerpo trivalente.

30 Ejemplo 4 (figuras 11, 12, 13)

Inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por HGF con los formatos de anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met

Pueden realizarse ensayos de proliferación de HUVEC para demostrar el efecto mitógeno del HGF. La adición de HGF a las HUVEC conduce a un aumento doble de la proliferación. La adición del anticuerpo de control IgG humano en el mismo intervalo de concentraciones que los anticuerpos biespecíficos no tiene incidencia en la proliferación celular, mientras que el fragmento Fab 5D5 inhibe la proliferación inducida por el HGF. Si se emplean las mismas concentraciones, el anticuerpo Her/c-Met_scFv_SSKH inhibe la proliferación en igual medida que el fragmento Fab (figura 11). La adición de herregulina (HRG) sola (datos no presentados) o en combinación con el HGF no produce un incremento en la proliferación (figura 12). Esto confirma que esta conclusión permite el análisis funcional del componente c-Met en un formato de anticuerpo biespecífico sin interferencia del componente Her3. La valoración del Her3/c-Met_KHSS demuestra un débil efecto inhibidor del anticuerpo (figura 13). Este efecto es más pronunciado para el anticuerpo Her3/Met-6C, lo cual indica que un conector más largo mejora la eficacia del anticuerpo. Tres anticuerpos scFv diferentes (Her3/c-Met-scFv_SSKH, Her3/c-Met_scFv_KH y Her3/c-Met_scFv_KHSB) presentan el mismo grado de inhibición de la proliferación. Esto demuestra la funcionalidad del componente c-Met en el formato de anticuerpo trivalente.

Ejemplo 5 (figura 14)

Inhibición de la proliferación de la línea celular cancerosa A431 con formatos de anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met

Si se siembran células A431 en un medio de contenido reducido en suero, la adición de HGF induce la diseminación y además un débil efecto mitógeno. Esto se aprovecha para analizar el impacto del anticuerpo Her3/c-Met_scFv_SSKH y del Her3/c-Met_KHSS en la proliferación de las A431 tratadas con HGF. Como es obvio, los anticuerpos biespecíficos pueden inhibir en gran manera el aumento de proliferación (15 %) inducido por el HGF. El Her3/c-Met_scFv_SSKH es igual de eficaz que el fragmento Fab del 5D5, mientras que el Her3/c-Met_KHSS tiene que dosificar en mayor cantidad (12,5 µg/ml, a diferencia de los 6,25 µg/ml) para obtener efectos similares. Un anticuerpo IgG humano de

control no tiene influencia en el crecimiento de las células A431 promovido con HGF.

Ejemplo 6 (figura 15, 16)

5 Análisis de la inhibición de la diseminación célula-célula (scattering) inducida por HGF en la línea celular cancerosa A431 con formatos de anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met

10 La diseminación inducida por el HGF incluye los cambios morfológicos de la célula, que se traducen en un redondeo de las células, protrusiones de tipo filopodia, estructuras de tipo husillo y cierta motilidad de las células. Con el Real Time Cell Analyzer (Roche) se mide la impedancia de un hoyo determinado de cultivo celular y, por tanto, puede hacer un seguimiento indirecto de los cambios de la morfología y la proliferación celulares. La adición del HGF a las células A431 y A549 se traduce en cambios de la impedancia que pueden seguirse en función del tiempo. Los anticuerpos Her3/c-Met_KHSS y Her3/Met-6C inhiben la diseminación inducida por el HGF, siendo más eficaz el Her3/Met-6C (20,7 % y 43,7 % de inhibición de diseminación) (figura 15). Tres anticuerpos scFv diferentes (Her3/c-Met_scFv_SSKH, Her3/c-Met_scFv_KH, Her3/c-Met_scFv_KHSB) despliegan una eficacia media en la supresión de la diseminación inducida por el HGF, como puede observarse en la pendiente reducida de la curva de la gráfica
15 junto a la curva de control sin tratamiento (inhibición de la diseminación en un 29 %, 51,9 % y 49,7 %) (figura 16). Si se emplea la misma concentración de 12,5 µg/ml, entonces el anticuerpo Her3/c-Met_scFv_KH y el Her3/c-Met_scFv_KHSB se comportan igual de bien.

Ejemplo 7 (figura 17)

25 Análisis de la expresión del receptor de Her3 y de c-Met en la superficie de las células de las líneas celulares cancerosas T47D, A549, A431 y H441

30 Para identificar líneas celulares de diferentes proporciones de superficie celular de la Her3 y de la c-Met se realiza un ensayo basado en el FACS. La T47D no presenta expresión en la superficie de las células c-Met, lo cual está de acuerdo con los niveles de mRNA en esta línea celular (datos no presentados). La A431 y la A549 presentan niveles similares de c-Met, mientras que la H441, una línea celular que sobreexpresa la c-Met, tiene niveles muy elevados de c-Met. Y

viceversa, la T47D tiene niveles elevados de Her3, mientras que la A549 presenta solamente una expresión baja en la superficie celular.

Ejemplo 8 (figura 18 y tabla siguiente)

5 Análisis de la internalización de receptor mediada por el anticuerpo en las líneas celulares cancerosas A431, A549 y DU145 (medida en un ensayo de citometría de flujo (FACS))

Se ha demostrado que la incubación de células con anticuerpos que se unen específicamente con la Her3 o la c-Met desencadena la internalización del receptor. Con el fin de evaluar la capacidad de internalización de los anticuerpos
10 biospecíficos, se diseña un método experimental para estudiar la internalización del receptor inducida por el anticuerpo. A tal fin se incuban a 37°C las células durante diferentes períodos de tiempo (p.ej. 0, 30, 60 y 120 minutos = 0 h, 1/2 h, 1 h y 2 h) con el correspondiente anticuerpo primario. Se interrumpen los procesos celulares con el enfriamiento rápido de las células a 4°C. Se emplea un anti-
15 cuerpo secundario asociado a un fluoróforo y que se une específicamente al Fc del anticuerpo primario para detectar los anticuerpos fijados sobre la superficie de las células. La internalización del complejo anticuerpo-receptor reduce los complejos anticuerpo-receptor de la superficie celular y se traduce en una menor intensidad de fluorescencia media. La internalización se ha estudiado en tres líneas ce-
20 lulares diferentes (A431, A549 y DU145). La incubación con el clon 29 de la Her3 demuestra que este anticuerpo induce la internalización del receptor en A431 y en DU145, pero el efecto es menos pronunciado en la A549, que casi no tiene receptor en su superficie celular. La incubación con el 5D5 conduce a una buena internalización del receptor en las A549 y DU145 y menos pronunciada en las A431. El
25 Her3/c-Met_scFv_SSKH casi no produce internalización en las A549 y DU145 y una internalización solamente modesta en las A431 (11 % después de 2 h). Resumiendo, el formato de anticuerpo scFv conduce solamente a una internalización muy modesta del receptor, lo cual indica que el anticuerpo biospecífico actúa de modo diferente a los componentes monoespecíficos, lo cual sugiere que tiene
30 lugar una fijación simultánea del anticuerpo scFv sobre ambos receptores, capturándolos sobre la superficie de la célula. Los resultados se presentan en la figura 18 y en la tabla que sigue.

Tabla 6

% de internalización del receptor de ErbB3 con el anticuerpo biespecífico Her3/cMet comparado con el del anticuerpo original monoespecífico HER3 y cMet, medido por un ensayo FACS después de 2 h en células A431. La medición del % del receptor de ErbB3 en la superficie de las células en las 0 h se toma como 100 % de receptor de ErbB3 en la superficie de las células.

Anticuerpo	% de receptor de ErbB3 en la superficie de las células A431 medida después de 2 h	% de internalización del ErbB3 después de 2 h en células A431 (ATCC nº CRL-1555) (= 100- % de anticuerpo en la superficie de las células)
A) anticuerpos monoespecíficos originales <ErbB3 >		
Mab 205 <ErbB3 > (quimérico)	60	40
clon 29 de HER3 <ErbB3 >	44	54
B) anticuerpo monoespecífico original <c-Met>		
Mab 5D5	61	39
C) anticuerpos biespecíficos <ErbB3-cMet >		
MH_TvAb_18	101	-1
MH_BvAb_20	103	-3
MH_TvAb_21	99	1
MH_TvAb22	99	1
MH_TvAb23	89	11
MH_TvAb24	90	10
MH_TvAb25	89	11
MH_BvAb28	102	-2
MH_TvAb29	95	5
MH_TvAb30	95	5
Her3/Met_6C	94	6
Her3/Met_SSKH	89	11

Ejemplo 10 (figura 19)

Análisis de la inhibición dependiente de anticuerpo de la migración mediada por el HGF en la línea de células cancerosas A431

Un aspecto importante de la señalización activa de la c-Met es la inducción de un programa migratorio e invasivo. La eficacia de un anticuerpo inhibidor de la c-Met puede determinarse midiendo la inhibición de la migración celular inducida por el HGF. A tal fin se trata la línea celular cancerosa A431 inducible por

HGF con el HGF en ausencia o en presencia de un anticuerpo biespecífico o de un anticuerpo IgG de control y se miden el número de células migrantes a través de un poro de 8 µm, de forma dependiente del tiempo, en un analizador celular del tipo Acea Real Time, empleando placas CIM, con lectura de la impedancia. De forma independiente se visualiza cualitativamente la migración de las células por tinción de las células migradas (datos no presentados). El ejemplo demuestra la inhibición dependiente de la dosis de la migración celular inducida por HGF.

Ejemplo 11 (tabla siguiente)

Análisis de la unión sucesiva y simultánea del receptor recombinante de Her3, cMet y FcγRIIIa a los anticuerpos biespecíficos

Para comprender mejor el modo de acción de los anticuerpos biespecíficos que se fijan sobre la Her3 y la c-Met se determina el estado de fijación sobre el receptor mediante mediciones de la resonancia de plasmón de superficie (Biacore). Se aplican diferentes métodos para evaluar la fijación de los anticuerpos biespecíficos sobre el ectodominio (ECD) de la Her3 recombinante o de la c-Met recombinante o de ambas a la vez. Todos los anticuerpos biespecíficos ensayados son capaces de fijarse simultáneamente sobre el ECD de la Her3 o de la c-Met. Además, la fijación de la proteína FcγRIIIa recombinante al complejo formado por el anticuerpo:ECD Her3:cMet. Todos los anticuerpos consiguen fijarse sobre el receptor de FcγRIIIa incluso en presencia de ambos ectodominios, lo cual proporciona una fuerte prueba de que la glucoingeniería de anticuerpos biespecíficos permite intensificar las funciones efectoras dependientes de las NK.

Tabla 7

anticuerpo	fijación simultánea sobre ambos receptores	afinidad con la c-Met [nM]	afinidad con la HER3 [nM]	fijación sobre FcγRIIIa	fijación simultánea sobre FcγRIIIa
MH_BvAb_20	sí	1,2	0,9	+	sí
MH_TvAb_21	sí	0,8	1,8	++	sí
MH_TvAb22	sí	0,9	2,1	+	sí
MH_TvAb23	sí	1,8	1,1	+	sí
MH_TvAb24	sí	1,3	1,6	+	sí
MH_TvAb25	sí	1,3	1,2	+	sí
MH_TvAb30	sí	1,4	1,3	+++	sí

Ejemplo 12 (figura 20)

Análisis de la unión cruzada célula-célula con el anticuerpo biespecífico Her3/c-Met_scFv_SSKH en células HT29

Debido a la multivalencia del formato de anticuerpo biespecífico, la unión
5 cruzada célula-célula es un posible modo de acción que podría explicar además la
reducida internalización del receptor. Para estudiar este fenómeno con mayor
detalle se ha diseñado un método experimental encaminado a dilucidar esta cues-
tión. Para este fin se dividen en dos poblaciones las células HT29 que expresan la
Her3 y la c-Met en su superficie celular. Una población se tiñe con PKH26 (Sig-
10 ma), la otra con PKH67 (Sigma), dos colorantes de membrana, el primero es ver-
de y el último es rojo. Se mezclan las células teñidas y se incuban con Her/c-
Met_scFv_SSKH. En un ensayo basado en la citometría de flujo, la unión cruzada
de las células conduciría a un aumento de la población de células doblemente
positivas (verde+/rojo+) en el cuadrante superior derecho. En base a este ensayo
15 no se observa incremento en la unión cruzada célula-célula en las condiciones
indicadas.

Ejemplo 13

Preparación de anticuerpo biespecíficos Her3/c-Met por glucoingeniería

Se subclonan las secuencias de DNA del anticuerpo biespecífico Her3/c-
20 Met siguientes: MH_TvAb18, MH_TvAb21, MH_TvAb22 y MH_TvAb30 en vecto-
res de expresión en mamíferos bajo el control del promotor MPSV y en posición
anterior (upstream) con respecto al sitio polyA sintético, cada vector lleva una
secuencia OriP de EBV.

Se producen los anticuerpos biespecíficos por co-transfección de células
25 HEK293-EBNA con los vectores de expresión de anticuerpos biespecíficos en
mamíferos, empleando un método de transfección con fosfato cálcico. Para la
producción del anticuerpo de glucoingeniería se co-transfectan las células con dos
plásmidos adicionales, uno para la expresión del polipéptido de fusión GnTIII (un
vector de expresión) y el otro para la expresión de la manosidasa II (un vector de
30 expresión de la manosidasa de Golgi II), en una proporción de 4:4:1:1, respecti-
vamente. Se cultivan las células en forma de cultivos monocapa adherentes en
frascos T empleando un medio de cultivo DMEM suplementado con un 10 % de

FCS y se transfectan cuando han alcanzado una confluencia entre el 50 y el 80 %. Para la transfección en un frasco T150 se siembran 15 millones de células 24 horas antes de la transfección en 25 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (en un 10 % v/v final) y se colocan las células en el incubador a 37°C con una atmósfera del 5 % de CO₂ durante una noche. Para cada frasco T10 a transfectar se prepara una solución de DNA, CaCl₂ y agua por mezclado de 49 µg de DNA de vector de plásmido total dividido a partes iguales entre los vectores de expresión de la cadena corta y la larga, el agua se añade hasta un volumen final de 469 µl y también 469 µl de una solución 1 M de CaCl₂. A esta solución se le añaden 938 µl de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, de pH 7,05, se mezclan inmediatamente durante 10 s y se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 20 s. Se diluye la suspensión con 10 ml de DMEM suplementado con un 2 % de FCS y se añade al T150 en lugar del medio existente. Después se añaden otros 13 ml de medio de transfección. Se incuban las células a 37°C, con un 5 % de CO₂, durante un tiempo de 17 a 20 horas, después se reemplaza el medio por 25 ml de DMEM, con un 10 % de FCS. Se recolecta el medio de cultivo acondicionado 7 días después de la transfección por centrifugación a 210 x g durante 15 min, se filtra la solución en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm), se añade la azida sódica en una concentración final del 0,01 % p/v y se mantiene a 4°C.

Se purifican los anticuerpos de glucoingeniería afucosilados biespecíficos secretados por cromatografía de afinidad con la proteína A, después por cromatografía de intercambio catiónico, un paso final de cromatografía de exclusión de tamaños en una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) sustituyendo el tampón por fosfato potásico 25 mM, cloruro sódico 125 mM, una solución de glicina 100 mM de pH 6,7 y se recogen los anticuerpos IgG1 monoméricos puros. La concentración de anticuerpos se estima empleando un espectrofotómetro y midiendo la absorbancia a 280 nm.

Se analizan por MALDI-TOF/EM los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos del modo descrito a continuación (ejemplo 14). Se liberan los oligosacáridos por vía enzimática a partir de los anticuerpos por digestión con PNGaseF, estando los anticuerpos o bien inmovilizados sobre una membrana de

PVDF o bien en solución. La solución digerida resultante, que contiene los oligosacáridos liberados, se prepara directamente para el análisis MALDI-TOF/EM o se sigue digiriendo con la EndoH-glucosidasa antes de la preparación de la muestra para el análisis MALDI-TOF/EM.

5 Ejemplo 14

 Análisis de la glucoestructura de los anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met

 Para determinar las proporciones relativas de estructuras de oligosacáridos que contienen fucosa y no fucosa (a-fucosa) se analizan por MALDI-TOF/espectrometría de masas los glucanos liberados del material de anticuerpo
10 purificado. Para ello se incuba la muestra de anticuerpo (unos 50 µg) a 37°C durante una noche con 5 mU de N-glucosidasa F (Prozyme, nº GKE-5010B) en un tampón fosfato sódico 0,1M de pH 6,0, con el fin de liberar los oligosacáridos del esqueleto de la proteína. A continuación se aíslan las estructuras de glucano y se desalinizan empleando puntas de pipeta NuTip-Carbon (obtenidas de Glygen:
15 NuTip1-10 µl, nº de cat. NT1CAR). Como primer paso, se preparan las puntas de pipeta NuTip-Carbon para la fijación sobre oligosacáridos lavándolas con 3 µl de NaOH 1 M y después con 20 µl de agua pura (p.ej. agua de calidad para gradiente de HPLC, de Baker, nº 4218), 3 µl de ácido acético del 30 % v/v y después otra vez 20 µl de agua pura. Para ellos se introducen las soluciones en cuestión en la
20 parte superior del material cromatográfico en la punta de una pipeta NuTip-Carbon y se presionan a través del mismo. Después se fijan las estructuras de glucano correspondientes a 10 µg de anticuerpo sobre el material de las puntas de pipeta NuTip-Carbon moviendo en sentido vertical y descendente cuatro o cinco veces el material digerido de la N-glucosidasa F, antes descrito. Se lavan
25 los glucanos fijados sobre el material en la punta de la pipeta NuTip-Carbon con 20 µl de agua pura del modo recién descrito y se eluyen gradualmente con 0,5 µl de acetonitrilo del 10 % y con 2,0 µl de acetonitrilo del 20 %, respectivamente. Para este paso se llenan las soluciones de elución en un vial de reacción de 0,5 ml y se mueven arriba y abajo cuatro o cinco veces cada uno. Para el análisis
30 MALDI-TOF/espectrometría de masas se reúnen los dos líquidos eluidos. Para esta medición se mezclan 0,5 µl de los eluidos reunidos en la diana MALDI con 1,6 µl de una solución de matriz SDHB (ácido 2,5-dihidroxi-benzoico/ácido 2-

hidroxi-5-metoxibenzoico [Bruker Daltonics, nº 209813] disueltos en etanol del 20 %/NaCl 5 mM hasta una concentración de 5 mg/ml) y se analizan con el instrumento TOF Bruker Ultraflex TOF oportunamente ajustado. De forma rutinaria se registran 50-300 disparos, que se acumulan en un solo ensayo. Se evalúan los espectros obtenidos con el programa informático Flex analysis (Bruker Daltonics) y se determinan las masas para cada uno de los picos detectados. A continuación se asignan los picos a las estructuras de glicol que contienen fucosa o a-fucosa (no fucosa) comparando las masas calculadas y las masas teóricamente esperadas para las estructuras en cuestión (p.ej. el complejo, el híbrido, la oligomanosa y la manosa de concentración alta, respectivamente, con y sin la fucosa).

Para determinar la proporción de las estructuras híbridas, se digieren las muestras de anticuerpo con N-glucosidasa F y endo-glucosidasa H, de modo concomitante. La N-glucosidasa F libera todas las estructuras de glucano unidas a N (estructuras complejas, híbridas, de oligomanosa y de manosa de concentración alta) del esqueleto de la proteína y además la endo-glucosidasa H descompone todos los glucanos de tipo híbrido, rompiéndolos entre dos restos GlcNAc del extremo reductor del glucano. Seguidamente se trata este material digerido y se analiza por MALDI-TOF/espectrometría de masas de la misma manera que se ha descrito antes para la muestra digerida con la N-glucosidasa F. Comparando los modelos del material digerido con la N-glucosidasa F y el material digerido combinado de N-glucosidasa F/endo H, el grado de reducción de las señales de una glucoestructura concreta se emplea para estimar el contenido relativo de estructuras híbridas.

Se calcula la cantidad relativa de cada glucoestructura a partir del cociente entre la altura del pico de una estructura glicol concreta y la suma de las alturas de los picos de todas las glucoestructuras que se hayan detectado. La cantidad de fucosa es el porcentaje de estructuras que contiene fucosa referido a todas las glucoestructuras identificadas en la muestra tratada con N-glucosidasa F (p.ej. estructuras complejas, híbridas, de oligomanosa y de manosa de mayor concentración, respectivamente). El grado de afucosilación es el porcentaje de estructuras carentes de fucosa, referido a todas las glucoestructuras identificadas en la

muestra tratada con N-glucosidasa F (p.ej. estructuras complejas, híbridas, de oligomanosa y de manosa de mayor concentración, respectivamente).

Ejemplo 15

ADCC "in vitro" de los anticuerpos biespecíficos Her3/c-Met

5 Los anticuerpos biespecíficos Her3/cMet según la invención presentan una internalización reducida en las células que expresan a ambos receptores. La internalización reducida es un gran apoyo para el propósito de la glucoingeniería de estos anticuerpos, ya que la exposición prolongada del complejo anticuerpo-receptor en la superficie de las células es más probable que sea reconocido por
10 las células NK. La internalización reducida y la glucoingeniería se traducen en una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), si se comparan con la de los anticuerpos originales. Puede diseñarse un método experimental "in vitro" para demostrar estos efectos empleando células cancerosas que expresen tanto a la Her3 como a la cMet en la superficie celular, p.ej. la A431, y células
15 efectoras por ejemplo una línea celular NK o de células PBMC. Se preincuban las células tumorales con los anticuerpos monoespecíficos originales o con los anticuerpos biespecíficos durante un tiempo de hasta 24 h y después se añade la línea celular efectora. Se cuantifica la lisis celular, que permite la discriminación entre anticuerpos mono- y biespecíficos.

20 Las células diana, por ejemplo las A431 (cultivadas en medio RPMI 1640 + L-glutamina 2 mM + 10 % de FCS) (que expresan tanto a la Her3 como a la cMet) se recolectan con tripsina/EDTA (Gibco, nº 25300-054) en la fase de crecimiento exponencial. Después de un paso de lavado y de chequeo del número de células y la viabilidad se marca en el incubador celular la parte alícuota necesaria
25 con calceína (Invitrogen, nº C3100MP; se suspende de nuevo 1 vial en 50 µl de DMSO para 5 millones de células en 5 ml de medio) a 37°C durante 30 min. A continuación se lavan las células tres veces con medio AIM-V, se chequea el número de células y la viabilidad y se ajusta el número de células a 0,3 millones/ml.

Mientras se preparan las PBMC como células efectoras mediante una
30 centrifugación por gradiente de densidad (Histopaque-1077, Sigma, nº H8889) con arreglo a las instrucciones del fabricante (pasos de lavado: 1x a 400 g y 2x a

350 g, cada uno durante 10 min). Se chequea el número de células y la viabilidad y se ajusta el número de células a 15 millones/ml.

Se depositan 100 µl de las células diana teñidas con calceína en las placas de 96 hoyos de fondo redondo, se les añaden 50 µl de anticuerpo diluido y 50 µl de células efectoras. En algunos ensayos, las células diana se mezclan con Redimune® NF Liquid (ZLB Behring) en una concentración de Redimune de 10 mg/ml.

Como controles se emplean la lisis espontánea, determinada por cocultivo de células diana y células efectoras sin anticuerpo y la lisis máxima, determinada por lisis solamente de las células diana con un 1 % de Triton X-100. Se incuba la placa en un incubador celular humidificado a 37°C durante 4 horas.

Se evalúa la muerte de las células diana midiendo la liberación de la LDH por parte de las células dañadas empleando el kit de detección de citotoxicidad (LDH Detection Kit, Roche, nº 1 644 793) con arreglo a las instrucciones del fabricante. Resumiendo, en una placa transparente de 96 hoyos de fondo plano se mezclan 100 µl de líquido sobrenadante de cada hoyo con 100 µl de sustrato del kit. Se determinan los valores Vmax de la reacción de color de sustrato en un lector ELISA a 490 nm por lo menos durante 10 min. Se calcula el porcentaje de muerte específica mediada por el anticuerpo del modo siguiente: $((A - SR)/(MR - SR)) \times 100$, en la que A es la media del valor Vmax de una concentración concreta de anticuerpo, SR es la media del Vmax de la liberación espontánea y MR es la media del Vmax de la liberación máxima.

Ejemplo 16

Eficacia "in vivo" de los anticuerpos biespecíficos Her3/cMet en un modelo de injerto ajeno (xenograft) subcutáneo con un bucle autocrino de HGF

Un modelo de glioblastoma U87MG subcutáneo tiene un bucle autocrino de HGF y presenta la Her3 y la c-Met en la superficie de las células. Se fosforilan ambos receptores en explantes tumorales que se lisan y se someten a análisis por inmunotransferencia (immunoblot) (datos no presentados). Se mantienen las células U87MG en condiciones estándar de cultivo celular en la fase de crecimiento logarítmico. Se injertan diez millones de células a ratones SCID de color beige. Se inicia el tratamiento después de que los tumores se hayan establecido y

hayan alcanzado un tamaño de 100-150 mm³. Se tratan los tumores con una dosis de carga de 20 mg/kg de anticuerpo/ratón y después, una vez por semana, con 10 mg/kg de anticuerpo/ratón. Se mide el volumen del tumor dos veces por semana y se hace un seguimiento paralelo del peso los animales. Los tratamientos individuales y la combinación de los anticuerpos individuales se comparan con la terapia realizada con el anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 17

Eficacia "in vivo" de los anticuerpos biespecíficos Her3/cMet en un modelo de injerto ajeno (xenograft) subcutáneo con un bucle paracrino de HGF

10 Un modelo BxPc-3 subcutáneo, coinyectado con células Mrc-5, imita un bucle de activación paracrina de la c-Met. La BxPc-3 expresa la c-Met y también la Her3 en la superficie de las células. Se mantienen las células BxPc-3 y Mrc-5 en condiciones de cultivo celular estándar en la fase de crecimiento logarítmico. Se inyectan las células BxPc-3 y Mrc-5 en una proporción 10:1, a saber, diez millones de células BxPc-3 y un millón de Mrc-5. Se injertan las células en ratones SCID de color beige. Se inicia el tratamiento después de que los tumores se hayan establecido y hayan alcanzado un tamaño de 100-150 mm³. Se tratan los tumores con una dosis de carga de 20 mg/kg de anticuerpo/ratón y después, una vez por semana, con 10 mg/kg de anticuerpo/ratón. Se mide el volumen del tumor dos veces por semana y se hace un seguimiento paralelo del peso los animales. Los tratamientos individuales y la combinación de los anticuerpos individuales se comparan con la terapia realizada con el anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 18

25 Eficacia "in vivo" de los anticuerpos biespecíficos Her3/cMet en un modelo de injerto ajeno (xenograft) subcutáneo con un bucle paracrino de HGF

Como fuente del HGF sistémico se emplean ratones transgénicos del HGF humano inmunocomprometidos. Estos ratones se han descrito en la bibliografía técnica y pueden obtenerse del Instituto Van Andel. Puede utilizarse la inyección subcutánea de las líneas celulares cancerosas, por ejemplo la BxPc-3 o la A549, que expresan a ambos receptores en la superficie celular, para estudiar la eficacia de los anticuerpos biespecíficos dirigidos contra la Her3 y la c-Met. Se mantienen las células en condiciones de cultivo celular estándar en la fase de

crecimiento logarítmico. Se inyectan diez millones de células en ratones SCID de color beige que llevan el transgén del HGF. Se inicia el tratamiento después de que los tumores se hayan establecido y hayan alcanzado un tamaño de 100-150 mm³. Se tratan los tumores con una dosis de carga de 20 mg/kg de anticuerpo/ratón y después, una vez por semana, con 10 mg/kg de anticuerpo/ratón. Se mide el volumen del tumor dos veces por semana y se hace un seguimiento paralelo del peso de los animales. Los tratamientos individuales y la combinación de los anticuerpos individuales se comparan con la terapia realizada con el anticuerpo biespecífico.

10 Ejemplo 19

Eficacia "in vivo" de los anticuerpos biespecíficos Her3/cMet en un modelo de injerto ajeno (xenograft) ortotópico con un bucle paracrino de HGF

Las células cancerosas A549 expresan la Her3 y también la c-Met en la superficie celular. Se mantienen las células A549 en condiciones de cultivo celular estándar en la fase de crecimiento logarítmico. Se injertan diez millones de células en ratones SCID de color beige. Se inicia el tratamiento después de que los tumores se hayan establecido y hayan alcanzado un tamaño de 100-150 mm³. Se tratan los tumores con una dosis de carga de 20 mg/kg de anticuerpo/ratón y después, una vez por semana, con 10 mg/kg de anticuerpo/ratón. Se mide el volumen del tumor dos veces por semana y se hace un seguimiento paralelo del peso de los animales. Los tratamientos individuales y la combinación de los anticuerpos individuales se comparan con la terapia realizada con el anticuerpo biespecífico.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana, que contiene un primer sitio de fijación sobre el antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre el antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, caracterizado porque dicho anticuerpo biespecífico presenta una internalización de la ErbB-3 no superior al 15 % cuando se mide después de 2 horas en un ensayo de citometría de flujo en células A431, si se compara con la internalización de la ErbB-3 en ausencia del anticuerpo.

2. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, caracterizado por ser un anticuerpo biespecífico bivalente o trivalente, que se une a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana y consta de uno o dos sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a la ErbB-3 humana y un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a la c-Met humana.

3. El anticuerpo según la reivindicación 1 caracterizado por ser un anticuerpo biespecífico bivalente o trivalente, que se une a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana y consta de dos sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a la ErbB-3 humana y un tercer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a la c-Met humana.

4. El anticuerpo según la reivindicación 1 caracterizado por ser un anticuerpo biespecífico bivalente o trivalente, que se une a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana y consta de un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a la c-Met humana.

5. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la ErbB-3 humana y a la c-Met humana que contiene un primer sitio de fijación sobre el antígeno que se une específicamente a la ErbB-3 humana y un segundo sitio de fijación sobre el antígeno que se une específicamente a la c-Met humana, caracterizado porque

i) dicho primer sitio de fijación sobre el antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 47, una región CDR2H de SEQ ID NO:

54 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 55, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 56, una región CDR2L de SEQ ID NO: 57 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 58 o una región CDR1L de SEQ ID NO: 59; y

5 dicho segundo sitio de fijación al antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 66, una región CDR2H de SEQ ID NO: 67, y una región CDR1H de SEQ ID NO: 68, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 69, una región CDR2L de SEQ ID NO: 70 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 71;

10 ii) dicho primer sitio de fijación al antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 60, una región CDR2H de SEQ ID NO: 61 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 62, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 63, una región CDR2L de SEQ ID NO: 64 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 65 o una región CDR1L de
15 SEQ ID NO: 66; y

 dicho segundo sitio de fijación al antígeno contiene en el dominio variable de cadena larga una región CDR3H de SEQ ID NO: 66, una región CDR2H de SEQ ID NO: 67 y una región CDR1H de SEQ ID NO: 68, y en el dominio variable de cadena corta una región CDR3L de SEQ ID NO: 69, una región CDR2L de
20 SEQ ID NO: 70 y una región CDR1L de SEQ ID NO: 71.

 6. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 5, caracterizado por-
que

 i) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 47, y como dominio variable de cadena
25 corta la SEQ ID NO: 48; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la SEQ ID NO: 4;

 ii) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena
30 corta la SEQ ID NO: 50; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la SEQ ID NO: 4;

iii) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la SEQ ID NO: 51; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 3, y como dominio variable
5 de cadena corta la SEQ ID NO: 4;

iv) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena corta la SEQ ID NO: 52; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 3, y como dominio variable
10 de cadena corta la SEQ ID NO: 4; o

v) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 1, y como dominio variable de cadena corta la SEQ ID NO: 2; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de
15 cadena corta la SEQ ID NO: 4.

7. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 5, caracterizado por que

i) dicho primer sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 49, y como dominio variable de cadena
20 corta la SEQ ID NO: 51; y dicho segundo sitio de fijación sobre antígeno contiene como dominio variable de cadena larga la SEQ ID NO: 3, y como dominio variable de cadena corta la SEQ ID NO: 4.

8. El anticuerpo biespecífico de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque contiene una región constante del subgrupo IgG1 o IgG3.

25 9. El anticuerpo biespecífico de las reivindicaciones 1 - 8, caracterizado porque dicho anticuerpo está glucosilado con una cadena azúcar en Asn297, en la que la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena azúcar es del 65 % o menos.

10. Un ácido nucleico que codifica a un anticuerpo biespecífico según las reivindicaciones 1 - 9.

30 11. Una composición farmacéutica que contiene a anticuerpo biespecífico según las reivindicaciones 1 - 9.

12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11 para el tratamiento del cáncer.

13. Un anticuerpo biespecífico según las reivindicaciones 1 - 9 para el tratamiento del cáncer.

5 14. Uso de un anticuerpo biespecífico según las reivindicaciones 1 - 9 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

15. Un método de tratamiento de un paciente que sufre un cáncer que consiste en administrar un anticuerpo biespecífico según las reivindicaciones 1 - 9 a un paciente que necesite dicho tratamiento.

Fig. 1

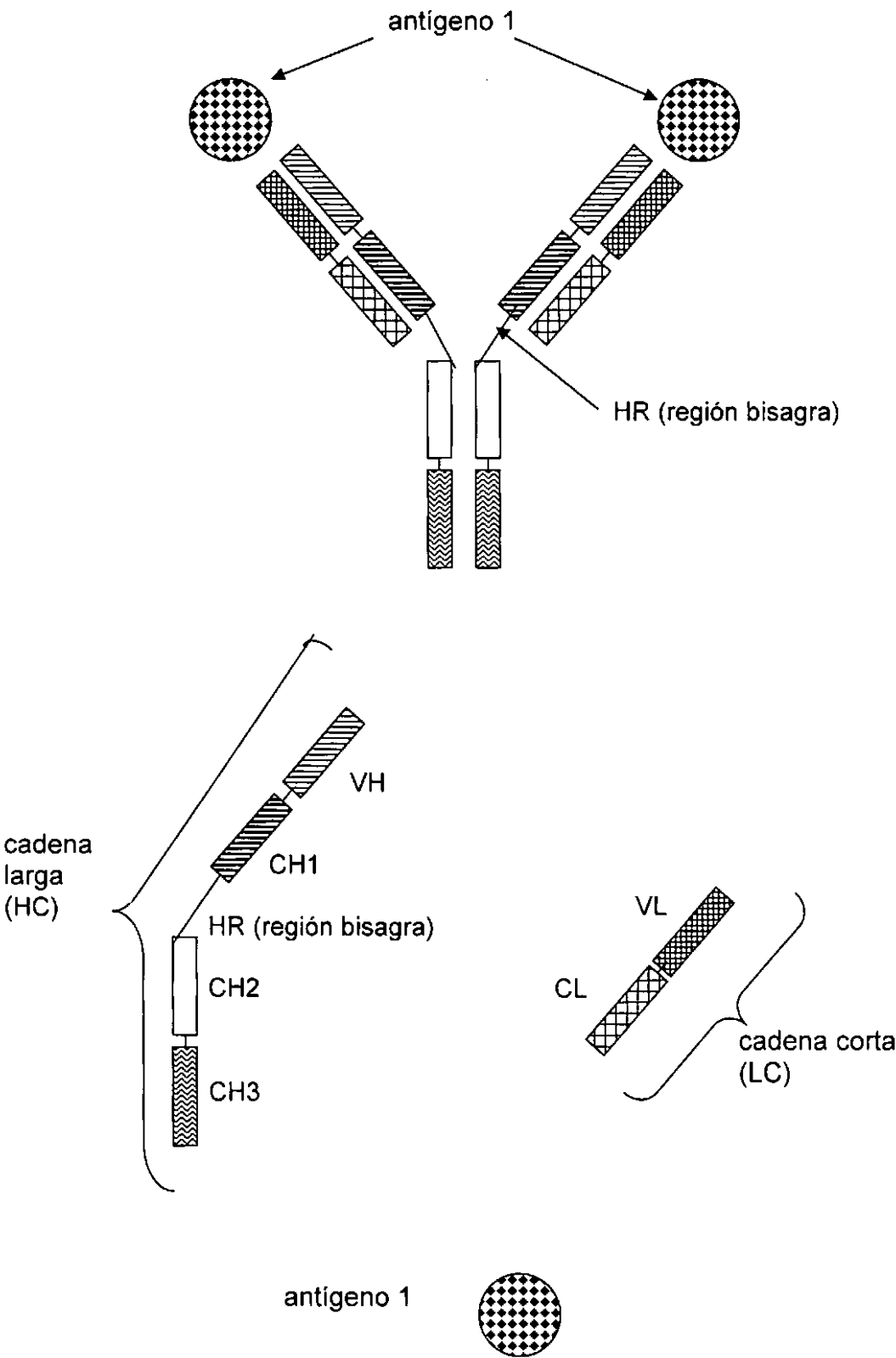


Fig. 2a

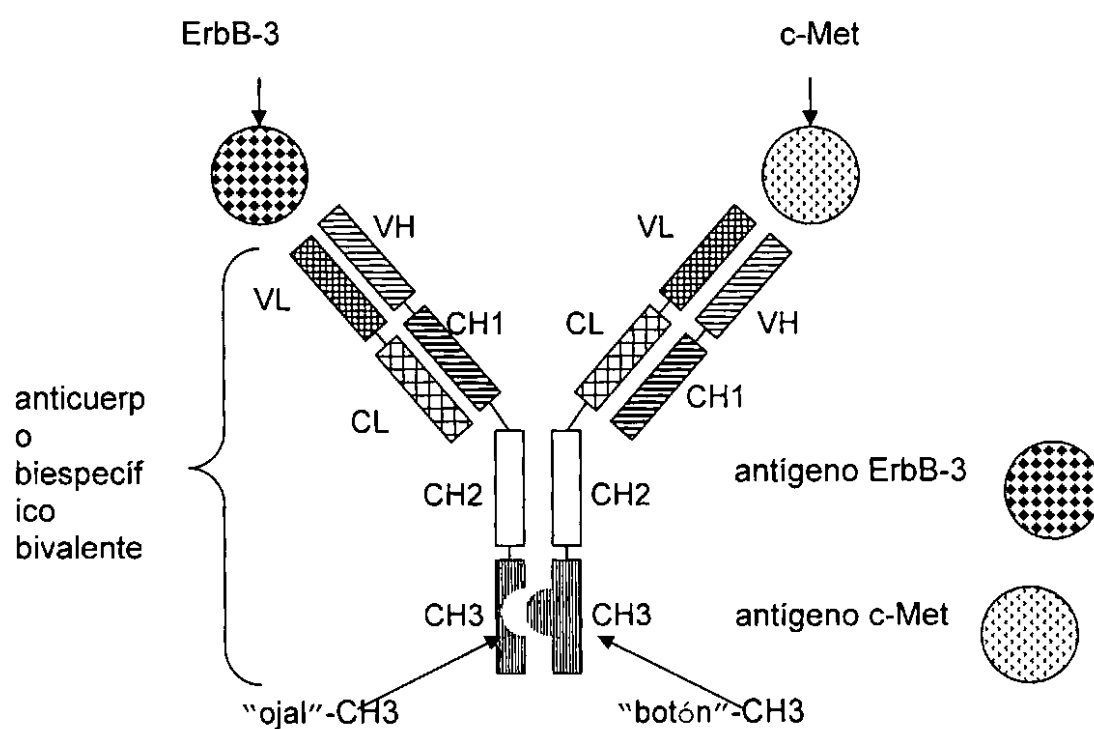
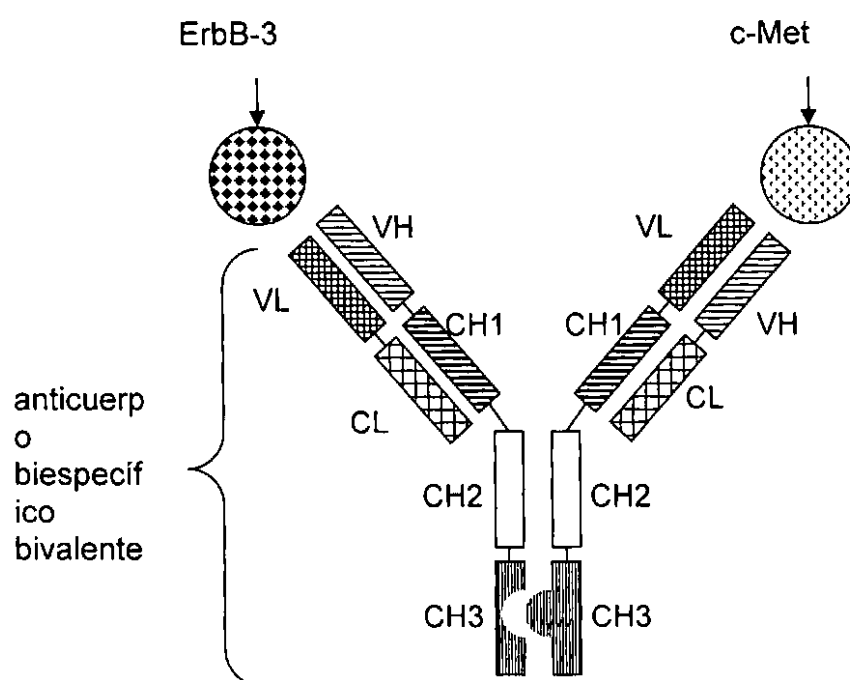


Fig. 2b

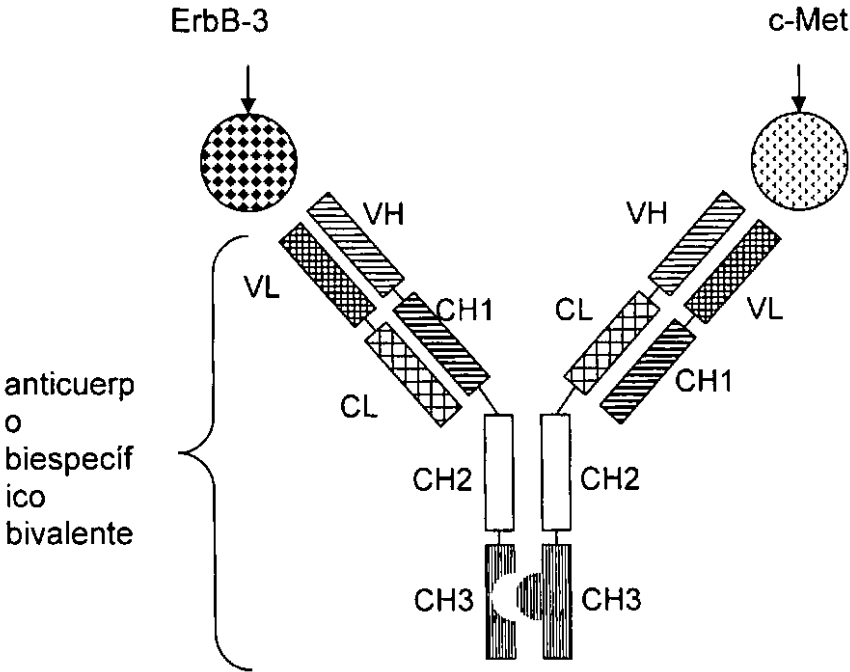


5

10

2/31

Fig. 2c



5

10

15

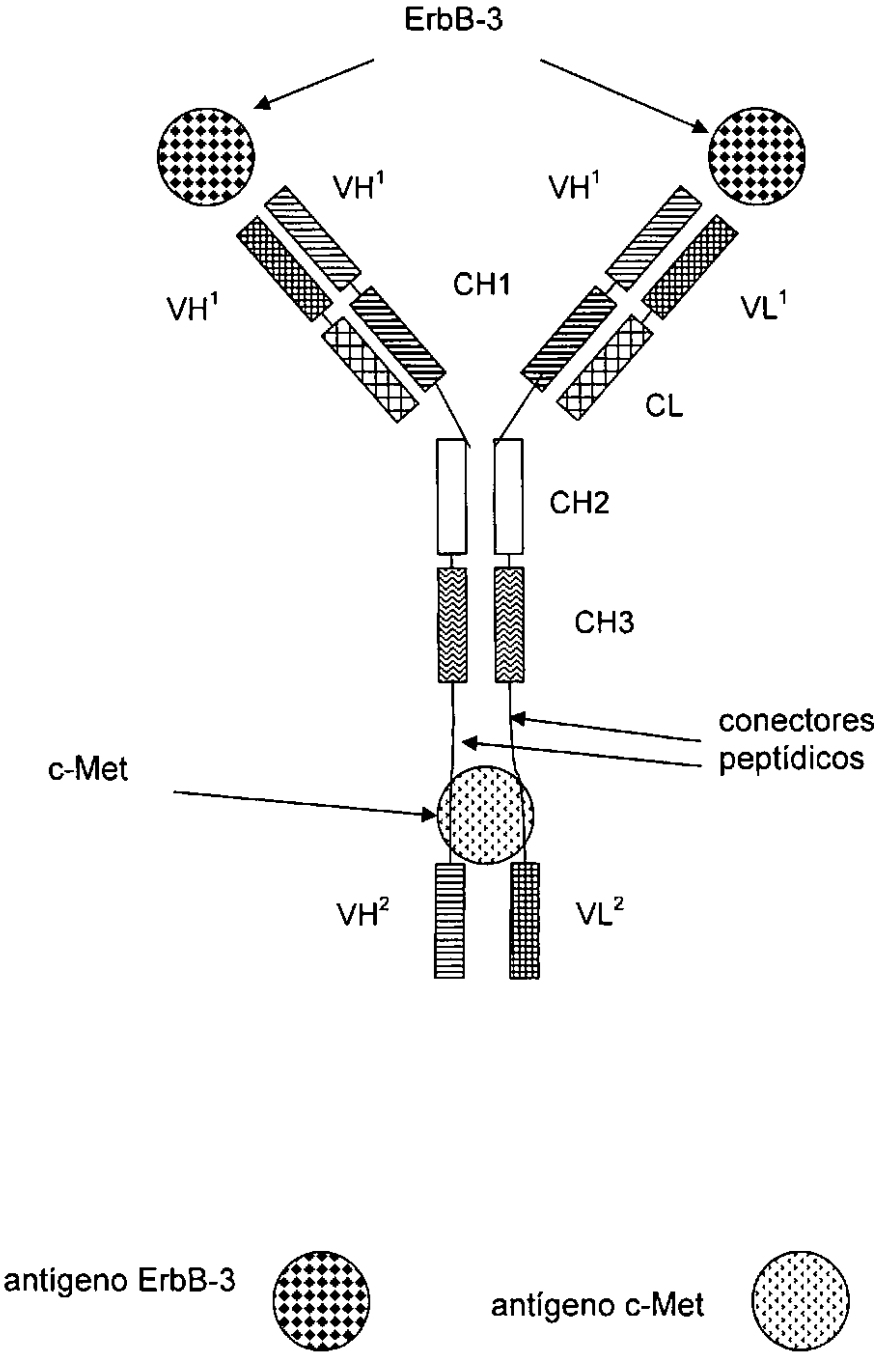
20

25

30

3/31

Fig. 3a

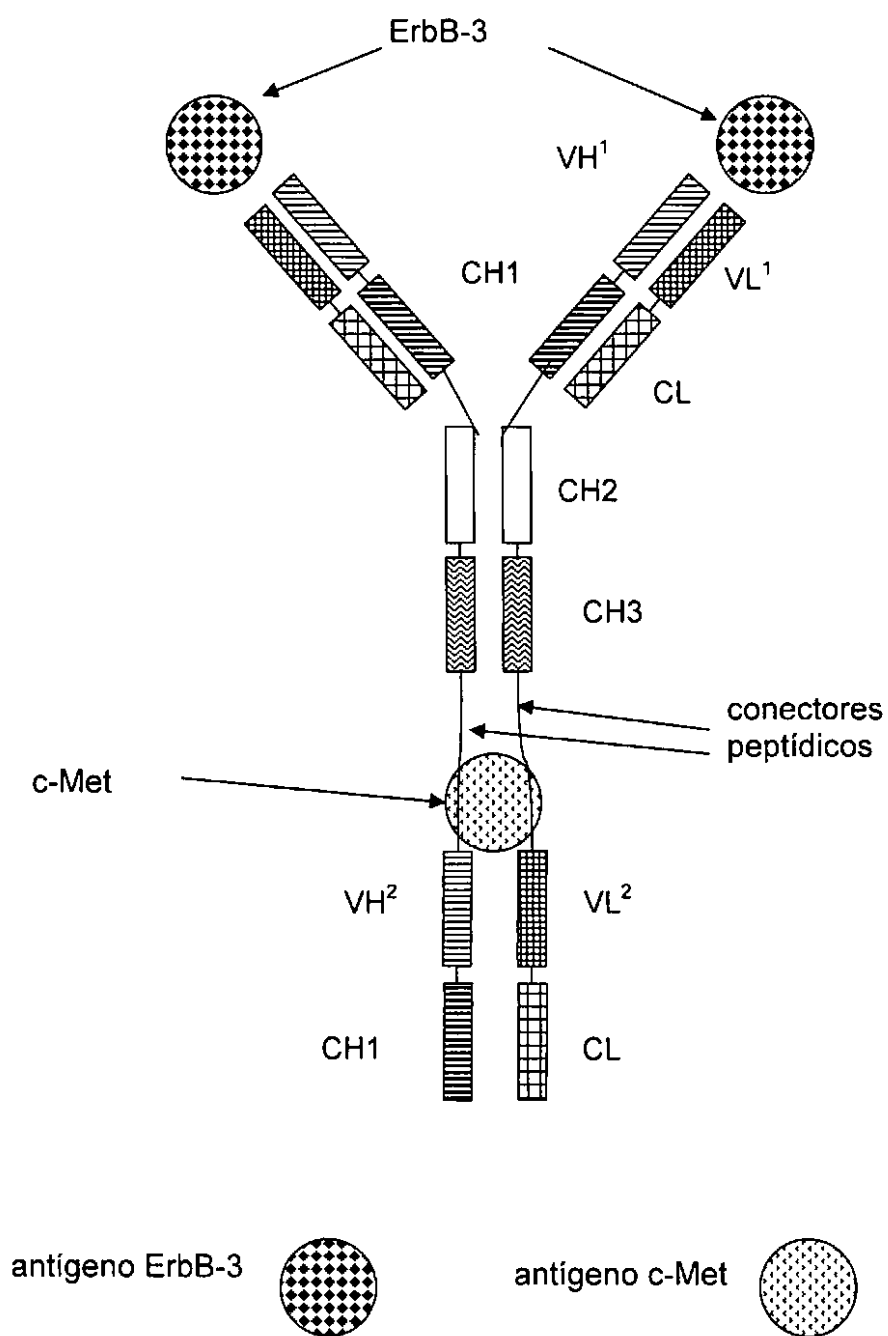


5

4/31

10

Fig. 3b



5

10

5/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 3d

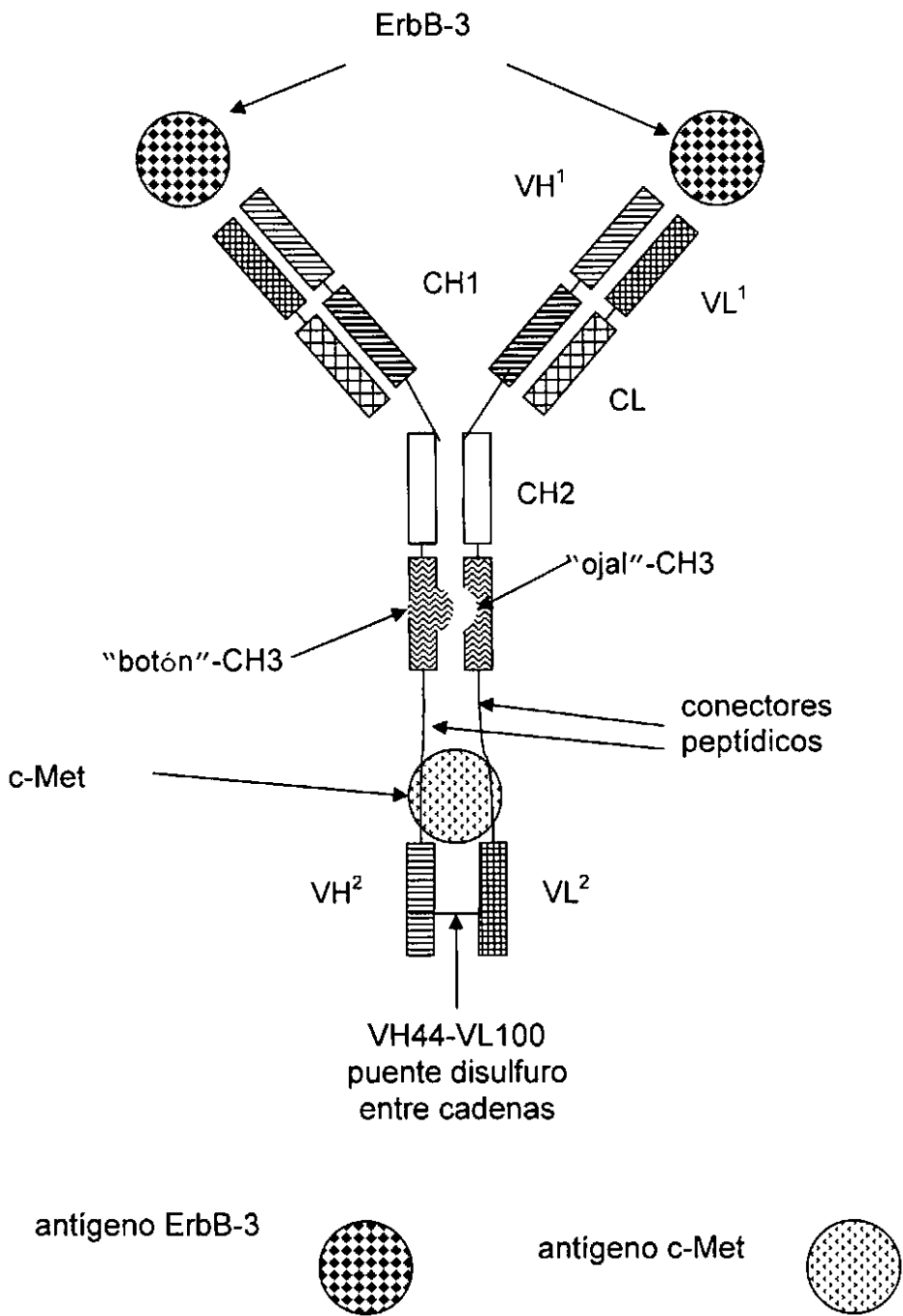


Fig. 4a

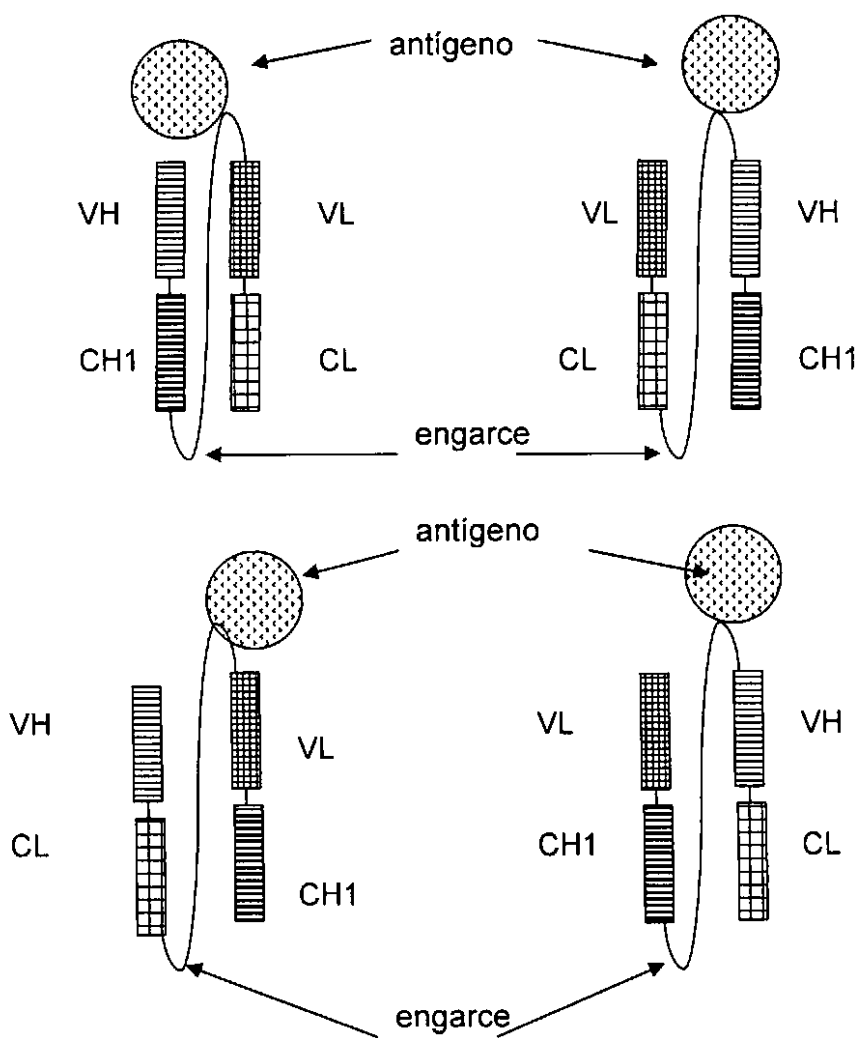


Fig. 4b

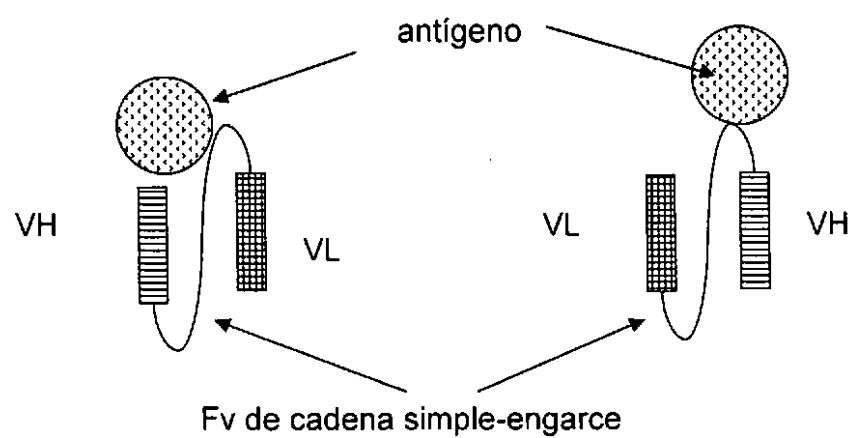
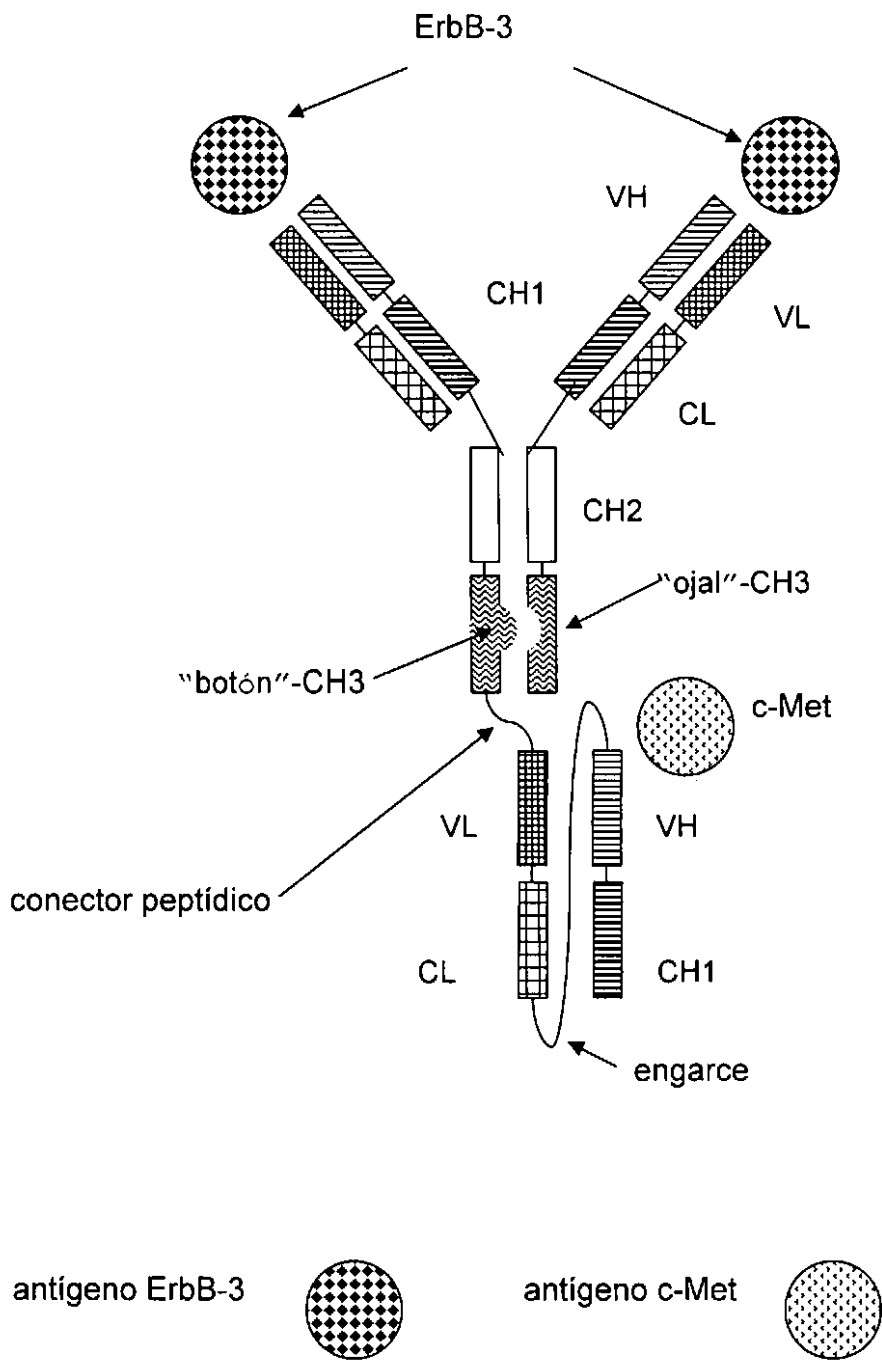


Fig. 5a

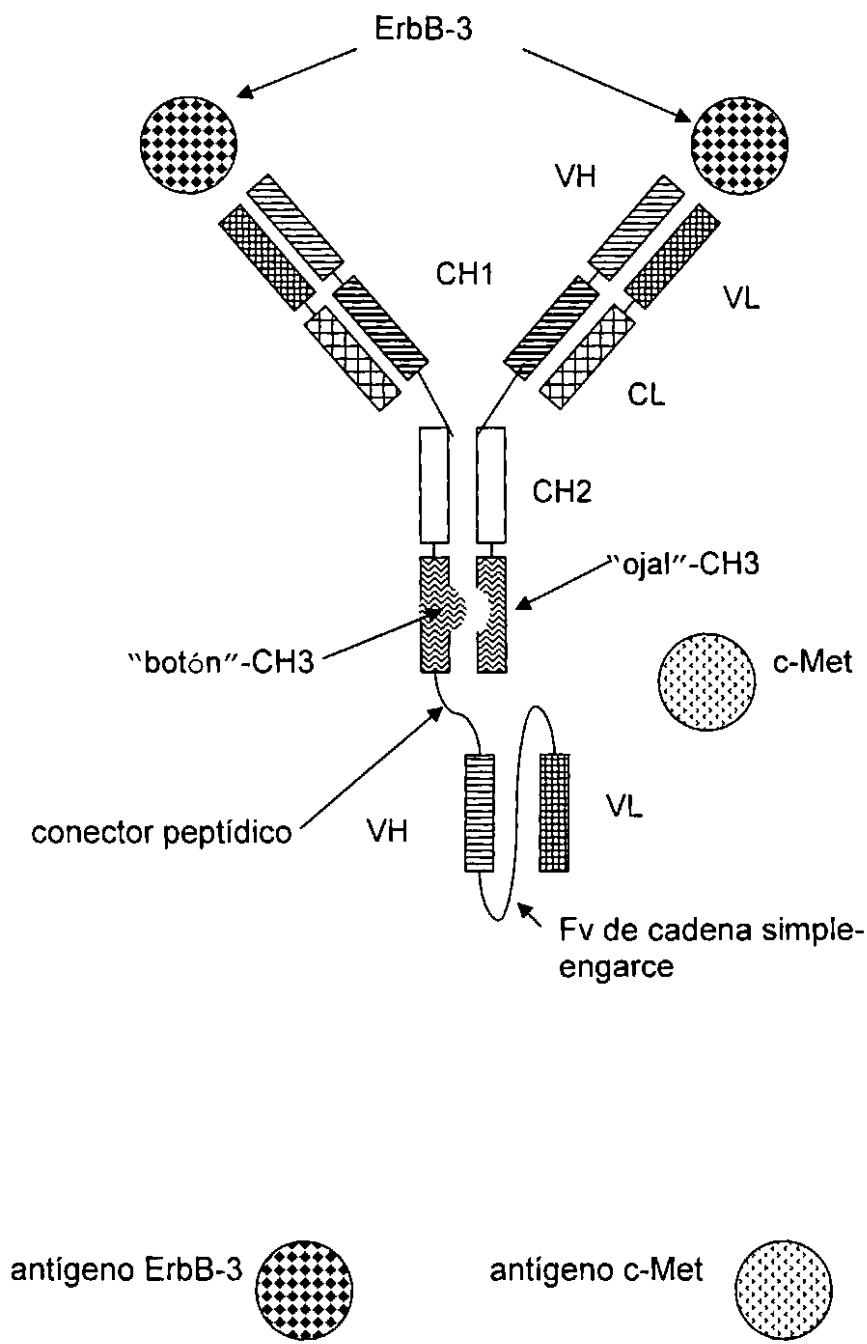


5

10

9/31

Fig. 5b



5

10

10/31

Fig. 6a

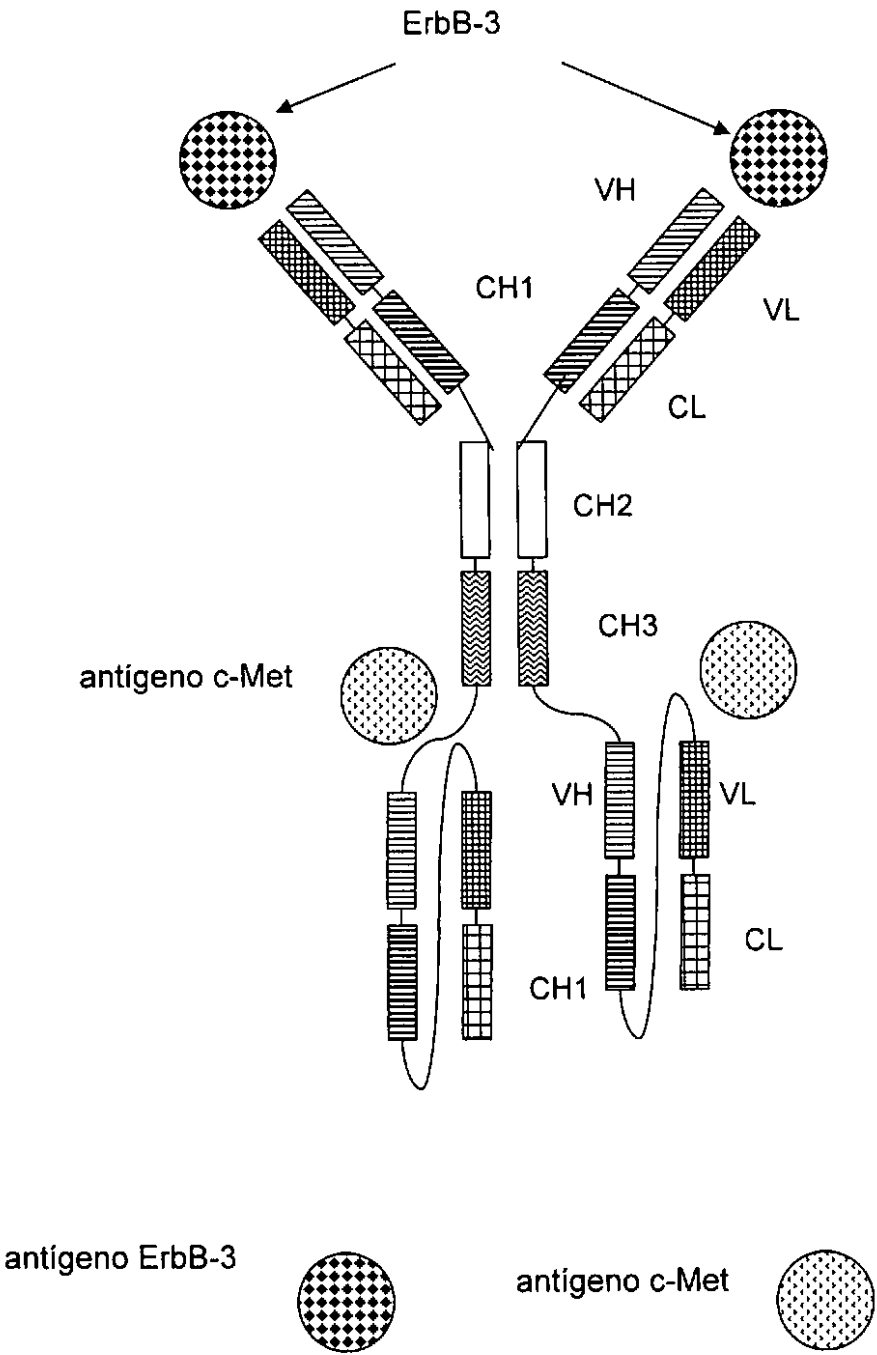


Fig. 6b

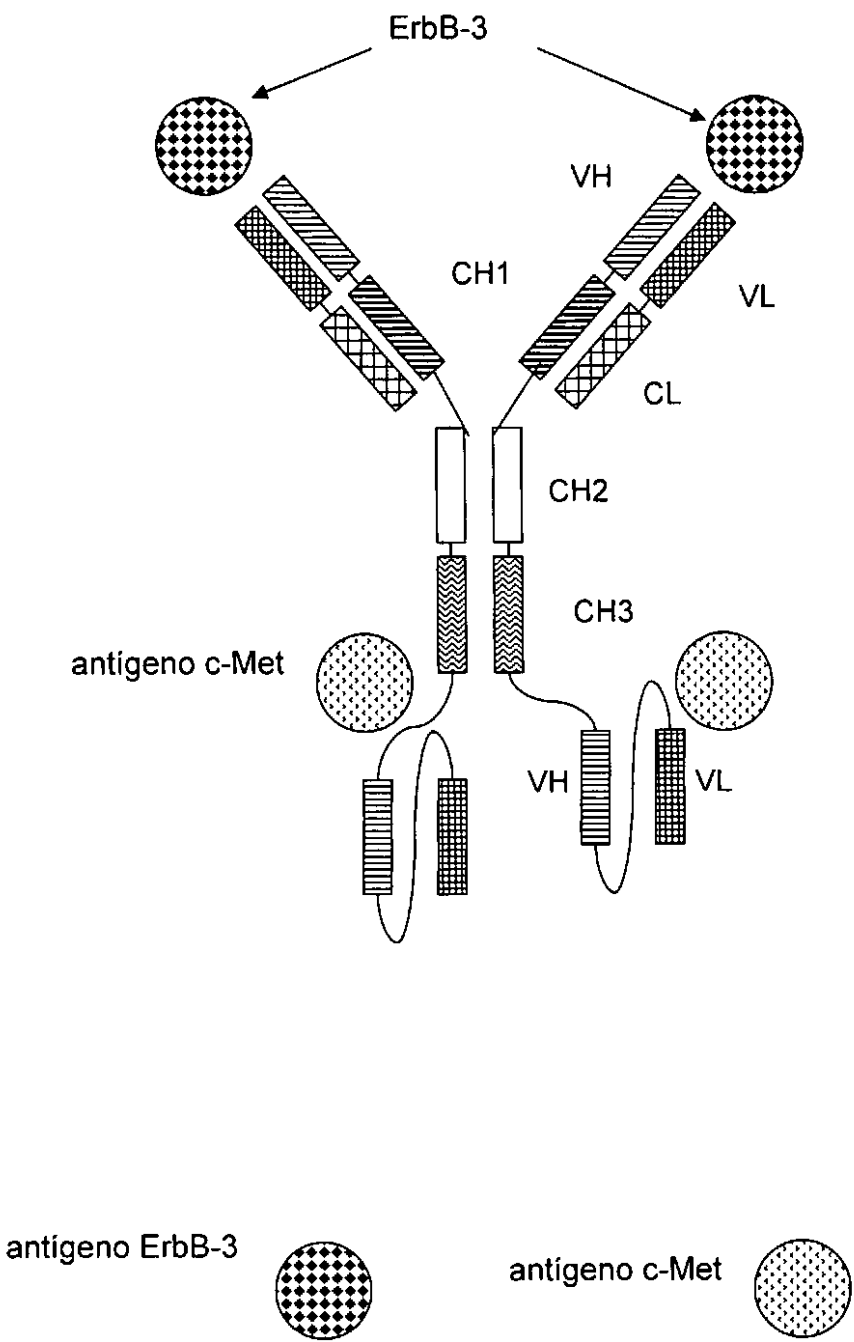
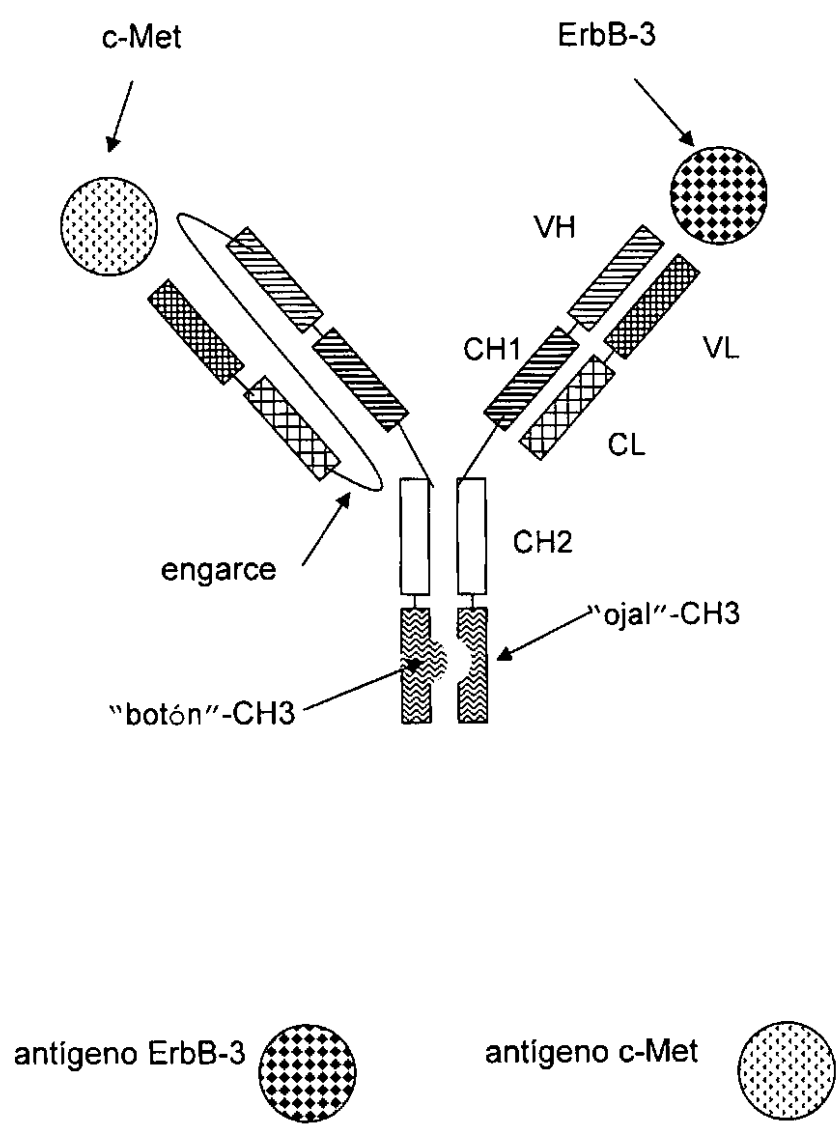


Fig. 7



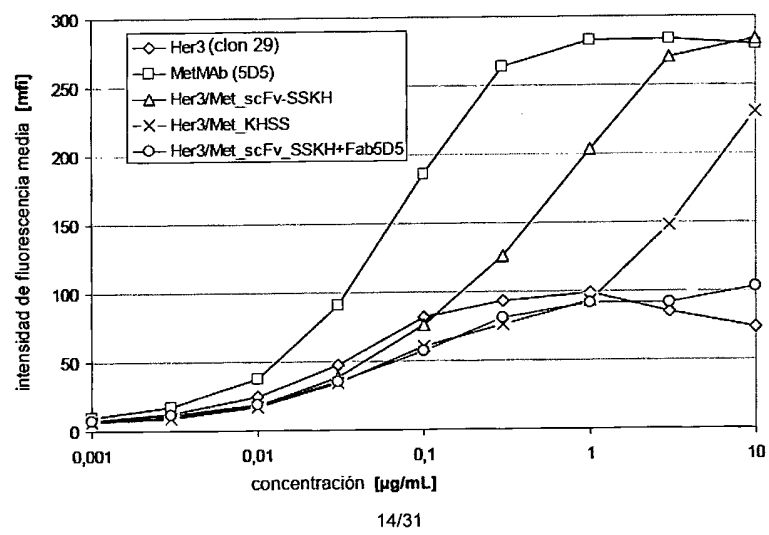
5

10

13/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 8



HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 9a

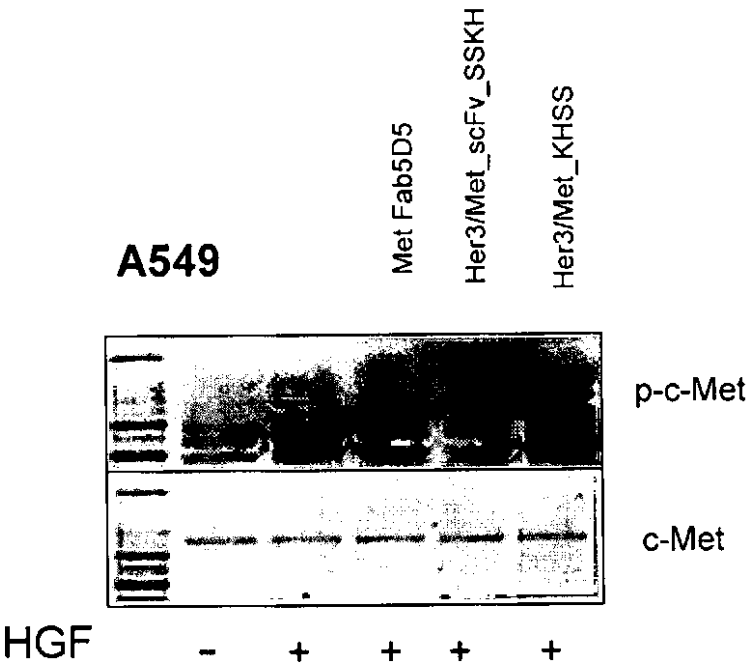
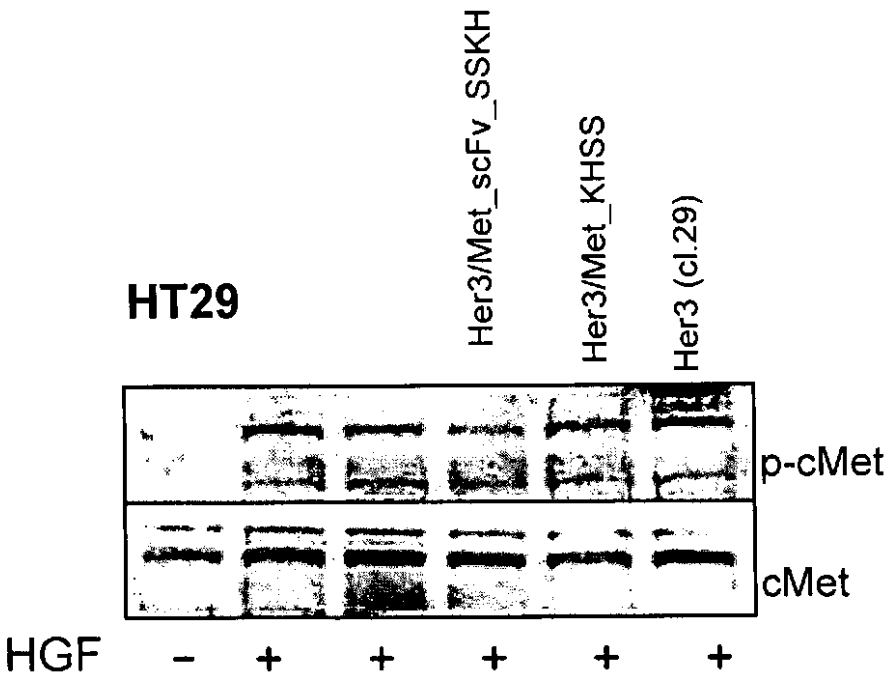


Fig. 9b



15/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 9c

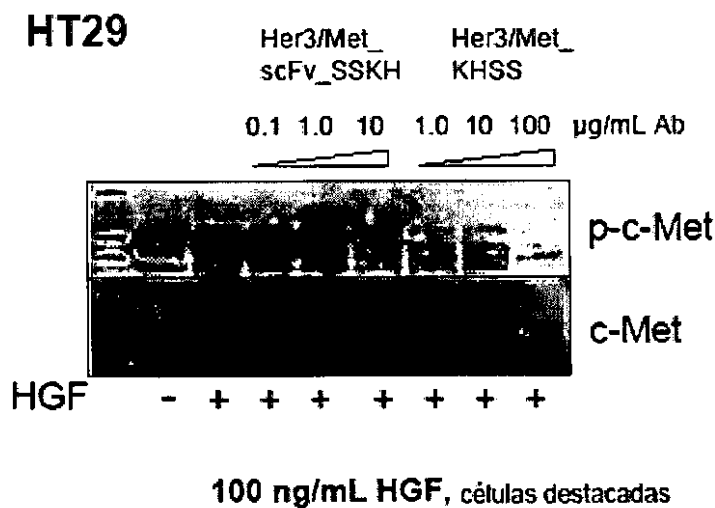


Fig. 10a

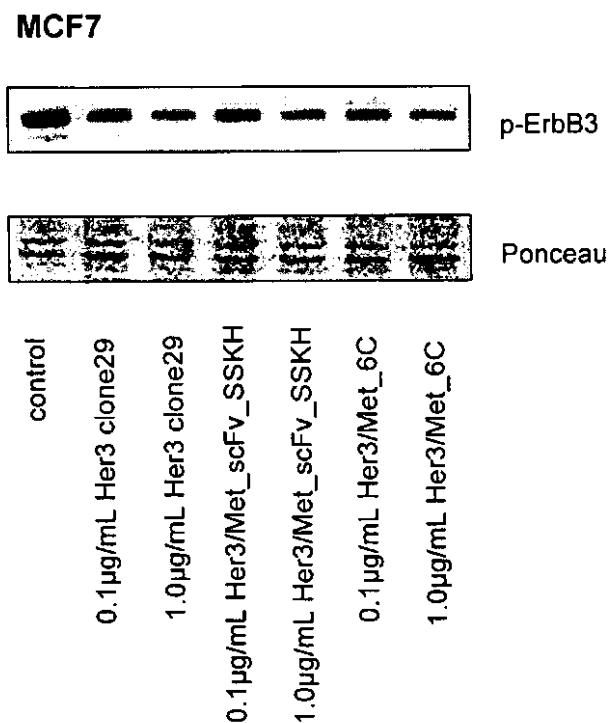


Fig. 10b

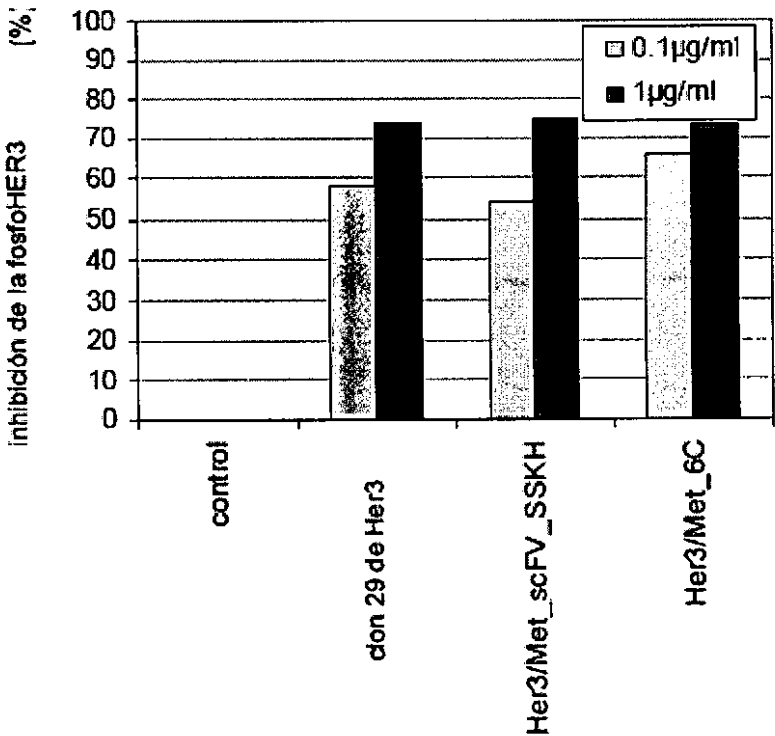
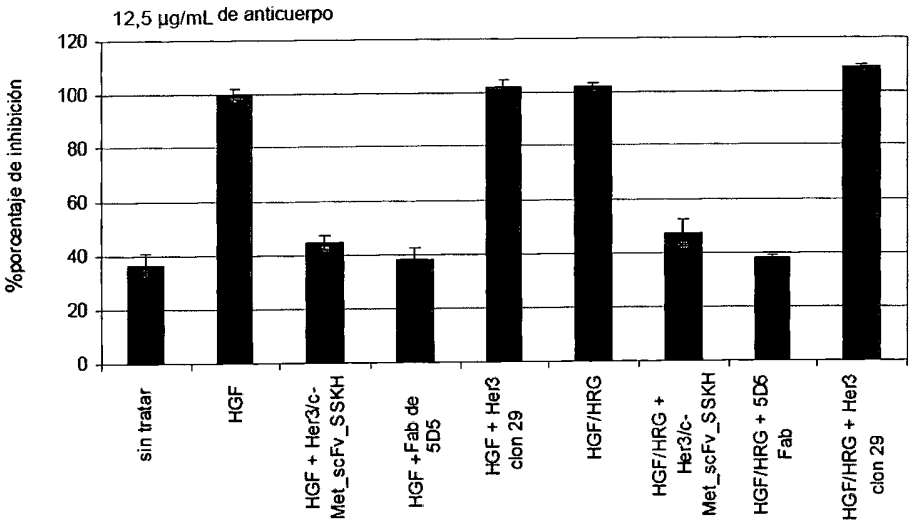


Fig. 11



18/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 12

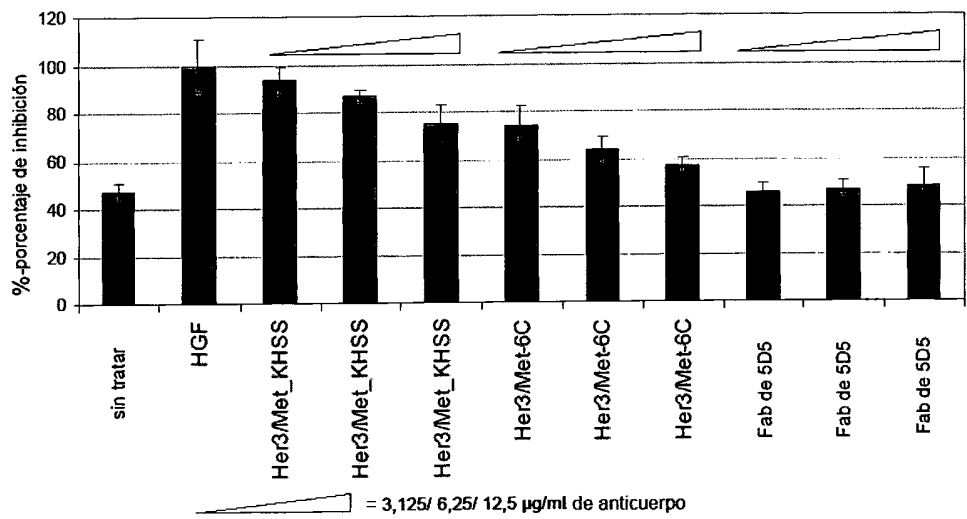
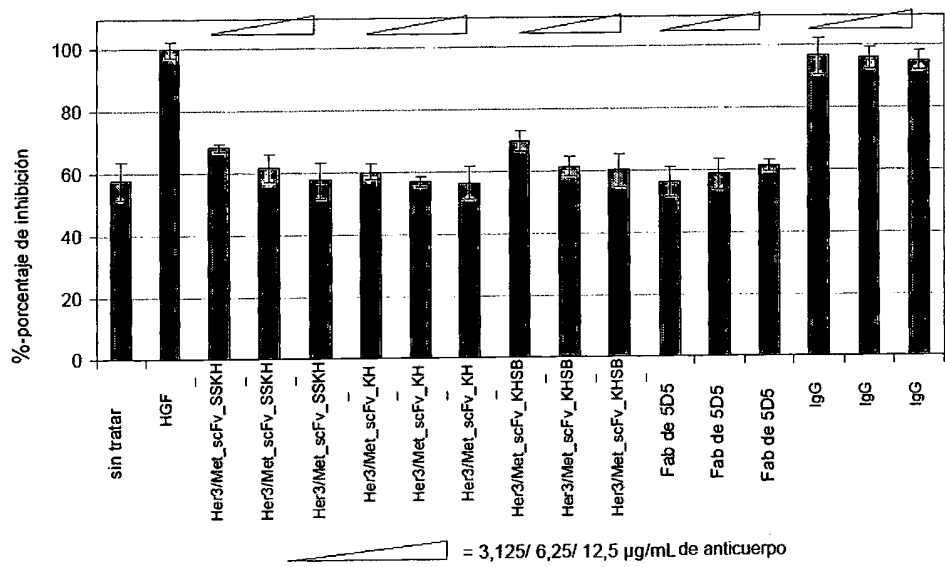


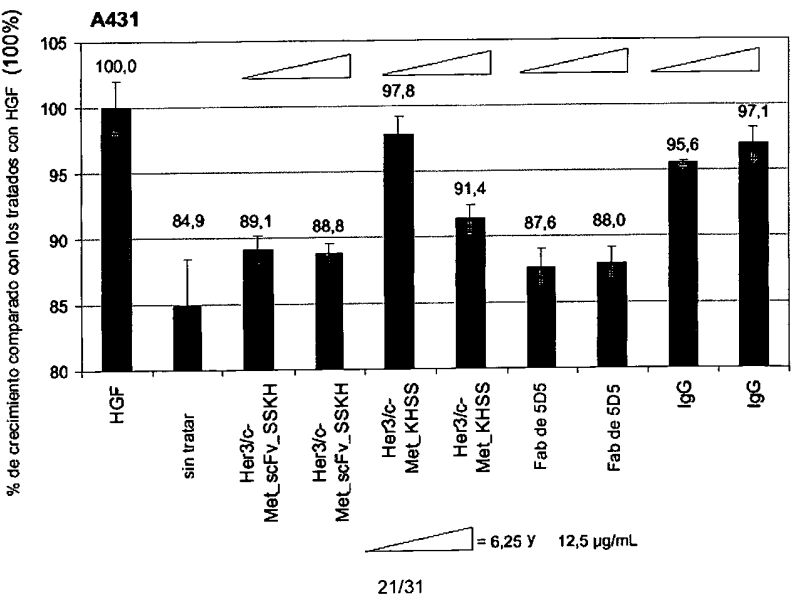
Fig. 13



20/31

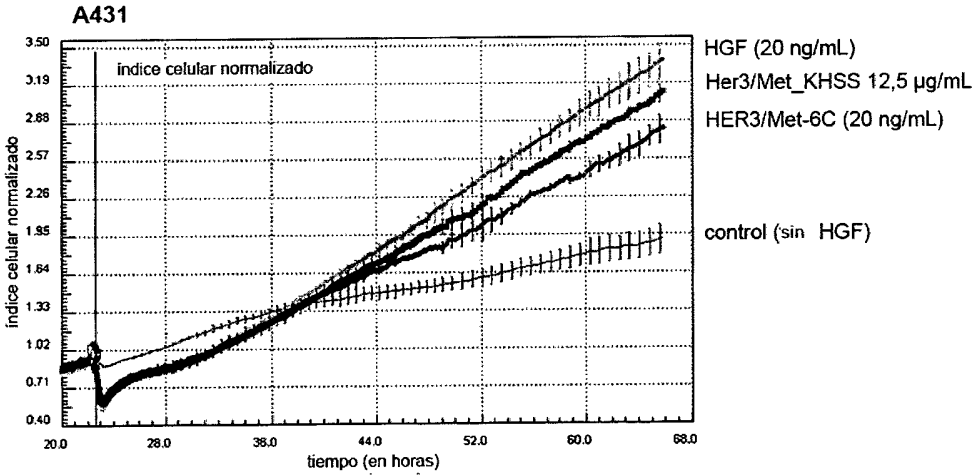
HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 14



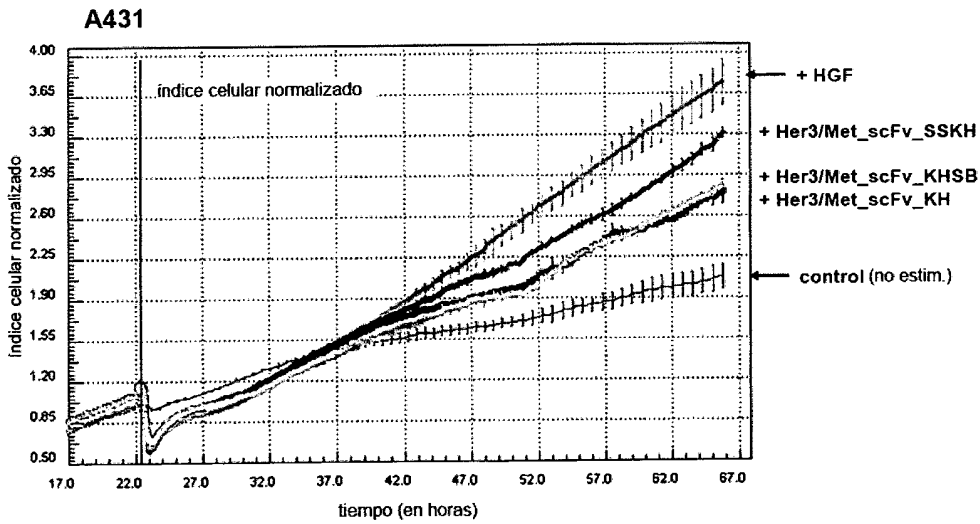
HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 15



154

Fig. 16

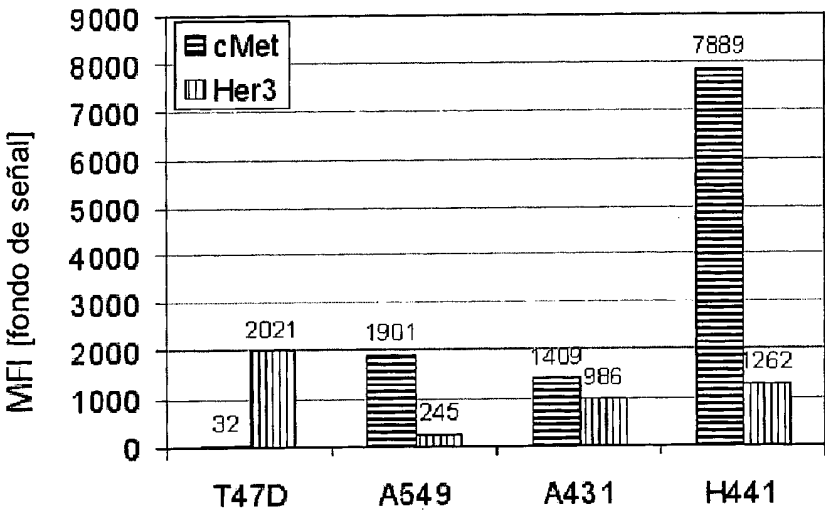


23/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

1<5

Fig. 17



24/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 18

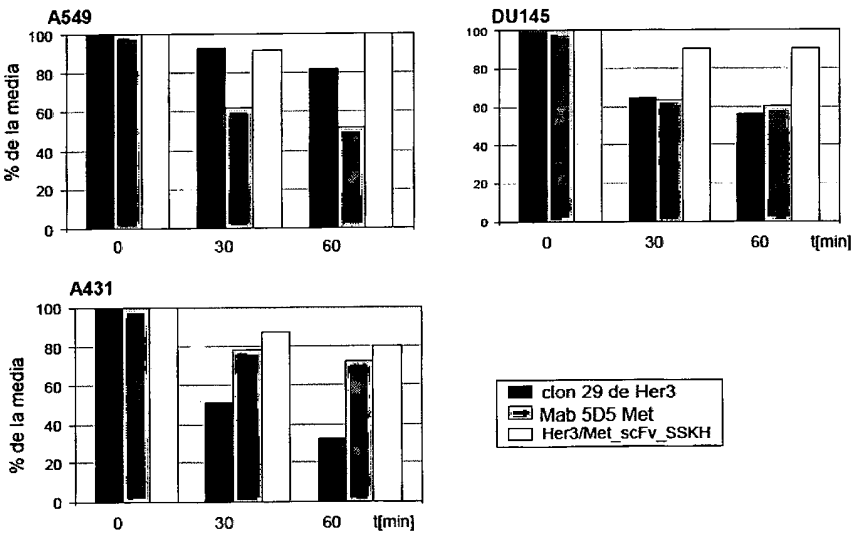


Fig. 19

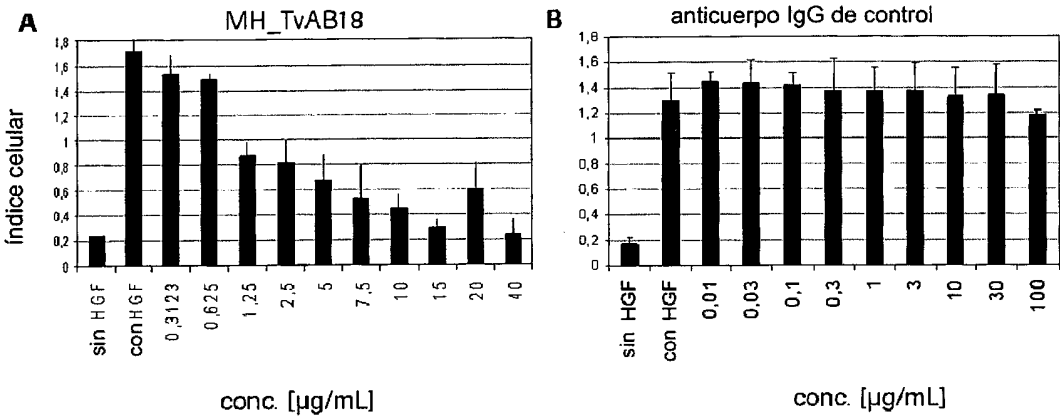


Fig. 20a

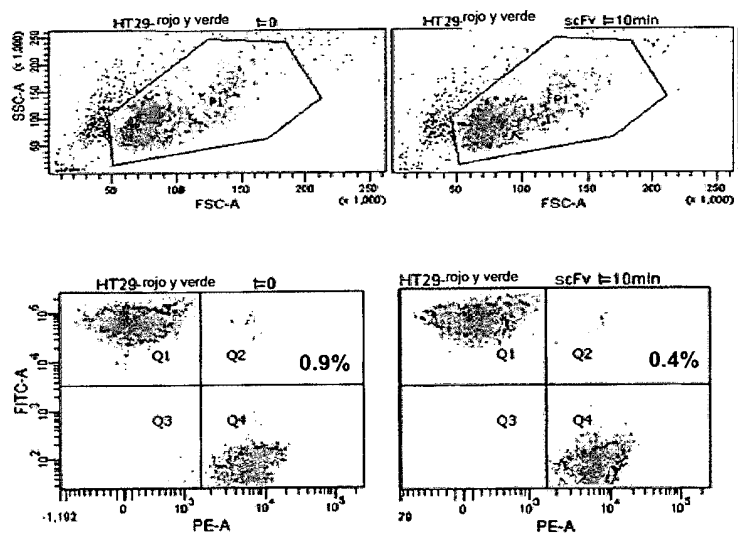


Fig. 20b

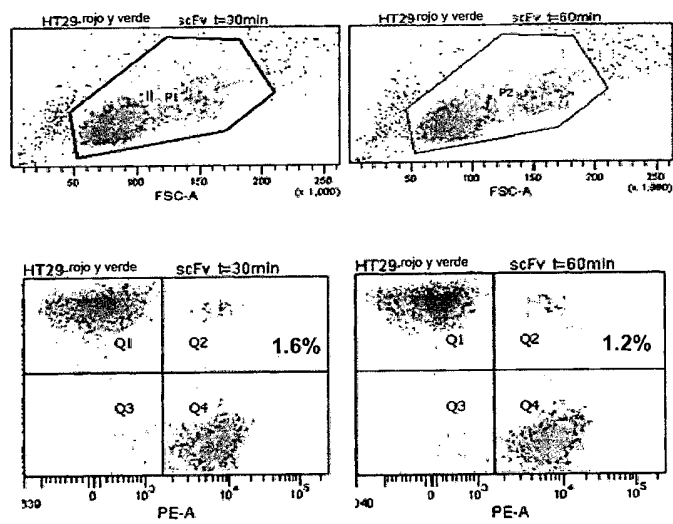
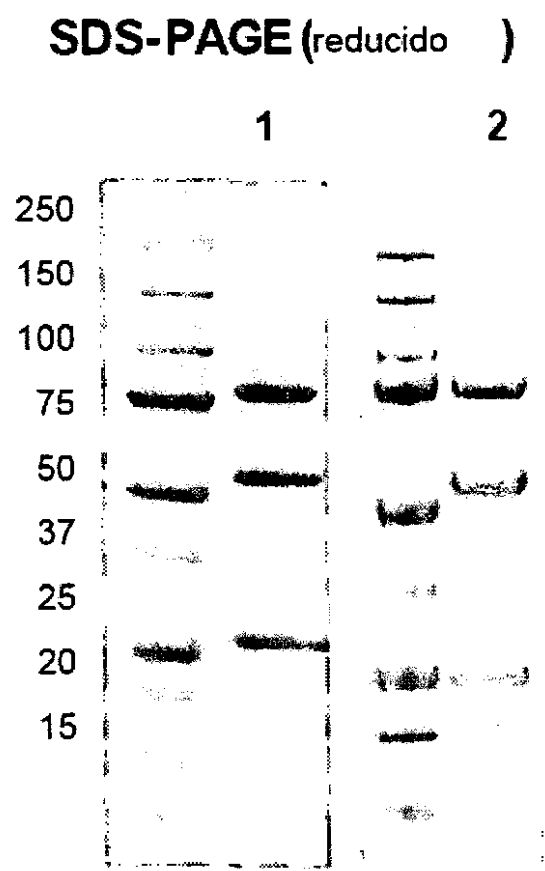


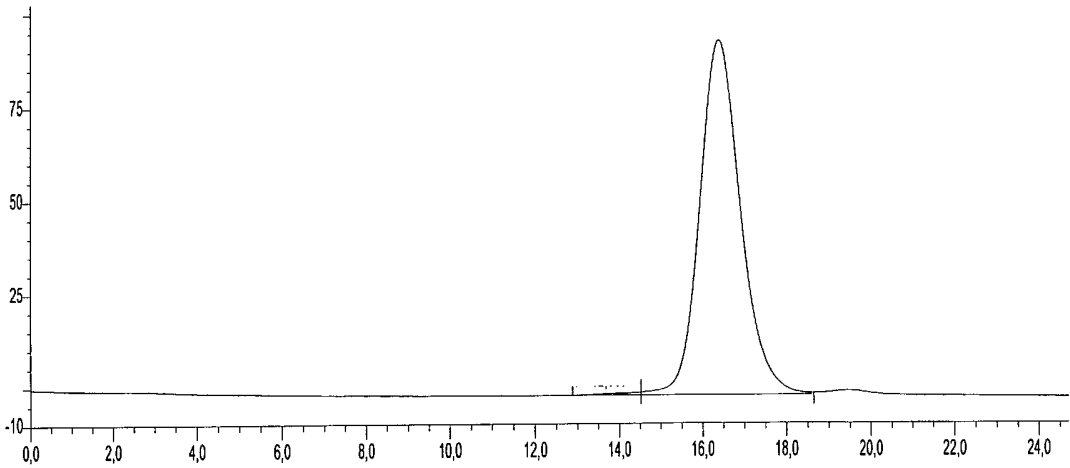
Fig. 21



29/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

Fig. 22a

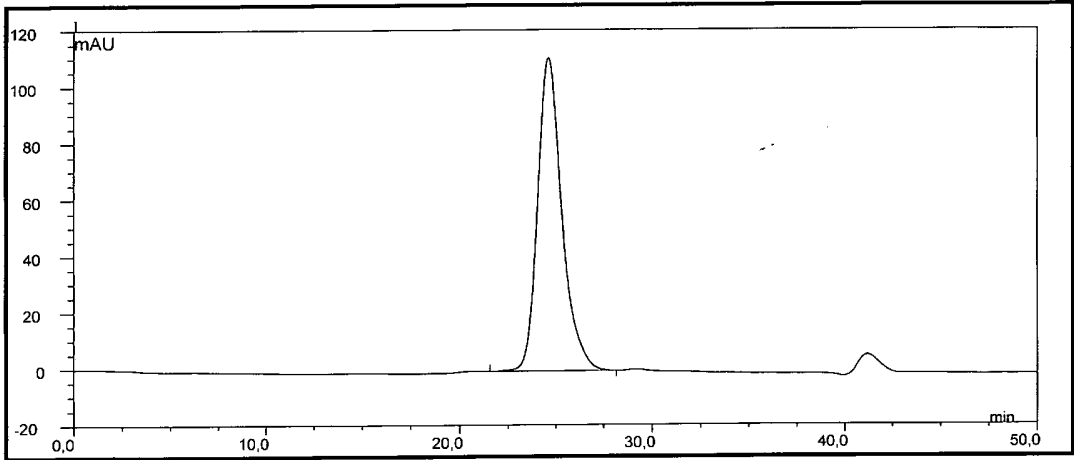


30/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

162

Fig. 22b



31/31

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Glycart AG

<120> Anticuerpos biespecíficos anti-ErbB-3/anti-c-Met

<130> 26064 FT

<150> EP 09005110.3

<151> 2009-04-07

<160> 71

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena corta, Mab 5D5 <c-Met>

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 5

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga clon, 29 de Her3

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, clon 29_KO1_LC de Her3

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
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> 7
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena larga, Mab 5D5 cMet

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 8

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Mab 5D5 cMet

<400> 8

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

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

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> cadena larga, Fab 5D5 cMet

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr His
 225

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

<220>
 <223> cadena corta, Fab 5D5 cMet

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 1, Her3/Met_KHSS <ErbB3-c-Met>

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
580

<210> 12

<211> 577

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Met_KHSS <ErbB3-c-Met>

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14
<211> 582
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena larga 1, Her3/Met_SSKH <ErbB3-c-Met>

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25

500 505 510

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
580

<210> 15

<211> 577

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 2, Her3/Met_SSKH <ErbB3-c-Met>

<400> 15

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

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

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

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

Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

465 470 475 480

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

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

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

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

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

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

Arg

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

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

<400> 16

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 17

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 1, Her3/Met_SSKHSS <ErbB3-c-Met>

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
580

<210> 18

<211> 577

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 2, Her3/Met_SSKHSS <ErbB3-c-Met>

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Met_SSKHSS <ErbB3-c-Met>

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 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> 20

<211> 572

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 1, Her3/Met_1C <ErbB3-c-Met>

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 450 455 460

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr
 465 470 475 480

Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 485 490 495

Gly Leu Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg
 500 505 510

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 530 535 540

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp
 545 550 555 560

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 565 570

<210> 21

<211> 567

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 2, Her3/Met_1C <ErbB3-c-Met>

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 565

<210> 22

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Met_1C <ErbB3-c-Met>

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena larga 1, Her3/Met_6C <ErbB3-c-Met>

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 595

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

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

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Met_6C <ErbB3-c-Met>

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 26

<211> 706

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 1, Her3/Met_scFvSSKHSS <ErbB3-c-Met>

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
465 470 475 480

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

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser
500 505 510

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

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
530 535 540

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr
545 550 555 560

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
595 600 605

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 610 615 620

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 625 630 635 640

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 645 650 655

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 660 665 670

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 675 680 685

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile
 690 695 700

Lys Arg
 705

<210> 27
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena larga 2, Her3/Met_scFvSSKHSS <ErbB3-c-Met>

<400> 27

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 28

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Met_scFvSSKHSS <ErbB3-c-Met>

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60

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> 29

<211> 706

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 1, Her3/Me_scFvSSKH <ErbB3-c-Met>

<400> 29

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

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

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

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

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

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 450 455 460

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 465 470 475 480

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

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser
 500 505 510

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

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 530 535 540

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr
 545 550 555 560

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 595 600 605

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 610 615 620

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 625 630 635 640

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 645 650 655

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 660 665 670

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

675 680 685

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile
690 695 700

Lys Arg
705

<210> 30
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena larga 2, Her3/Me_scFvSSKH <ErbB3-c-Met>

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Me_scFvSSKH <ErbB3-c-Met>

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 32

<211> 706

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 1, Her3/Me_scFvKH <ErbB3-c-Met>

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 450 455 460

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 465 470 475 480

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

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser
 500 505 510

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

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 530 535 540

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr
 545 550 555 560

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 595 600 605

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 610 615 620

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 625 630 635 640

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 645 650 655

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 660 665 670

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 675 680 685

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 690 695 700

Lys Arg
 705

<210> 33
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena larga 2, Her3/Me_scFvKH <ErbB3-c-Met>

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Me_scFvKH <ErbB3-c-Met>

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 35

<211> 706

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 1, Her3/Me_scFvKHSB <ErbB3-c-Met>

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
465 470 475 480

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

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser
500 505 510

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

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
530 535 540

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr
545 550 555 560

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
595 600 605

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
610 615 620

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
625 630 635 640

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
645 650 655

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
660 665 670

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
675 680 685

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile
690 695 700

Lys Arg
705

<210> 36
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena larga 2 Her3/Me_scFvKHSB <ErbB3-c-Met>

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Me_scFvKHSB <ErbB3-c-Met>

<400> 37

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 38

<211> 706

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 1, Her3/Met_scFvKHSBSS <ErbB3-c-Met>

<400> 38

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 355 360 365

Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 450 455 460

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 465 470 475 480

Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His Trp Val Arg
 485 490 495

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser
 500 505 510

Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile
 515 520 525

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 530 535 540

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr
545 550 555 560

Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
565 570 575

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
595 600 605

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
610 615 620

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
625 630 635 640

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
645 650 655

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
660 665 670

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
675 680 685

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile
690 695 700

Lys Arg
705

<210> 39

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga 2, Her3/Met_scFvKHSBSS <ErbB3-c-Met>

<400> 39

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Ala
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Asn Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Lys Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta, Her3/Met_scFvKHSBSS <ErbB3-c-Met>

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 41
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 42

<211> 377

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 44

<211> 104

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
20 25 30

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
35 40 45

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 45

<211> 1390

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
 20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
 35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
 50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
 65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
 85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
 100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
 130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
 145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe

180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
 580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
 595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
 610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
 660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
 755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg

100

770 775 780

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
 805 810 815

Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
 820 825 830

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
 835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
 850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
 885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
 900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
 915 920 925

Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala
 930 935 940

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln
945 950 955 960

Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His
 965 970 975

Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr
 980 985 990

Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro
 995 1000 1005

Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln
 1010 1015 1020

Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly
 1025 1030 1035

Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile
 1040 1045 1050

Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His
 1055 1060 1065

Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val
 1070 1075 1080

Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu
 1085 1090 1095

Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn
 1100 1105 1110

Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly
 1115 1120 1125

Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu
 1130 1135 1140

Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val Val Leu Pro
 1145 1150 1155

Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu Thr
 1160 1165 1170

His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln Val
 1175 1180 1185

Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg
 1190 1195 1200

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val
 1205 1210 1215

Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu
 1220 1225 1230

Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys
 1235 1240 1245

Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys
 1250 1255 1260

Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr
 1265 1270 1275

Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr
 1280 1285 1290

Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys
 1295 1300 1305

Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys
 1310 1315 1320

Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser
 1325 1330 1335

Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn
 1340 1345 1350

Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu
 1355 1360 1365

Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro
 1370 1375 1380

Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
 1385 1390

<210> 46

<211> 1342

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
 20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
 35 40 45

Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
 50 55 60

Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
 65 70 75 80

Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr
 85 90 95

Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp
 100 105 110

Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
 115 120 125

His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
 130 135 140

Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr
 145 150 155 160

Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
 165 170 175

Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly
 180 185 190

Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr
 195 200 205

Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn
 210 215 220

Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp
 225 230 235 240

Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val
 245 250 255

Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
 260 265 270

Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala
 275 280 285

Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala
 290 295 300

Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
 305 310 315 320

Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser
 325 330 335

Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val
 340 345 350

Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu
 355 360 365

Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu
 370 375 380

Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln
 385 390 395 400

Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr
 405 410 415

Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile
 420 425 430

Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu
 435 440 445

Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr
 450 455 460

His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu
 465 470 475 480

Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Val Ala Glu
 485 490 495

Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro

500 505 510

Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg Gly Gly Val
515 520 525

Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Glu Pro Arg Glu Phe Ala
530 535 540

His Glu Ala Glu Cys Phe Ser Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Met Glu
545 550 555 560

Gly Thr Ala Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Asp Thr Cys Ala Gln Cys
565 570 575

Ala His Phe Arg Asp Gly Pro His Cys Val Ser Ser Cys Pro His Gly
580 585 590

Val Leu Gly Ala Lys Gly Pro Ile Tyr Lys Tyr Pro Asp Val Gln Asn
595 600 605

Glu Cys Arg Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro
610 615 620

Glu Leu Gln Asp Cys Leu Gly Gln Thr Leu Val Leu Ile Gly Lys Thr
625 630 635 640

His Leu Thr Met Ala Leu Thr Val Ile Ala Gly Leu Val Val Ile Phe
645 650 655

Met Met Leu Gly Gly Thr Phe Leu Tyr Trp Arg Gly Arg Arg Ile Gln
660 665 670

Asn Lys Arg Ala Met Arg Arg Tyr Leu Glu Arg Gly Glu Ser Ile Glu
675 680 685

Pro Leu Asp Pro Ser Glu Lys Ala Asn Lys Val Leu Ala Arg Ile Phe
690 695 700

Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Leu Lys Val Leu Gly Ser Gly Val Phe
705 710 715 720

Gly Thr Val His Lys Gly Val Trp Ile Pro Glu Gly Glu Ser Ile Lys
725 730 735

Ile Pro Val Cys Ile Lys Val Ile Glu Asp Lys Ser Gly Arg Gln Ser
740 745 750

Phe Gln Ala Val Thr Asp His Met Leu Ala Ile Gly Ser Leu Asp His
755 760 765

Ala His Ile Val Arg Leu Leu Gly Leu Cys Pro Gly Ser Ser Leu Gln
770 775 780

Leu Val Thr Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp His Val Arg
785 790 795 800

Gln His Arg Gly Ala Leu Gly Pro Gln Leu Leu Leu Asn Trp Gly Val
805 810 815

Gln Ile Ala Lys Gly Met Tyr Tyr Leu Glu Glu His Gly Met Val His
820 825 830

Arg Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Lys Ser Pro Ser Gln Val
835 840 845

Gln Val Ala Asp Phe Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Pro Asp Asp Lys
850 855 860

Gln Leu Leu Tyr Ser Glu Ala Lys Thr Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu
865 870 875 880

Glu Ser Ile His Phe Gly Lys Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
885 890 895

Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Glu Pro Tyr
 900 905 910

Ala Gly Leu Arg Leu Ala Glu Val Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu
 915 920 925

Arg Leu Ala Gln Pro Gln Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val Met
 930 935 940

Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Glu Asn Ile Arg Pro Thr Phe Lys Glu
 945 950 955 960

Leu Ala Asn Glu Phe Thr Arg Met Ala Arg Asp Pro Pro Arg Tyr Leu
 965 970 975

Val Ile Lys Arg Glu Ser Gly Pro Gly Ile Ala Pro Gly Pro Glu Pro
 980 985 990

His Gly Leu Thr Asn Lys Lys Leu Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Glu
 995 1000 1005

Leu Asp Leu Asp Leu Asp Leu Glu Ala Glu Glu Asp Asn Leu Ala
 1010 1015 1020

Thr Thr Thr Leu Gly Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Gly Thr Leu
 1025 1030 1035

Asn Arg Pro Arg Gly Ser Gln Ser Leu Leu Ser Pro Ser Ser Gly
 1040 1045 1050

Tyr Met Pro Met Asn Gln Gly Asn Leu Gly Glu Ser Cys Gln Glu
 1055 1060 1065

Ser Ala Val Ser Gly Ser Ser Glu Arg Cys Pro Arg Pro Val Ser
 1070 1075 1080

Leu His Pro Met Pro Arg Gly Cys Leu Ala Ser Glu Ser Ser Glu
1085 1090 1095

Gly His Val Thr Gly Ser Glu Ala Glu Leu Gln Glu Lys Val Ser
1100 1105 1110

Met Cys Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro Arg Pro Arg Gly
1115 1120 1125

Asp Ser Ala Tyr His Ser Gln Arg His Ser Leu Leu Thr Pro Val
1130 1135 1140

Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu Asp Val Asn Gly
1145 1150 1155

Tyr Val Met Pro Asp Thr His Leu Lys Gly Thr Pro Ser Ser Arg
1160 1165 1170

Glu Gly Thr Leu Ser Ser Val Gly Leu Ser Ser Val Leu Gly Thr
1175 1180 1185

Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Tyr Met Asn Arg Arg
1190 1195 1200

Arg Arg His Ser Pro Pro His Pro Pro Arg Pro Ser Ser Leu Glu
1205 1210 1215

Glu Leu Gly Tyr Glu Tyr Met Asp Val Gly Ser Asp Leu Ser Ala
1220 1225 1230

Ser Leu Gly Ser Thr Gln Ser Cys Pro Leu His Pro Val Pro Ile
1235 1240 1245

Met Pro Thr Ala Gly Thr Thr Pro Asp Glu Asp Tyr Glu Tyr Met
1250 1255 1260

Asn Arg Gln Arg Asp Gly Gly Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Ala
1265 1270 1275

Met Gly Ala Cys Pro Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg
 1280 1285 1290

Ala Phe Gln Gly Pro Gly His Gln Ala Pro His Val His Tyr Ala
 1295 1300 1305

Arg Leu Lys Thr Leu Arg Ser Leu Glu Ala Thr Asp Ser Ala Phe
 1310 1315 1320

Asp Asn Pro Asp Tyr Trp His Ser Arg Leu Phe Pro Lys Ala Asn
 1325 1330 1335

Ala Gln Arg Thr
 1340

<210> 47
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 47

Gln Gly Gln Met Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Leu Lys Gln Lys Pro Arg Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Thr Gly Lys Ala Gln Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

111

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 48

<211> 113

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Asn Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asn Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ser Ile Tyr Tyr Cys Gln Ser
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 49
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena larga VH, Mab 205.10

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> dominio variable de cadena corta VL, Mab 205.10.1

<400> 50

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 51

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena corta VL, Mab 205.10.2

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser

114

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 52

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de cadena corta VL, Mab 205.10.3

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

115

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ser Ile Tyr Tyr Cys Gln Ser
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena larga CDR3H, Mab 205.10

<400> 53

His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr
1 5 10

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena larga CDR2H, Mab 205.10

<400> 54

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena larga CDR1H, Mab 205.10

<400> 55

Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser Tyr Ile Ser
1 5 10

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena corta CDR3L, Mab 205.10

<400> 56

Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena corta CDR2L, Mab 205.10

<400> 57

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena corta CDR1L (variante 1), Mab 205.10

<400> 58

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta CDR1L (variante 2), Mab 205.10

<400> 59

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 60

Glu Ser Asp Tyr Ala Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 61

Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 62

Ser Ala Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

<210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 63

Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp Thr
 1 5

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 64

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 65

Arg Ala Arg Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> cadena larga CDR3H, Mab 5D5 <c-Met>

<400> 66

Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga CDR2H, Mab 5D5 <c-Met>

<400> 67

Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena larga CDR1H, Mab 5D5 <c-Met>

<400> 68

Ser Tyr Trp Leu His
 1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena corta CDR3L, Mab 5D5 <c-Met>

<400> 69

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena corta CDR2L, Mab 5D5 <c-Met>

<400> 70

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena corta CDR1L, Mab 5D5 <c-Met>

<400> 71

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que solicita una patente
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art .33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ~~1~~ ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ~~32~~ ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resume)
 - ~~134~~ ☒ Dibujos de ser estos pertinentes.
 - ~~2~~ ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación grafica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐