

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 267**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2016 PCT/CN2016/070447**
87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016 WO16110267**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2016 E 16734927 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3243840**

54 Título: **Anticuerpo biespecífico o mezcla de anticuerpos con cadenas ligeras comunes**

30 Prioridad:

08.01.2015 CN 201510008045

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2021

73 Titular/es:

**JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS
CO., LTD. (100.0%)
Room 401/501, Building C23 No. 218 Xinghu
Street, SIP China (Jiangsu) Pilot Free Trade Zone
Suzhou Area
Suzhou, Jiangsu 215125, CN**

72 Inventor/es:

**XU, TING;
XU, TAO;
WANG, XIAOXIAO;
LI, QIAN;
PANG, MINJIE;
ZHANG, HUIMIN;
HAN, LI y
ZHANG, QINGQING**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 811 267 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo biespecífico o mezcla de anticuerpos con cadenas ligeras comunes

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico o a una parte de unión a antígeno del mismo, y a un método de preparación del anticuerpo biespecífico o a la parte de unión a antígeno. La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo, un vector recombinante y una célula recombinante que contiene la molécula de ácido nucleico.

Antecedentes

El número de fármacos de anticuerpo monoclonal que se comercializan aumenta rápidamente durante los últimos 15 años, y se ha convertido en un campo de crecimiento en la industria farmacéutica. Desde 1996, se han aprobado en total alrededor de 30 fármacos de anticuerpo monoclonal, donde la venta anual de 9 fármacos de anticuerpo monoclonal supera los 1.000 millones de dólares estadounidenses. En 2010, la venta total de los fármacos de anticuerpo monoclonal supera los 30 mil millones de dólares estadounidenses, con una tasa de crecimiento anual de más del 10%. Debido a su fuerte especificidad de diana, un anticuerpo monoclonal solo puede inhibir una sola diana, mientras que en muchas enfermedades (incluyendo tumores y enfermedades autoinmunes), es necesario inhibir múltiples vías de señal para evitar efectos de compensación. Para enfermedades de infección por virus, debido a la alta tasa de mutación del virus, a menudo es necesario inhibir múltiples sitios de antígeno para evitar el escape. Por tanto, existen varias alternativas para resolver este problema. Una alternativa es usar un anticuerpo policlonal, o un heterodímero (como un anticuerpo biespecífico) obtenido mediante la modificación de un fragmento Fc del anticuerpo, de modo que tendrá actividades contra al menos dos antígenos diferentes o dos sitios de unión diferentes del mismo antígeno. Otra alternativa es usar una mezcla de anticuerpos, que puede contener dos o más anticuerpos contra diferentes epítomos de antígeno en la misma diana o contra diferentes dianas.

Un anticuerpo biespecífico (BsAbs) es una molécula de inmunoglobulina que contiene dos sitios de unión a ligando diferentes. Comprende dos secuencias Fab diferentes, en lugar de las mismas secuencias para los dos brazos Fab de un anticuerpo clásico. Por tanto, dos brazos del anticuerpo en forma de Y pueden unirse a diferentes epítomos de antígeno. La aplicación del anticuerpo biespecífico en el tratamiento del cáncer se ha revisado en múltiples documentos (Carter 2001; Chames y Baty 2009; Chames y Baty 2009). Un brazo de BsAbs puede conectarse con un antígeno relacionado con la superficie de célula tumoral y el otro brazo puede desencadenar células efectoras inmunes para además destruir células con el fin de destruir células tumorales con la ayuda del sistema inmunitario.

Para la preparación de un anticuerpo biespecífico, ya en la década de 1990, Carter *et al.* modificaron algunos aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo usando un modelo de “botón en agujero” (del inglés “knob into hole”) para lograr con éxito la preparación del anticuerpo biespecífico (Ridgway, Presta *et al.* 1996; Carter 2001). Sin embargo, en su investigación, la capacidad de prevenir la formación de homodímeros “agujero a agujero” todavía era insuficiente, se observó aún alrededor del 5% de homodímeros. Después de eso, este grupo de investigación trató de mejorar además el contenido de heterodímeros a través de métodos como la exposición en fago de mutación aleatoria, pero el problema no se resolvió fundamentalmente.

Los inventores de la presente invención modificaron los aminoácidos relacionados con CH3 de Fc basándose en una red de interacción de aminoácidos cargada para debilitar las interacciones de los dominios entre los mismos (lo que facilita la formación de homodímeros) y potenciar las interacciones entre diferentes dominios (lo que facilita la formación de heterodímeros), resolviendo así con éxito el problema del 5% de homodímeros restantes en el modelo “botón en agujero”, y se han descrito métodos relacionados en una solicitud de patente (publicación n.º: CN102558355A).

A diferencia de la tecnología de plataforma de heterodímero, el desarrollo de una plataforma de producción de mezcla de anticuerpos está todavía en una fase relativamente temprana, en la que se ha atraído mucha atención a una tecnología de mezcla de anticuerpos de la empresa danesa Symphogen A/S. Esta tecnología pretende en primer lugar obtener múltiples anticuerpos contra la misma diana mediante el cribado usando una plataforma de cribado de anticuerpos, luego construir una cepa celular para cada anticuerpo respectivamente, luego mezclar disoluciones iniciales cultivadas en diferentes matraces, y finalmente amplificar gradualmente la reacción y optimizar el procedimiento de purificación para obtener un producto final. Aunque mediante este método, pueden obtenerse múltiples anticuerpos directamente a partir de un procedimiento de producción recombinante cultivando una población mixta de múltiples células, este esquema todavía tiene algunos problemas potenciales debido a dificultades en el control de poblaciones de células mixtas y complejidades relacionadas con la posterior ampliación a escala.

El solicitante de la presente invención inventó un método de producción de una mezcla que comprende dos o más anticuerpos o proteínas de homodímero en una sola célula recombinante mediante la mutación de partes Fc para cambiar las interacciones directas entre fragmentos Fc. Este método evita posibles dificultades en el control del procedimiento y la ampliación a escala producidos por el cultivo celular mixto, y proporciona un enfoque más

económico y efectivo para la preparación y producción de mezclas de anticuerpos. Este esquema también se ha descrito en una solicitud de patente anterior (publicación n.º: CN103388013A).

5 Sin embargo, independientemente de qué método de los descritos anteriormente se use, la falta de coincidencia entre cadenas ligeras y cadenas pesadas puede seguir ocurriendo cuando se utiliza un marco completo de anticuerpos para preparar el anticuerpo biespecífico o mezclas de anticuerpos del mismo, afectando de ese modo a la actividad del anticuerpo. Actualmente, un método relativamente maduro en la técnica es Crossmab desarrollado por Roche (Genentech), es decir, la sustitución de secuencias de cadena ligera y cadena pesada en un Fab para evitar la falta de coincidencia entre esta secuencia de cadenas ligeras con secuencias de cadena ligera o cadena pesada de los otros Fab (solicitudes de patente número US20090162359, US20120164726). Aunque este método puede usarse para resolver la mayoría de problemas de falta de coincidencia de cadena pesada y cadena ligera, pueden surgir nuevos problemas debido a modificaciones en secuencias de cadena pesada y cadena ligera, por ejemplo, disociación de cadenas ligeras, aumento de multímeros y algunas influencias en el reconocimiento de epítomos de antígeno para algunas secuencias Fab.

15 Herceptin (también denominado Trastuzumab), como primer anticuerpo monoclonal terapéutico que muestra efecto clínico en el cáncer de mama, es un anticuerpo monoclonal de receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico anti-humano (HER2), que actúa sobre las proteínas de superficie HER2-Neu de células de cáncer de mama para interferir con un proceso biológico de células de cáncer y finalmente destruir a las células cancerosas. La población adecuada de pacientes para Herceptin es la de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 (inmunohistoquímica 3+ o hibridación fluorescente *in situ* FISH positiva), y este grupo representa aproximadamente el 20-30% de todos los pacientes con cáncer de mama.

25 El pertuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante, que se une al dominio extracelular II del receptor de HER-2 para inhibir la formación de dímeros e inhibir una transducción de señal mediada por receptor (Agus DB, Gordon Ms, Taylor C, *et al.* 2005). Esto puede explicar parcialmente la razón de que el anticuerpo monoclonal Pertuzumab inhiba el crecimiento del tumor de infraexpresión de HER-2, mientras que Trastuzumab se une a una región IV extracelular del receptor de HER-2, y la formación de dímeros no afecta a la región IV. Por tanto, Trastuzumab solo es efectivo para pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión de HER-2. Actualmente, se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase II para el tratamiento del cáncer de mama en estadio terminal con infraexpresión de HER-2 usando Pertuzumab. La investigación de Baselga (Baselga J, *et al.* 2007) *et al.* muestra que la combinación de Pertuzumab y Herceptin (Trastuzumab) tiene actividad antitumoral para pacientes con cáncer de mama HER-2 positivo resistentes al tratamiento. Este resultado muestra que Pertuzumab es eficaz para 1/5 de los pacientes (el tumor está disminuido o desaparecido), y el estado de otro 1/5 de los pacientes se mantuvo estable durante 6 meses o más. Un resultado de un ensayo clínico en fase III para tratar el cáncer de mama con Pertuzumab muestra que este fármaco puede prolongar la supervivencia sin progresión de pacientes con cáncer de mama metastásico ERBB2 positivo.

35 Actualmente, Roche anunció un último resultado de ensayo. El ensayo fue una terapia de fase II sobre el efecto clínico para el tratamiento de pacientes de cáncer de mama en mujeres positivas para el receptor 2 (HER2) de factor de crecimiento epidérmico humano de protooncogén, usando Pertuzumab y Herceptin (Trastuzumab) en combinación con una quimioterapia (docetaxel). Los datos mostrados por el Cancer Therapy & Research Center-American Association for Cancer Research (CTRC-AACR) en San Antonio Breast Cancer Seminar (SABCS) demostraron que la tasa de remisión completa (con una tasa de remisión completa del 45,8% de los casos) del tumor de mama tratado mediante la administración de una combinación de los dos anticuerpos y docetaxel en terapia neoadyuvante preoperatoria se mejora significativamente en más del 50% en comparación con la combinación de Herceptin y docetaxel (tasa de remisión completa del 29,0% de los casos). En comparación con Herceptin y quimioterapia, Pertuzumab y la combinación de Pertuzumab con docetaxel no causarían efectos secundarios o un aumento significativo de riesgos de enfermedades cardíacas.

50 Li B *et al.*, Cancer Research, vol. 73, núm. 21, páginas 6471-6483 (2013) dan a conocer un anticuerpo biespecífico del formato DVD-Ig. Tales anticuerpos biespecíficos anti-ErbB2 comprenden cuatro anticuerpos tetravalentes TP₉, TP_L, PT_s y PT_L.

55 La presente invención toma Pertuzumab y Trastuzumab como ejemplos para preparar un anticuerpo biespecífico novedoso o una parte de unión a antígeno del mismo que tiene las funciones tanto de Pertuzumab como de Trastuzumab, y basándose en esto, desarrolló un nuevo método para preparar un anticuerpo biespecífico o una parte de unión a antígeno del mismo, en el que pueden ensamblarse correctamente cadenas ligeras y cadenas pesadas.

60 Sumario

Los objetos de la presente invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

65 A través de la experimentación repetida, los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendentemente que cadenas ligeras originalmente presentes en dos anticuerpos o mezclas de anticuerpos pueden reemplazarse por una cadena ligera común para obtener un anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo que comprende la cadena ligera común. En el anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo que comprende la cadena

ligera común, las cadenas ligeras y las cadenas pesadas son capaces de ensamblar correctamente. Además, en comparación con los dos anticuerpos originales, el anticuerpo biespecífico tiene buena actividad de unión, actividad biológica y estabilidad, además, el anticuerpo biespecífico tiene mejor actividad biológica que los anticuerpos originales.

5 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico o una parte de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo tiene una cadena ligera común, en el que dicha cadena ligera común se refiere a dos cadenas ligeras que tienen la misma secuencia, en el que dicha cadena ligera común se ensambla con una cadena pesada de Pertuzumab o la parte de unión a antígeno del mismo y una cadena pesada de Trastuzumab o la parte de unión a antígeno del mismo para formar un anticuerpo biespecífico o un Fab respectivamente, en condiciones fisiológicas o durante la expresión de proteína *in vitro*; y en el que la región variable de dicha cadena ligera común comprende una secuencia seleccionada de las indicadas en las posiciones de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6..

15 Las cadenas pesadas del anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo son capaces de ensamblar correctamente con dichas cadenas ligeras, respectivamente, en condiciones fisiológicas o durante la expresión de proteína *in vitro*.

20 La cadena ligera común del anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo se obtiene modificando dos anticuerpos monoclonales originales (anticuerpos monoclonales conocidos), y la secuencia de la cadena ligera común es diferente de la de una cadena ligera de al menos uno de los dos anticuerpos monoclonales originales. La cadena ligera común se obtiene mediante la modificación basándose en los dos anticuerpos monoclonales originales (como la modificación de secuencia de aminoácidos), y el objetivo de la modificación es mantener la afinidad con el antígeno o epítipo de antígeno respectivo tanto como sea posible. Según la invención, la cadena ligera común es capaz de ensamblar con una cadena pesada de Pertuzumab y una cadena pesada de Trastuzumab, respectivamente.

Según la invención, la secuencia de la región variable de la cadena ligera común comprende una secuencia seleccionada de las indicadas en las posiciones de aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6.

30 En una realización, una secuencia de una región constante de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada de las indicadas en las posiciones de aminoácidos 108-214 de SEQ ID NO: 1.

En una realización, regiones variables de cadena pesada de las mismas son una región variable de cadena pesada de Pertuzumab y una región variable de cadena pesada de Trastuzumab, respectivamente.

35 En una realización, las regiones variables de cadena pesada comprenden secuencias tal como se indica en SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente.

40 En una realización, secuencias de fragmentos Fc de la cadena pesada comprenden secuencias tal como se indica en SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, respectivamente.

También se dan a conocer dos cadenas pesadas de las mismas que comprenden una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, respectivamente.

45 Un aspecto adicional de la divulgación es una mezcla de anticuerpos o partes de unión a antígeno del mismo, en el que dichos anticuerpos o partes de unión a antígeno del mismo son capaces de producirse correctamente en una célula. La mezcla comprende al menos dos anticuerpos o parte de unión a antígeno del mismo, y los anticuerpos o parte de unión a antígeno del mismo tienen una cadena ligera común, y la cadena ligera común se refiere a dos regiones variables de cadena ligera que tienen la misma secuencia.

50 En un aspecto, cadenas pesadas del anticuerpo o de la parte de unión a antígeno del mismo son capaces de ensamblar correctamente con las cadenas ligeras, respectivamente, en las condiciones fisiológicas o durante la expresión de proteína *in vitro*.

55 En un aspecto, la cadena ligera común del anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo se obtiene modificando los dos anticuerpos monoclonales originales (anticuerpos monoclonales conocidos), la secuencia de la cadena ligera común es diferente de la de la cadena ligera de al menos uno de los dos anticuerpos monoclonales originales. En una realización, la cadena ligera común es la misma que la cadena ligera de uno de los dos anticuerpos monoclonales originales, o se obtiene mediante modificación (como modificación de aminoácidos) sobre la base de los dos anticuerpos monoclonales originales, el objetivo de la modificación es mantener afinidad con el antígeno o epítipo de antígeno respectivo tanto como sea posible. En una realización, la modificación de aminoácidos comprende mutación, delección o adición de aminoácidos, por ejemplo, mutación, delección o adición de no más de 3 aminoácidos, preferiblemente no más de 2 aminoácidos, más preferiblemente en más de 1 aminoácido.

65 En un aspecto, las cadenas pesadas del anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo se derivan de los dos anticuerpos monoclonales originales, la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o del dominio

CH1 del anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo es la misma que la de los anticuerpos monoclonales originales.

5 En un aspecto, la cadena pesada (que incluye una región variable y una región constante) del anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo puede ser la misma que las cadenas pesadas de los dos anticuerpos monoclonales originales, o puede modificarse para facilitar la formación de la proteína homodímera; la modificación, por ejemplo, es una modificación del fragmento Fc de cadena pesada para facilitar la formación de la proteína homodímera.

10 En un aspecto, los dos anticuerpos monoclonales originales son Pertuzumab y Trastuzumab.

En un aspecto, la cadena ligera común es capaz de ensamblar con una cadena pesada de Pertuzumab y una cadena pesada de Trastuzumab, respectivamente.

15 En un aspecto, la cadena ligera común se selecciona de una cadena ligera de Pertuzumab, una cadena ligera de Trastuzumab o un mutante de la misma.

20 En un aspecto, una secuencia de una región variable de la cadena ligera común comprende una secuencia seleccionada a partir de secuencias tal como se indica en las posiciones de aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, una secuencia de una región constante de la cadena ligera comprende una secuencia seleccionada a partir de las secuencias indicadas en las posiciones de aminoácidos 108-214 de SEQ ID NO: 1.

25 En un aspecto, regiones variables de cadena pesada del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo son una región variable de cadena pesada de Pertuzumab y una región variable de cadena pesada de Trastuzumab, respectivamente.

30 En un aspecto, una secuencia de una región variable de las dos cadenas pesadas comprende una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente.

En un aspecto, secuencias de fragmentos Fc de las cadenas pesadas del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprenden secuencias tal como se indica en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente.

35 En un aspecto, secuencias de las cadenas pesadas del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprenden secuencias tal como se indica en SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, respectivamente.

40 Otro aspecto adicional de la divulgación se refiere a una proteína variante de un dominio extracelular de proteína HER2, en el que, al compararse con una secuencia de un dominio extracelular de proteína HER2 de tipo natural, la proteína variante comprende mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

1) una mutación de ácido glutámico en la posición 558 y una mutación de fenilalanina en la posición 573; y

45 2) una mutación de serina en la posición 288 y una mutación de histidina en la posición 296.

En un aspecto, una mutación a partir de ácido glutámico en la posición 558 a alanina.

En un aspecto, una mutación a partir de fenilalanina en la posición 573 a alanina.

50 En un aspecto, una mutación a partir de serina en la posición 288 a alanina.

En un aspecto, una mutación a partir de histidina en la posición 296 a alanina.

55 En un aspecto, la proteína variante de HER2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos tal como se indica en SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, una secuencia del dominio extracelular de proteína HER2 de tipo natural es la que se indica en SEQ ID NO: 18.

60 Un segundo aspecto de la presente solicitud se refiere a una molécula de ácido nucleico, que codifica el anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera del primer aspecto de la presente solicitud.

Un tercer aspecto de la presente solicitud se refiere a un vector recombinante, que comprende la molécula de ácido nucleico según cualquiera del segundo aspecto de la presente solicitud.

65 Un cuarto aspecto de la presente solicitud se refiere a una célula recombinante, que comprende el vector recombinante

según cualquiera del tercer aspecto o la molécula de ácido nucleico según cualquiera del segundo aspecto de la presente solicitud.

5 Un quinto aspecto de la presente solicitud se refiere a un método para preparar un anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo basándose en dos anticuerpos monoclonales anti-HER2 o partes de unión a antígeno del mismo contra diferentes epítomos de antígeno de HER2, comprendiendo el método la etapa de obtener una secuencia de cadena ligera común capaz de ensamblar con la cadena pesada de Pertuzumab o la parte de unión a antígeno de la misma y la cadena pesada de Trastuzumab o la parte de unión a antígeno de la misma para formar un anticuerpo biespecífico o un Fab respectivamente, basándose en secuencias de cadena ligera de los dos anticuerpos monoclonales anti-HER2, en el que la región variable de dicha cadena ligera común comprende una secuencia seleccionada de las indicadas en las posiciones de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6.

En una realización, el método además comprende las siguientes etapas de:

15 construir vectores de expresión que comprenden la secuencia de cadena ligera común y la secuencia de cadena pesada de los dos anticuerpos monoclonales, respectivamente, para obtener dos vectores de expresión recombinantes; preferiblemente, mutar las secuencias de cadena pesada, especialmente el fragmento Fc, para facilitar la agregación de los fragmentos Fc de los dos anticuerpos monoclonales que tienen diferentes cadenas pesadas; y

20 introducir los dos vectores de expresión recombinante en la misma célula huésped e inducir la expresión para obtener el anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo.

En un aspecto, se obtiene una región variable de la cadena ligera común con los etapas de: en primer lugar, determinar aminoácidos de interfaz en la región variable de cadena ligera de los dos anticuerpos monoclonales que entran en contacto con sus respectivos antígenos o epítomos de antígeno, designar entonces la región variable de cadena ligera de uno de los dos anticuerpos monoclonales como región variable de cadena ligera común candidata, comparar los aminoácidos de interfaz en dicha región variable de cadena ligera común candidata con aquellos en la región variable de cadena ligera del otro de los dos anticuerpos monoclonales al entrar en contacto con el antígeno o epítomos de antígeno dirigido por dicho uno de los dos anticuerpos monoclonales, identificar aminoácidos de interfaz diferencial, y seleccionar una región variable de cadena ligera que comprende un número menor de aminoácidos de interfaz diferencial como región variable de cadena ligera común; preferiblemente, mutar además la región variable de cadena ligera común para obtener una región variable de cadena ligera que tiene una mejor afinidad para el antígeno o epítomo de antígeno correspondiente. En una realización, un método para obtener una región constante de la cadena ligera común comprende las etapas de: designar la región constante de cadena ligera del anticuerpo monoclonal que proporciona una región variable de la cadena ligera común como una región constante de cadena ligera común, o mutar además la región constante de cadena ligera para obtener una región constante de la cadena ligera común.

En un aspecto, la mutación se refiere a modificaciones de los aminoácidos de interfaz.

40 En un aspecto, una mejor afinidad con el antígeno o epítomo de antígeno significa que la afinidad entre la cadena ligera común y los dos antígenos o epítomos de antígeno dirigidos por el anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo están equilibradas de manera que el anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo tiene una actividad biológica y propiedades fisicoquímicas mejores (como estabilidad).

45 Otro aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para preparar una mezcla que comprende al menos dos anticuerpos monoclonales o partes de unión a antígeno del mismo, que comprende las siguientes etapas de:

50 obtener una secuencia de cadena ligera común capaz de ensamblar, respectivamente, con cadenas pesadas de dos anticuerpos monoclonales basándose respectivamente en secuencias de cadena ligera de los dos anticuerpos monoclonales, en el que la cadena ligera común hace referencia a que las dos cadenas ligeras tienen la misma secuencia, preferiblemente, la cadena ligera común es una cadena ligera de uno de dichos dos anticuerpos monoclonales o un mutante de una cadena ligera de uno de dichos dos anticuerpos monoclonales.

En un aspecto, el método comprende además las siguientes etapas de:

55 construir vectores de expresión que comprenden la secuencia de cadena ligera común y la secuencia de cadena pesada de los dos anticuerpos monoclonales, respectivamente, para obtener dos vectores de expresión recombinantes; preferiblemente, mutar las secuencias de cadena pesada, especialmente el fragmento Fc, para facilitar la agregación de los fragmentos Fc de los anticuerpos monoclonales que tienen las mismas cadenas pesadas; e

60 introducir los dos vectores de expresión recombinante en una célula huésped, e inducir la expresión para obtener una mezcla de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos.

65 En un aspecto, se obtiene un método para obtener una región variable de la cadena ligera común con las etapas de: en primer lugar, determinar aminoácidos de interfaz en la región variable de cadena ligera de los dos anticuerpos monoclonales que entran en contacto con sus respectivos antígenos o epítomos de antígeno, designar entonces la

región variable de cadena ligera de uno de los dos anticuerpos monoclonales como región variable de cadena ligera común candidata, comparar los aminoácidos de interfaz en dicha región variable de cadena ligera común candidata con aquellos en la región variable de cadena ligera del otro de los dos anticuerpos monoclonales al entrar en contacto con el antígeno o epítomos de antígeno dirigidos por dicho uno de los dos anticuerpos monoclonales, identificar aminoácidos de interfaz diferencial, y seleccionar una región variable de cadena ligera que comprende un número menor de aminoácidos de interfaz diferencial como región variable de cadena ligera común; preferiblemente, mutar además la región variable de cadena ligera común para obtener una región variable de cadena ligera que tiene una mejor afinidad con el antígeno o epítomo de antígeno correspondiente. En una realización, un método para obtener una región constante de la cadena ligera común comprende las etapas de: designar una región constante de cadena ligera del anticuerpo monoclonal que proporciona una región variable de la cadena ligera común como una región constante de cadena ligera común, o mutar además la región constante de cadena ligera para obtener una región constante de la cadena ligera común.

En un aspecto, la mutación se refiere a una mutación de los aminoácidos de interfaz.

En un aspecto, una mejor afinidad con el antígeno o epítomo de antígeno significa que la afinidad entre la cadena ligera común y dos antígenos o epítomos de antígeno dirigidos por los dos anticuerpos monoclonales de la mezcla están equilibradas de manera que la mezcla tiene actividad biológica y propiedades fisicoquímicas mejores (como la estabilidad).

La presente solicitud también da a conocer un método para determinar si un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo o no, y/o un método para cuantificar el mismo, que comprende las siguientes etapas de (véase el diagrama en la figura 25):

1) preparar un primer antígeno específico y un segundo antígeno específico respectivamente, en el que dicho antígeno específico es capaz de unirse a una primera parte de unión a antígeno pero no a una segunda parte de unión a antígeno en un anticuerpo biespecífico o una parte de unión a antígeno del mismo, y dicho segundo antígeno específico es capaz de unirse a dicha segunda parte de unión a antígeno pero no a dicha primera parte de unión a antígeno;

2) recubrir una placa ELISA con el primer antígeno específico (o el segundo antígeno específico), añadir un anticuerpo que va a someterse a prueba, después de un período de reacción, añadir el segundo antígeno específico que comprende una etiqueta (o el primer antígeno específico que comprende una etiqueta), después de un período de reacción, añadir una molécula de detección capaz de unirse a la etiqueta, después de un período de reacción, y obtener resultados según el principio de detección, determinando de ese modo la reacción como positiva o negativa, en el que la molécula de detección comprende una etiqueta detectable; y

3) cuando la reacción es positiva y el resultado es dependiente de la concentración, se determina que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo; opcionalmente, cuantificar además el anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según el resultado positivo obtenido.

En la presente divulgación, la primera parte de unión a antígeno y la segunda parte de unión a antígeno, respectivamente, se refieren a dos partes de un anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo que se ensamblan con diferentes antígenos o epítomos de antígeno; en una realización, la primera parte de unión a antígeno y la segunda parte de unión a antígeno se obtienen respectivamente mediante la modificación sobre la base de los dos anticuerpos originales, y los antígenos o epítomos de antígeno dirigidos por la primera parte de unión a antígeno y la segunda parte de unión a antígeno son los mismos que los dirigidos por los dos anticuerpos originales, respectivamente.

En un aspecto, el primer antígeno y el segundo antígeno son HERm1 y HERm2.

En un aspecto, el antígeno específico etiquetado es un antígeno específico etiquetado con biotina.

En un aspecto, la molécula de detección es una molécula de sustrato usada para la detección, como la estreptavidina etiquetada con HRP.

La presente solicitud también da a conocer un método para determinar si una mezcla de anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos comprende una proteína homodímera o no, la mezcla comprende dos anticuerpos (un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo) o partes de unión a antígeno de los mismos o no, y el método comprende las siguientes etapas de (véase el diagrama en la figura 26):

1) preparar un primer antígeno específico y un segundo antígeno específico respectivamente, en el que dicho antígeno específico es capaz de unirse al primer anticuerpo pero no al segundo anticuerpo, y dicho segundo antígeno específico es capaz de unirse al segundo anticuerpo, pero no al primer anticuerpo;

- 2) recubrir una placa ELISA con el primer antígeno específico (o el segundo antígeno específico), añadir la mezcla que va a someterse a prueba, después de un período de reacción, añadir el primer antígeno específico que comprende una etiqueta (o el segundo antígeno específico que comprende una etiqueta), después de un período de reacción, añadir una molécula de detección capaz de unirse a la etiqueta, después de un período de reacción, y obtener resultados según el principio de detección, determinando de ese modo la reacción como positiva o negativa, en el que la molécula de detección comprende una etiqueta detectable;
- 3) por separado, recubrir una placa ELISA con el primer antígeno específico (o el segundo antígeno específico), añadir la mezcla que va a someterse a prueba, después de un período de reacción, añadir el segundo antígeno específico que comprende una etiqueta (o el primer antígeno específico que comprende una etiqueta), después de un período de reacción, añadir una molécula de detección capaz de unirse a la etiqueta, después de un período de reacción, y obtener resultados según el principio de detección, determinando de ese modo la reacción como positiva o negativa, en el que la molécula de detección comprende una etiqueta detectable;
- 4) cuando la reacción en la etapa 2) es positiva y es dependiente de la concentración y la reacción en la etapa 3) es negativa, se determina que la mezcla comprende una proteína homodímera y que no comprende ninguna proteína heterodímera; cuando la reacción en la etapa 2) es positiva y la reacción en la etapa 3) es positiva, se determina que la mezcla comprende tanto proteína homodímera como proteína heterodímera.
- En un aspecto, el primer antígeno específico y el segundo antígeno específico son HERm1 y HERm2.
- En un aspecto, el antígeno específico etiquetado es un antígeno etiquetado con biotina.
- En un aspecto, la molécula de detección es una molécula de sustrato usada para la detección, como la estreptavidina etiquetada con HRP.
- La presente solicitud también se refiere a una composición (tal como una composición farmacéutica), que comprende el anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera del primer aspecto de la presente solicitud, y opcionalmente portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- La presente solicitud también da a conocer una composición (como la composición farmacéutica, que comprende una mezcla según cualquiera del segundo aspecto de la presente solicitud, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable opcional.
- La presente solicitud también da a conocer un kit, que comprende el anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera de los primeros aspectos de la presente solicitud, y opcionalmente un tampón y/o una instrucción.
- En un aspecto, el kit se usa para diagnosticar tumor positivo HER2 (como cáncer de mama y cáncer gástrico).
- La presente solicitud también da a conocer un kit, que comprende una mezcla según cualquiera del segundo aspecto de la presente solicitud, y opcionalmente un tampón y/o una instrucción.
- En un aspecto, el kit se usa para diagnosticar tumor positivo HER2 (como cáncer de mama y cáncer gástrico).
- La presente solicitud además da a conocer el uso del anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera del primer aspecto de la presente solicitud en la preparación de un reactivo o un kit para el diagnóstico de tumor positivo HER2 (como cáncer de mama y cáncer gástrico).
- La presente solicitud también da a conocer el uso de la mezcla según cualquiera del segundo aspecto de la presente solicitud en la preparación de un reactivo o un kit para el diagnóstico de tumor positivo HER2 (como cáncer de mama y cáncer gástrico).
- La presente solicitud también da a conocer el uso de una proteína variante de dominio extracelular de proteína HER2 en la detección del anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera del primer aspecto o en la detección de la mezcla según el aspecto dado a conocer adicional de la presente solicitud.
- La presente solicitud también da a conocer un método para diagnosticar tumor positivo HER2 (como cáncer de mama y cáncer gástrico), que comprende una etapa de uso del anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera del primer aspecto de la presente solicitud.
- La presente solicitud también da a conocer un método para diagnosticar tumor positivo HER2 (como cáncer de mama y cáncer gástrico), que comprende una etapa de usar una mezcla según cualquiera del segundo aspecto de la presente solicitud.
- La presente solicitud también da a conocer un método para detectar el anticuerpo biespecífico o parte de unión a

antígeno del mismo según cualquiera del primer aspecto de la presente solicitud o detectar la mezcla según el aspecto dado a conocer adicional de la presente solicitud, que comprende una etapa de uso de la proteína variante del dominio extracelular de proteína HER2 según el otro aspecto dado a conocer de la presente solicitud.

5 La presente invención también se refiere al anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera del primer aspecto de la presente invención para su uso en la prevención y/o tratamiento de tumor positivo HER2 (como cáncer de mama y cáncer gástrico).

10 La presente solicitud también da a conocer la mezcla según la presente divulgación para prevenir y/o tratar el tumor positivo HER2 (como cáncer de mama y cáncer gástrico).

Las invenciones de la presente solicitud se describirán adicionalmente a continuación.

15 En la presente solicitud, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que consiste en dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas (cada par tiene una cadena "ligera" (L) y una cadena "pesada" (H)). Una cadena ligera de un anticuerpo puede ser una cadena ligera κ o una cadena ligera λ . Una cadena pesada puede ser una cadena pesada μ , δ , γ , α o ϵ , y el isotipo de anticuerpo se define correspondientemente como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Dentro de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, regiones variables y regiones constantes están conectadas a través de regiones "J" que consisten en aproximadamente 12 o más aminoácidos, las cadenas pesadas también comprenden regiones "D" que consisten en aproximadamente 3 o más aminoácidos. Cada cadena pesada consiste en una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada consiste en 3 dominios (CH1, CH2 y CH3). Cada cadena ligera consiste en una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). La región constante de cadena ligera consiste en un dominio CL. Las regiones constantes del anticuerpo pueden mediar la unión de una inmunoglobulina con una célula huésped o un factor, que incluye la unión de diversas células (como células efectoras) del sistema inmunitario con un primer componente (C1q) de un sistema de complemento clásico. Las regiones VH y VL también pueden subdividirse en regiones altamente variables (denominadas regiones determinantes complementarias (CDR)), y entre las CDR se distribuyen regiones conservadoras conocidas como regiones de entramado (FR). Cada VH y cada VL consiste en 3 CDR y 4 FR dispuestos desde terminales amino a terminales carboxilo en una secuencia de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables (VH y VL) de cada par de cadena pesada/cadena ligera forman, respectivamente, partes de unión a anticuerpo. La distribución de aminoácidos en diversas regiones o dominios sigue la definición en Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, o Chothia *et al* (1989) Nature 342:878-883. El término "anticuerpo" no está limitado por ningún método de producción específico de un anticuerpo. Por ejemplo, comprende, en particular, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos de diversos isotipos, por ejemplo, anticuerpo IgG (como subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM.

40 En la presente solicitud, el término "parte de unión a antígeno" del anticuerpo se refiere a una o más partes de un anticuerpo de longitud completa, la parte de unión a antígeno mantiene la capacidad de unión a un antígeno (como HER2) que es el mismo que el unido por el anticuerpo, y compite con el anticuerpo de longitud completa para la unión específica a un antígeno. Se hace referencia general a Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., edición II, Raven Press, N.Y. (1989)). La parte de unión a antígeno puede producirse usando una tecnología de ADN recombinante o por rotura enzimática o química de un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos, la parte de unión a antígeno comprende un polipéptido como un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un Fv, un dAb, un fragmento de región determinante complementaria (CDR), un anticuerpo de cadena única (como un scFv), un anticuerpo quimérico y un diacuerpo, y comprende al menos la parte del anticuerpo que dota suficientemente al polipéptido de la capacidad de unión a antígeno específica. La parte de unión a antígeno (como el fragmento de anticuerpo anterior) del anticuerpo puede obtenerse a partir de un anticuerpo dado (como el anticuerpo monoclonal 2E12) usando una tecnología convencional (como la tecnología de ADN recombinante o el procedimiento de rotura enzimática o química) conocida por los expertos en la técnica, y se criban por su especificidad en un procedimiento que es el mismo para el cribado de anticuerpos de longitud completa.

55 En la presente solicitud, el término "fragmento Fd" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en dominios V_H y C_H1; el término "fragmento Fv" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; el término "fragmento de dAb" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio V_H (Ward *et al*, Nature 341:544 -546 (1989)); el término "fragmento Fab" se refiere a un anticuerpo que consiste en dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; y el término "fragmento F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende dos fragmentos Fab conectados a través de un puente de disulfuro en una región de bisagra.

60 En la presente solicitud, el término "fragmento de anticuerpo Fc" es un término conocido por los expertos en la técnica y se define basándose en proteólisis de un anticuerpo por papaína, y se refiere a una región constante de cadena de inmunoglobulina humana, especialmente un terminal carboxilo de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o una parte de la misma. Por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina puede comprender combinaciones de dos o más dominios seleccionados de cadena pesada CH2, CH3 y CH4 con una región de bisagra de inmunoglobulina. Basándose en secuencias de aminoácidos de la región constante de cadena pesada, pueden

dividirse inmunoglobulinas en diferentes tipos, principalmente los cinco tipos siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, algunos de los cuales pueden dividirse además en subtipos (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1 e IgA-2. La selección de regiones Fc de inmunoglobulina específicas a partir de tipos y subtipos específicos de la inmunoglobulina está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

5 En una realización, el fragmento Fc de anticuerpo usado en la presente solicitud comprende al menos una región de bisagra de inmunoglobulina, un dominio CH2 y un dominio CH3, por ejemplo, un Fc de IgG1 humano.

10 En la presente solicitud, el término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que, respectivamente, puede unirse con dos antígenos o epítomos de antígeno, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un primer antígeno o epítomo de antígeno, y una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un segundo antígeno o epítomo de antígeno. En una realización, en el anticuerpo biespecífico, la cadena ligera de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un primer antígeno o epítomo de antígeno y la cadena ligera de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un segundo antígeno o epítomo de antígeno tienen las mismas secuencias. En una realización, en el anticuerpo biespecífico, la cadena pesada de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un primer antígeno o epítomo de antígeno y la cadena pesada de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un segundo antígeno o epítomo de antígeno tienen diferentes secuencias.

20 En la presente solicitud, el término "epítomo" o "epítomo de antígeno" se refiere a una parte en un antígeno unido específicamente por una inmunoglobulina o un anticuerpo. "Epítomo" también se conoce como "determinante antigénico". El "epítomo" o "determinante antigénico" a menudo consiste en grupos de superficie reactiva químicos de una molécula, tales como cadenas laterales de glucosilo, carbohidratos o aminoácidos, y a menudo tiene características de estructura tridimensional específicas y características de carga específicas. Por ejemplo, el epítomo, que puede ser "lineal" o "conformacional", a menudo comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos continuos o no continuos en una conformación espacial única. Véase la referencia, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, volumen 66, G. E. Morris, Ed. (1996). En un epítomo lineal, todos los sitios de interacción entre una proteína y una molécula con la que interactúa (como un anticuerpo) se disponen linealmente a lo largo de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína. En un epítomo conformacional, los sitios de interacción se disponen a través de la proteína en sitios discretos separados entre sí.

35 En la presente solicitud, 20 aminoácidos convencionales y sus abreviaturas cumplen con las normas convencionales. Puede hacerse referencia a, Immunology - A Synthesis (Edición II, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). En la presente solicitud, se analizan y verifican secuencias de cadena ligera (especialmente secuencias de región variable) de dos anticuerpos monoclonales (anticuerpos originales en concreto) contra diferentes antígenos o epítomos de antígeno para obtener una cadena ligera común capaz de ensamblar con las cadenas pesadas de los dos anticuerpos monoclonales. Después de ensamblar con las cadenas pesadas, la cadena ligera común todavía puede unirse específicamente a los antígenos o epítomos de antígeno dirigidos por los anticuerpos monoclonales originales.

40 En la presente solicitud, la cadena ligera común puede usarse para expresar el anticuerpo biespecífico, y también puede usarse para expresar una mezcla que comprende dos anticuerpos; cuando se expresa el anticuerpo biespecífico, el anticuerpo comprende una cadena ligera y una cadena pesada que son capaces de unirse a un primer antígeno, y una cadena ligera y una cadena pesada que son capaces de unirse a un segundo antígeno, en el que las secuencias de las dos cadenas ligeras son completamente las mismas, en concreto, es una cadena ligera común; y cuando se expresa la mezcla de anticuerpos, cada anticuerpo comprende respectivamente, dos cadenas ligeras y cadenas pesadas, en el que las secuencias de las cadenas ligeras son completamente las mismas, en concreto, es la cadena ligera común.

50 En la presente solicitud, las regiones constantes de cadena ligera de los dos anticuerpos originales pueden ser de tipo κ o de tipo λ ; la región constante de cadena ligera de tipo κ comprende diversos alotipos, como Km1, Km2 y Km3; la región constante de cadena ligera de tipo λ comprende diversos alotipos, como CL1, CL2, CL3, CL6 y CL7.

55 Se sabe en la técnica que la región variable es crucial para la unión específica entre el antígeno y el anticuerpo, por tanto, durante el procedimiento de modificación u obtención de un anticuerpo, la selección y modificación de las secuencias de región variable son críticas. Por tanto, en la presente solicitud, para obtener el anticuerpo biespecífico o la mezcla de anticuerpos que tiene la cadena ligera común, es necesario obtener primero las regiones variables de la cadena ligera común. Después de seleccionar la región variable de cadena ligera de un anticuerpo monoclonal original o un mutante del mismo como la región variable de la cadena ligera común según el método comentado anteriormente, se determina la región constante de la cadena ligera común. Normalmente, se determina que la región constante de cadena ligera común es la región constante de cadena ligera del anticuerpo monoclonal del que se deriva la región variable de cadena ligera común. En algunos casos, la región constante de cadena ligera del otro anticuerpo monoclonal puede determinarse que es la región constante de cadena ligera común. Cuando sea necesario, puede modificarse la región constante de cadena ligera original (por ejemplo, por adición, delección o mutación de aminoácidos, etc.) basándose en conocimientos conocidos en la técnica para obtener una región constante más adecuada de la cadena ligera común, por ejemplo, después de la modificación, la región constante de cadena ligera

común tiene un mejor ADCC, CDC, endocitosis, estabilidad, inmunogenicidad o semivida, etc.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, el tipo de cadena pesada de los dos anticuerpos originales puede ser el mismo o diferente, preferiblemente, las cadenas pesadas son del mismo tipo. En una realización, al preparar el anticuerpo biespecífico y la mezcla de anticuerpos, las secuencias de la región variable y el dominio CH1 de la cadena pesada no se modifican en comparación con la de los anticuerpos originales.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, dos brazos del anticuerpo biespecífico o los anticuerpos de la mezcla que contiene dos anticuerpos se derivan ambos de dos anticuerpos monoclonales originales. Al preparar el anticuerpo biespecífico o la mezcla de anticuerpos, solo se cambiarían secuencias de la región variable de cadena ligera para obtener la cadena ligera común, mientras que las secuencias de la región variable de cadena pesada no necesitan cambiarse. En otras palabras, en el anticuerpo biespecífico o en la mezcla de anticuerpos preparada, secuencias de las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo pueden ser las mismas que las del anticuerpo original, pero las secuencias de al menos una región variable de cadena ligera serán diferentes de las del anticuerpo original.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, los dos anticuerpos monoclonales originales pueden seleccionarse según diferentes demandas u objetivos, por ejemplo, los dos anticuerpos monoclonales seleccionados pueden ser contra diferentes epítopos de antígeno del mismo antígeno; alternatively, uno de los anticuerpos seleccionados puede unirse a un antígeno relacionado en la superficie de una célula tumoral, mientras que el otro anticuerpo puede desencadenar una célula efectora inmunológica para además destruir a una célula.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, al preparar el anticuerpo biespecífico, la cadena pesada (como un fragmento Fc) puede modificarse basándose en tecnologías conocidas en la técnica para facilitar la formación de la proteína heterodímera durante la expresión de anticuerpos.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, al preparar la mezcla de anticuerpos, la cadena pesada (como un fragmento Fc), puede modificarse basándose en tecnologías conocidas en la técnica para facilitar la formación de la proteína homodímera durante la expresión de anticuerpos.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer, pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, tecnologías para modificar un fragmento Fc de la cadena pesada de anticuerpo para facilitar la formación de la proteína homodímera o de la proteína heterodímera se conocen en la técnica, por ejemplo, puede hacerse referencia a, Ridgway, Presta *et al.* 1996, Carter 2001, patente CN 102558355A y patente CN 103388013A.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, las tecnologías de fusión de polipéptidos que reconocen diferentes epítopos de antígeno incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, una tecnología de fusión de Fc heterodímera como se muestra en los ejemplos, también puede ser una tecnología "Fab", véase la figura 1.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer, pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, la tecnología de fusión de Fc heterodímera usada en la presente solicitud puede basarse en un modelo de "botón" y "agujero", y también puede basarse en un "modelo de repulsión de carga", pero no se limita a estos dos modelos.

En la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer, pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, la plataforma capaz de producir y preparar mezclas de anticuerpos en una sola célula recombinante como se usa en la presente solicitud puede basarse en el modelo de "repulsión de carga", pero no se limita a este modelo.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer, pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, al preparar el anticuerpo biespecífico o la mezcla de anticuerpos, la molécula de ácido nucleico codifica una cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo contra un primer antígeno, o codifica una cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo contra un segundo antígeno. En algunas realizaciones de la presente solicitud, la cadena ligera es la cadena ligera común; en algunas realizaciones de la presente solicitud, se modifica el fragmento Fc de la cadena pesada.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, el vector puede ser un vector de clonación o un vector de expresión. El vector de clonación se usa para clonar un fragmento relacionado de un anticuerpo; el vector de expresión se usa para expresar un anticuerpo biespecífico o una mezcla de anticuerpos. Un vector adecuado para la expresión de

anticuerpos puede seleccionarse según el conocimiento común en la técnica. En algunas realizaciones de la presente solicitud, el vector de expresión es pcDNA4m, que se obtiene modificando el vector pcDNA4/myc-HisA.

5 En algunas realizaciones de la presente solicitud, el vector de expresión comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera y/o cadena pesada del anticuerpo contra el primer antígeno, o una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera y/o cadena pesada del anticuerpo contra el segundo antígeno.

10 En algunas realizaciones de la presente solicitud, la célula huésped es una célula huésped adecuada para la expresión del anticuerpo, por ejemplo, una célula procariótica (como *E. Coli*) o una célula eucariótica; la célula eucariótica, por ejemplo, es una célula de levadura, una célula vegetal o una célula de mamífero, y la célula de mamífero, por ejemplo, es una célula CHO, una célula HEK293 o una célula de mieloma, etc.

15 En algunas realizaciones de la presente solicitud, especialmente en lo que respecta a aspectos adicionales dados a conocer pero no necesariamente aplicables a las realizaciones de la invención, la célula huésped comprende simultáneamente un vector de expresión que es capaz de expresar la cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo contra el primer antígeno y un vector de expresión que es capaz de expresar la cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo contra el segundo antígeno; en algunas realizaciones de la presente invención, la cadena ligera es la cadena ligera común; en algunas realizaciones de la presente solicitud, se modifica el fragmento Fc de la cadena pesada. Cuando la célula huésped se usa para expresar un anticuerpo biespecífico, mediante una modificación del fragmento Fc, las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de anticuerpos contra diferentes antígenos son más fáciles de ensamblar para formar el anticuerpo biespecífico; cuando la célula huésped se usa para expresar una mezcla de anticuerpos, mediante una modificación del fragmento Fc, las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de anticuerpos contra el mismo antígeno son más fáciles de ensamblar para formar la mezcla de anticuerpos.

25 El anticuerpo biespecífico o la mezcla de anticuerpos puede purificarse a partir de la célula huésped usando enfoques experimentales estándar. Los métodos de purificación incluyen, pero no se limitan a, una técnica cromatográfica como la exclusión de volumen, el intercambio iónico, la cromatografía de afinidad y la ultrafiltración. En algunas realizaciones de la presente solicitud, un anticuerpo biespecífico y una mezcla de anticuerpos se purifican con cromatografía de afinidad con proteína A.

30 En la presente solicitud, el anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo o la mezcla de los mismos también puede administrarse de manera conjunta con un fármaco quimioterapéutico y/u otros anticuerpos, por tanto una composición de la presente invención o una composición dada a conocer en esta solicitud de patente también puede incluir un fármaco quimioterapéutico y/u otros anticuerpos.

35 En la presente solicitud, el fármaco quimioterapéutico incluye, pero no se limita a, Adriamicina, ciclofosfamida y taxano [Taxol y Taxotere], Xeloda, Gemzar, Navelbine, Tamoxifeno, inhibidores de aromatasas (Arimidex, Felon y Arnoux), 5-FU y ácido folínico, Camptosar, Oxaliplatino, cis-platino, Paraplatino, Estramustina, Novantrona, Metacortandracina, Oncovin, etc., o una combinación de los mismos.

40 Se da a conocer además que, mutando una proteína HER2, se obtiene un mutante de proteína HER2 capaz de unirse solo específicamente a uno de Pertuzumab y Herceptin. En algunas realizaciones de la presente solicitud, el mutante de proteína HER2 se usa para identificar el anticuerpo biespecífico y la mezcla de anticuerpos.

45 Se da a conocer además que, el ELISA tipo sándwich de doble antígeno (también conocido como ELISA de tipo puente) se usa en combinación con el mutante de proteína HER2 para determinar si el anticuerpo es o no un anticuerpo biespecífico, o si la mezcla de anticuerpos comprende o no una proteína homodímera, además, para cuantificar el anticuerpo biespecífico o proteínas homodímeras en la mezcla de anticuerpos.

50 Se da a conocer además que, el método ELISA tipo sándwich de doble antígeno se conoce en la técnica, y su principio es que un antígeno unido a un soporte sólido y un antígeno etiquetado con enzima se usan para unirse respectivamente a los dos sitios de unión de antígeno de una molécula de anticuerpos candidata en una muestra, formando un complejo inmune de antígeno etiquetado con enzima-anticuerpo-antígeno de fase sólida. Las etapas de detección de este método, por ejemplo, comprenden: (1) recubrir un soporte sólido con un antígeno específico, incubar durante un período de tiempo para formar un antígeno de soporte sólido, lavar y retirar el antígeno y las impurezas no unidas; (2) añadir una muestra e incubar los anticuerpos en la muestra y el antígeno sobre el soporte sólido para interactuar suficientemente como para formar un complejo de antígeno-anticuerpo de soporte sólido, y lavar y retirar otras sustancias no unidas; (3) añadir un antígeno etiquetado con enzima, incubar para formar un complejo de tipo sándwich de antígeno etiquetado con enzima-anticuerpo candidato-antígeno de soporte sólido, y lavar y retirar cualquier antígeno etiquetado con enzima no unido; (4) añadir un sustrato para el desarrollo de color. Las enzimas sobre el soporte sólido catalizarán el sustrato para producir un producto coloreado, y la cantidad de anticuerpos en la muestra puede medirse con colorimetría.

65 En la presente solicitud, un tumor positivo HER2 comprende un tumor de proteína HER2 sobreexpresado (como cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de colon y neoplasia de cabeza y cuello), y también comprende un tumor infraexpresado de proteína

HER2 (como cáncer de mama infraexpresado HER2 y cáncer de pulmón).

En la presente solicitud, puede obtenerse una cadena ligera común capaz de ensamblarse, respectivamente, con cadenas pesadas de dos anticuerpos diferentes mediante el análisis de secuencias de las cadenas ligeras de los dos anticuerpos, y por consiguiente se preparan un anticuerpo biespecífico y una mezcla de anticuerpos que tienen la cadena ligera común. Los resultados experimentales demostraron que el anticuerpo biespecífico y la mezcla de anticuerpos preparada mediante el método tienen buena actividad de unión, actividad biológica y estabilidad, y tienen mejor actividad biológica que el anticuerpo original.

La tecnología de cadena ligera común es simple y controlable, y resuelve de manera efectiva el problema de la falta de coincidencia entre cadenas pesadas y cadenas ligeras de anticuerpos biespecíficos, mientras que la estabilidad, actividad y pureza de los anticuerpos biespecíficos no se ven afectadas. Para mezclas de anticuerpos, la tecnología de cadena ligera común permite que los anticuerpos se expresen en la misma célula huésped, lo que evita las dificultades del cultivo mixto de población celular y facilita la producción a gran escala.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático de fusión de proteínas heterodímeras. El panel a ilustra una tecnología de fusión de Fc heterodímera, y el panel b ilustra una tecnología "Fab".

La figura 2 ilustra el reconocimiento de regiones hipervariables de cadena ligera de Pertuzumab y Trastuzumab, donde A demuestra el resultado de reconocimiento de una región hipervariable de cadena ligera de Pertuzumab, B demuestra el resultado de reconocimiento de una región hipervariable de cadena ligera de Trastuzumab, y C demuestra un resultado de comparación de cadenas ligeras de Pertuzumab y Trastuzumab y muestra un resultado de análisis exhaustivo del aminoácido de interfaz de antígeno.

La figura 3 es un diagrama estructural de un fragmento Fab de Trastuzumab y un dominio extracelular de HER2 (ECD).

La figura 4 ilustra un resultado de análisis electroforético SDS-PAGE de proteínas variantes Her2m1 y Her2m2 (condición no reducida del 18% de SDS-PAGE).

1: HER2m1; 2: HER2m2; M: proteína de MW estándar.

La figura 5 ilustra la detección de unión específica de una proteína variante de HER2 con Trastuzumab o Pertuzumab usando ELISA.

La figura 6 es un resultado reducido de SDS-PAGE (condición reducida de SDS-PAGE al 12%) que muestra la detección primaria de una muestra de proteína de anticuerpo monoclonal de cadena ligera común obtenida mediante purificación por cromatografía de afinidad en una etapa.

1-6: TmabCLC1-6; 7-12: PmabCLC1-6; M: proteína de MW estándar.

La figura 7 ilustra la afinidad de Trastuzumab que comprende la cadena ligera común con respecto a su antígeno específico HER2m1.

La figura 8 ilustra la afinidad de Pertuzumab que comprende una cadena ligera común con respecto a su antígeno específico HER2m2.

La figura 9 es un resultado de SDS-PAGE (condición reducida de SDS-PAGE al 12%) que muestra la detección primaria de una muestra de proteína de anticuerpo KN026 obtenida mediante purificación por cromatografía de afinidad en una etapa.

1: sobrenadante de cultivo celular de expresión transitoria KN026; 2: flujo continuo por cromatografía de afinidad de KN026; 3: muestra de proteína purificada (reducción) después de cromatografía de afinidad en una etapa de KN026; 4: muestra de proteína purificada (no reducida) después de la cromatografía de afinidad en una etapa de KN026; M: proteína de MW estándar.

La figura 10 ilustra un resultado de detección de SE-HPLC de la pureza de proteína de anticuerpo KN026.

La figura 11 ilustra curvas de afinidad que muestran el reconocimiento de dos antígenos por anticuerpo biespecífico KN026.

La figura 12 es un resultado de SDS-PAGE (condición reducida de SDS-PAGE al 12%) que muestra la detección primaria de una muestra de proteína de anticuerpo KN010 obtenida por purificación por cromatografía de afinidad en una etapa.

La figura 13 ilustra un resultado de detección de SE-HPLC de proteína de anticuerpo mixta KN026.

La figura 14 ilustra curvas de afinidad que muestran el reconocimiento de dos antígenos por la proteína de anticuerpo mixta KN026.

5 La figura 15 ilustra curvas dependientes de la concentración de unión de anticuerpo biespecífico de Ptmb (KN026), Pertuzumab y Trastuzumab con células BT474.

10 La figura 16 ilustra curvas dependientes de la concentración de unión de anticuerpo biespecífico de Ptmb (KN026), Pertuzumab y Trastuzumab con células N-87.

La figura 17 ilustra curvas dependientes de la concentración de unión de la mezcla de anticuerpos de Ptmb y Tmb (KN010), Pertuzumab y Trastuzumab con células BT474.

15 La figura 18 ilustra los efectos de inhibición de KN026, Trastuzumab y la combinación de fármacos de Trastuzumab+Pertuzumab sobre la proliferación de células BT474 de cáncer de mama humano.

20 La figura 19 ilustra los efectos de inhibición de KN026, Trastuzumab y la combinación de fármacos de Trastuzumab+Pertuzumab sobre la proliferación de células N-87 de cáncer gástrico humano.

La figura 20 ilustra los resultados de pruebas de estabilidad térmica (valores de Tm) de un anticuerpo biespecífico de Ptmb KN026 (curva clara) y una muestra de referencia de Trastuzumab (curva oscura).

25 La figura 21 ilustra las curvas farmacocinéticas de KN026 y Trastuzumab.

La figura 22 ilustra la influencia de un anticuerpo biespecífico de Ptmb sobre el tamaño tumoral de un xenoinjerto de ratón atímico SKOV3 con cáncer de ovario humano.

30 La figura 23 ilustra la influencia de un anticuerpo biespecífico de Ptmb sobre el tamaño tumoral de un xenoinjerto de ratón atímico N-87 con cáncer gástrico humano.

La figura 24 ilustra la influencia de un anticuerpo biespecífico de PTmb sobre el tamaño tumoral de un xenoinjerto de ratón atímico N-87 con cáncer gástrico humano.

35 La figura 25 es un diagrama esquemático de un método para determinar si un anticuerpo es o no un anticuerpo biespecífico y un diagrama de un método de cuantificación.

La figura 26 es un diagrama esquemático de un método para determinar si una mezcla de anticuerpos comprende o no una proteína homodímera.

40 La figura 27 ilustra la dependencia de dosificación de un anticuerpo biespecífico de PTmb en un modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H522 con cáncer de pulmón de células no pequeñas humano infraexpresado HER2.

45 La figura 28 ilustra que el efecto farmacéutico de un anticuerpo biespecífico de PTmb en un modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H522 con cáncer de pulmón de células no pequeñas humano infraexpresado HER2 es comparable al de la administración de igual cantidad molar de la muestra estándar de Trastuzumab junto con una igual cantidad molar de Pertuzumab.

Descripción detallada

50 Las realizaciones de la invención y aspectos adicionales dados a conocer en la presente solicitud se describirán en detalle a la luz de los ejemplos, pero los expertos en la técnica entenderán que los ejemplos siguientes son solo para ilustrar la presente solicitud. Cuando no se indican condiciones específicas, los experimentos se llevan a cabo normalmente de acuerdo con las condiciones convencionales o las condiciones recomendadas por el fabricante.

55 Cuando no se indican las fuentes de los reactivos o dispositivos usados, se usaron productos convencionales disponibles en el mercado.

Ejemplo 1 Obtención de cadena ligera común

60 1. Obtención de secuencias y estructuras

Las estructuras cristalinas complejas de Trastuzumab y Pertuzumab se obtienen de un banco de datos de proteínas (PDB, www.pdb.org) respectivamente, el número de PDB de Trastuzumab es 1N8Z, y el número de PDB de Pertuzumab es 1S78. Pueden usarse dos estrategias de cribado para identificar contactos de aminoácidos entre CH3-CH3: (i) distancia de interacción de aminoácidos y (ii) análisis de regiones de accesibilidad con disolventes. En el presente documento, el análisis se realizó según la distancia de interacción de aminoácidos.

2. Obtención de cadena ligera de anticuerpo monoclonal y aminoácido de interfaz HER2 de antígeno

Según los principios de contacto con aminoácidos, los aminoácidos de interfaz se refieren a tales aminoácidos: la distancia entre un átomo pesado de una cadena lateral del aminoácido y un átomo pesado de cualquier aminoácido de otra cadena peptídica es menor que un valor umbral. En el presente documento, se determinó que el valor umbral fue 4,5 Å. También puede usarse 5,5 Å en algunos casos (Bahar y Jernigan 1997). La tabla 1 es una lista de aminoácidos que median el contacto entre una cadena ligera de Trastuzumab y el antígeno de HER2. 12 aminoácidos de interfaz de Trastuzumab se muestran en la tabla 1, que se seleccionan según los principios del contacto de aminoácidos.

Tabla 1 Lista de aminoácidos de interfaz de antígeno de HER2-cadena ligera de Trastuzumab

Cadena ligera de Trastuzumab	Antígeno de HER2
ASP28A(CL1)	GLU598C
ASN30A(CL1)	PRO571C, ASP596C, GLU598C, ALA600C, CYS601C, GLN602C
THR31A(CL1)	CYS601C, GLN602C, PRO603C
ALA32A(CL1)	PRO571C
TYR49A	PRO603C
SER50A(CL2)	LYS593C, PRO603C
PHE53A(CL2)	PRO603C, CYS604C, PRO605C
ARG66A	ASP596C, GLU598C
HIS91A(CL3)	ASP570C, PRO571C, PRO572C
TYR92A(CL3)	LYS569C, PRO571C, PRO572C, GLU598C, ALA600C
THR93A(CL3)	ASP560C, PRO572C
THR94A(CL3)	ASP560C, PRO572C

La tabla 2 es una lista de aminoácidos que median el contacto entre una cadena ligera de Pertuzumab y un antígeno de HER2. 8 aminoácidos de interfaz de Pertuzumab se muestran en la tabla 2, que se seleccionan según los principios de contacto de aminoácidos.

Tabla 2 Lista de aminoácidos de interfaz de antígeno de HER2 y cadena ligera de Pertuzumab

Cadena ligera de Pertuzumab	Antígeno de HER2
ILE31C(CL1)	SER313A
LEU46C	HIS296A
TYR49C	HIS296A, CYS312A, SER313A, LYS314A, PRO315A
SER50C(CL2)	SER313A
TYR53C(CL2)	SER313A, LYS314A, PRO315A
TYR55C(CL2)	LEU295A, HIS296A
THR56C(CL2)	LEU295A, HIS296A
TYR94C(CL3)	THR254A, ASP255A, THR256A, PHE257A

3. Identificación de regiones hiperviables de cadena ligera de Pertuzumab y Trastuzumab (CDRL1, CDRL2, CDRL3)

Las cadenas ligeras Pertuzumab y Trastuzumab se identifican usando el sistema de numeración Kabat para el reconocimiento de región hipervariable, y el software se puede encontrar en <http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>. El resultado de identificación de una región hipervariable de cadena ligera de Pertuzumab se muestra en la figura 2-A, y el resultado de identificación de una región hipervariable de cadena ligera de Trastuzumab se muestra en la figura 2-B.

4. Comparación de secuencias de cadena ligera de Pertuzumab y Trastuzumab y análisis exhaustivo de aminoácidos de interfaz de antígeno y cadena ligera

Un resultado de comparación de las secuencias de una cadena ligera de Pertuzumab y una cadena ligera de Trastuzumab y los resultados de un análisis exhaustivo de los aminoácidos de interfaz de antígenos se muestran en la figura 2-C, los aminoácidos de cadenas ligeras de Pertuzumab (P-mab) y Trastuzumab (T-mab) en contacto con el antígeno se muestran en color negro de fondo. Si la cadena ligera de Trastuzumab se designa como la cadena ligera común, entonces los aminoácidos diferenciales obtenidos comparando los aminoácidos de interfaz en la cadena ligera común en contacto con el antígeno con los de la cadena ligera de Pertuzumab (P-mab) se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Aminoácidos diferenciales que entran en contacto con el antígeno de la cadena ligera de Pertuzumab (P-mab) y Trastuzumab (T-mab)

Número Kabat	P-mab	T-mab
Kabat31	I	T
Kabat53	Y	F
Kabat56	T	S
Kabat94	Y	T

5 Si la cadena ligera de Pertuzumab se designa como la cadena ligera común, entonces los aminoácidos diferenciales obtenidos comparando los aminoácidos de interfaz en la cadena ligera común en contacto con el antígeno con los de la cadena ligera de Trastuzumab (T-mab) se muestran en la tabla 4.

10 Tabla 4 Aminoácidos diferenciales en contacto con el antígeno de la cadena ligera de Pertuzumab (P-mab) y Trastuzumab (T-mab)

Número Kabat	P-mab	T-mab
Kabat30	S	N
Kabat31	I	T
Kabat32	G	A
Kabat53	Y	F
Kabat56	T	S
Kabat66	G	R
Kabat91	Y	H
Kabat93	I	T
Kabat94	Y	T

15 Mediante el análisis de los aminoácidos diferenciales en contacto con el antígeno de la cadena ligera de Pertuzumab (P-mab) y Trastuzumab (T-mab), se seleccionó como entramado la cadena ligera de Trastuzumab (T-mab) y se introdujo la mutación T31I o/y T94Y para obtener una secuencia de una cadena ligera común de un anticuerpo biespecífico de Pertuzumab y Trastuzumab: CLC1-CLC4; se seleccionó una cadena ligera de Pertuzumab (P-mab) como marco y se introdujo la mutación de T31I o/y T94Y para obtener una secuencia de una cadena ligera común de un anticuerpo biespecífico de Pertuzumab y Trastuzumab: CLC5-CLC6. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera común obtenida son los siguientes:

20 CLC1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
 SASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC (SEQ ID NO: 1)

25 CLC2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNIAVAVAWYQQKPGKAPKLLIY
 SASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC (SEQ ID NO: 2)

30 CLC3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
 SASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTYPPTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC (SEQ ID NO: 3)

CLC4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNIAVAWYQQKPGKAPKLLIY
 SASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTYPPTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC (SEQ ID NO: 4)

CLC5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIY
 SASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC (SEQ ID NO: 5)

CLC6

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIY
 SASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYITPYTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC (SEQ ID NO: 6)

Ejemplo 2 Preparación y verificación funcional de la proteína variante de HER2 de proteína de antígeno

1. Diseño de proteína variante de HER2 solo uniendo a Pertuzumab

Robert F. Kelley' y Mark P. O'Connell publicaron los parámetros cinéticos de la unión de Trastuzumab y su correspondiente mutante y dominio extracelular de HER2 (ECD) en 1993. En donde, H91A, R50A, W95A e Y100aA tuvieron gran influencia en la unión de Trastuzumab al dominio extracelular de HER2. El equipo de Hyun-Soo Cho obtuvo cristales (número de PDB: 1N8Z) de un complejo formado entre un fragmento Fab de Trastuzumab y el dominio extracelular de HER2 (ECD) en 2003, y este resultado se publicó en Nature. Mediante el análisis de la estructura del complejo formado por el fragmento Fab de Trastuzumab y el dominio extracelular de HER2 (ECD) (cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO:18), se obtuvieron aminoácidos de contacto de interfaz del fragmento Fab de Trastuzumab y el dominio extracelular de HER2 (ECD), como se muestra en la tabla 5.

Se analizaron específicamente los aminoácidos en contacto H91L, R50H, W95H, Y100aH. Se encontró que dos combinaciones pueden afectar significativamente a la unión de estos aminoácidos. Combinación 1: ASP570, PRO571 y PRO572, y combinación 2: GLU558 y PHE573.

Tabla 5 Aminoácidos que entran en contacto con interfaz de fragmento Fab de Trastuzumab y dominio extracelular de HER2 (ECD)

Número	Cadena ligera de Trastuzumab	Antígeno de HER2
1	ASP28L(CL1)	GLU598C
2	ASN30L(CL1)	PRO571C, ASP596C, GLU598C, ALA600C, CYS601C, GLN602C
3	THR31L(CL1)	CYS601C, GLN602C, PRO603C
4	ALA32L(CL1)	PRO571C
5	TYR49L	PRO603C
6	SER50L(CL2)	LYS593C, PRO603C
7	PHE53L(CL2)	PRO603C, CYS604C, PRO605C
8	ARG66L	ASP596C, GLU598C
9	HIS91L(CL3)	ASP570C, PRO571C, PRO572C
10	TYR92L(CL3)	LYS569C, PRO571C, PRO572C, GLU598C, ALA600C
11	THR93L(CL3)	ASP560C, PRO572C
12	THR94L(CL3)	ASP560C, PRO572C
13	TYR33H	GLU558C, PHE573C
14	ARG50H	GLU558C, ASP560C, PRO572C, PHE573C
15	TYR52H	GLU558C
16	TYR57H	TYR532C, PRO540C, PRO557C, GLU558C
17	THR58H	GLU558C
18	ARG59H	GLU558C, ASP560C, GLN561C
19	TRP99H	PRO572C, PHE573C
20	GLY101H	ILE591C
21	ASP102H	PRO579C, ILE591C
22	GLY103H	ASP570C, PRO579C, ILE591C, LYS593C
23	PHE104H	ILE591C, LYS593C
24	TYR105H	ASP570C, PRO571C, PRO572C, PHE573C, VAL575C, LYS593C

5 Puede verse a partir del resultado anterior que:
combinación 1: P571 y P572 interactúan con varios aminoácidos críticos del Fab. Se creía que estos dos aminoácidos se localizan en una esquina de bucle, y mutar los mismos influiría en la estabilidad de su propia estructura.

10 combinación 2: GLU588 forma un enlace iónico con y una cadena pesada de Fab de Trastuzumab ARG 50, y forma fuerzas de Vander Waals con múltiples aminoácidos de la cadena pesada de Fab, la destrucción de estas fuerzas de interacción bloquearía las interacciones entre Fab de Trastuzumab y HER2, y por tanto se seleccionó la mutación GLU558 a ALA558; las fuerzas de Vander Waals se formaron entre PHE573 y múltiples aminoácidos de la cadena pesada de Fab, incluyendo aminoácidos críticos ARG508, TRP99 y TYR105, la destrucción de estas fuerzas de interacción bloquearía las interacciones entre Fab y HER2, y por tanto se seleccionó la mutación PHE573 a ALA573.

Los resultados del análisis anterior se muestran en la figura 3.

20 2. Diseño de una proteína variante de HER2 que se une únicamente a Trastuzumab

Matthew C. Franklin publicó la estructura de un complejo formado entre Fab de Pertuzumab y un dominio extracelular de HER2 en Cancer Cell. Este equipo también encontró qué aminoácidos críticos de HER2 pueden influir en la unión a Fab de Pertuzumab usando el método de barrido de alanina. Los resultados muestran que aminoácidos, como H296, S288 y L295 en la superficie de la proteína HER2, tuvieron efectos significativos, y en la presente solicitud se seleccionó la doble mutación S288A/H296A para obtener el antígeno de HER2 que solo se une a Trastuzumab.

En donde, una proteína variante de HER2 solo reconocida por Trastuzumab se nombró HER2m1, las proteínas variantes de HER2 solo reconocidas por Pertuzumab se nombraron HER2m2 y HER2m3. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas variantes de HER2 son las siguientes:

HER2m1:

TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNAS
LSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDP
LNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHK
NNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARC
KGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFNHSICELHCPALVTYNTDTF
ESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGACTLVCPLANQEVAEDGTQRC
EKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGD
PASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDLSVFNLQVIRGRILHN
GAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIIHNTHL CFVHTVPWDQLFRNPH
QALLHTANRPEDECVGEG LACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECV
EECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKD
PPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAE
QRASPLT (SEQ ID NO: 13)

5 HER2m2:

TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNAS
LSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDP
LNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHK
NNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARC
KGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFNHSICELHCPALVTYNTDTF
ESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVAEDGTQRC
EKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGD
PASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDLSVFNLQVIRGRILHN
GAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIIHNTHL CFVHTVPWDQLFRNPH
QALLHTANRPEDECVGEG LACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECV
EECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPAADQCVACAHYKD
PAFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPA
EQRASPLT (SEQ ID NO: 14)

HER2m3:

10

TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHL YQGCQVVQGNLELTYLPTNAS
 LSFLQDIQEVQGYVLI AHNQVRQVPLQRLRIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDP
 LNNTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHK
 NNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSR CWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARC
 KGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLAC LHFNHS GICELHCPALVTYNTDTF
 ESM PNPEG RYTFGASCVTACPYNYLSTDV G SCTLV CPLHNQEVTAEDGTQRC
 EKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTS ANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGD
 PASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISA WPD SLPDLSV FQNLQVIRGRILHN
 GAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLAL IHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPH
 QALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGH C WGP GPTQCVNCSQFLRGQECV
 EECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQP QNGSVTCFGPEADQCVACAHYKD
 AAFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEG ACQPCPINCTHSCVDLDDKGC PA
 EQRASPLT (SEQ ID NO: 15)

5 3. Modificación del vector de expresión celular de mamíferos comercial pcDNA4/myc-HisA

El vector comercial pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen, V863-20) comprende dos sitios de reconocimiento de enzima de restricción de PvuII que se ubican en las posiciones de aproximadamente 1411pb y 3160pb, respectivamente. Se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio en el plásmido de manera que un residuo C en la posición 3160pb se mutó a G, y se eliminó el sitio de reconocimiento de enzima de restricción de PvuII en esta posición, mientras que solo se mantuvo un sitio de reconocimiento de enzima de restricción en la posición de aproximadamente 1411pb, y el nuevo vector se nombró como pcDNA4m.

15 Los cebadores están diseñados de acuerdo con una secuencia de ADN (AY623427) de un fragmento cristizable (Fc) de inmunoglobulina gamma1 humana (IgG1) de NCBI de la siguiente manera:

F: AAGCTCCCTTACCCGGATCCGAAATCCTCTGACAAAAC TAC (SEQ ID NO : 29)

R: CCCGAATTCTATTTACCCGGAGACAGGGAG (SEQ ID NO : 30)

20 en el que se añadieron sitios de reconocimiento de enzima de restricción de HindIII y BamHI en el cebador en dirección 5' para la posterior clonación, y se añadió un sitio de reconocimiento de enzima de restricción de EcoRI en el cebador en dirección 3'.

25 Se usó ADNc de longitud completa de PBMC como plantilla para la amplificación para obtener genes de un fragmento Fc, luego los fragmentos de genes obtenidos se trataron con digestión enzimática doble con HindIII y BamHI de la empresa Takara para clonarse para dar un vector modificado pcDNA4m, y la precisión del plásmido construido se verificó mediante secuenciación para obtener un plásmido recombinante pcDNA4m-Fc.

4. Construcción del vector de expresión eucariótica de proteína variante de HER2

30 Los cebadores están diseñados basándose en información de secuencia de ADN (NM_004448.2) de una proteína HER2 del NCBI para clonar el dominio extracelular (residuos de aminoácidos de la posición 1-652) de una proteína HER2 de tipo natural, y los cebadores usados son los siguientes:

F: GCCAAGCTTGCCACCATGGAGCTGGCGGCCT (SEQ ID NO : 31)

R: CGCGGATCCATCGTCAGAGGGCTGGCTCTC (SEQ ID NO : 32)

35 Los cebadores contienen sitios de reconocimiento HindIII en dirección 5' y sitios de reconocimiento BamHI en dirección 3'. ADNc de una célula BT474 (comprada a Shanghai Cell Bank de Chinese Academy of Sciences) se usaron como plantilla para la amplificación para obtener un fragmento de ADN de 1,9kb, codificando el dominio extracelular de

HER2wt, se clonó en un vector T comercial (T-Vector pMD19 (Simple) comprado a la empresa Takara) para obtener un plásmido T-Her2ECD, y la precisión de las secuencias se confirmó mediante secuenciación.

5 Basándose en las secuencias de aminoácidos de la anterior proteína variante de HER2 HER2m1 reconocida solo por Trastuzumab, proteínas variantes de HER2 HER2m2 y HER2m3 reconocidas solo por Pertuzumab, se diseñaron cebadores correspondientes según los sitios de mutación:

M1-F:GCACCCTCGTCTGCCCCCTGGCTAACCAAGAGG (SEQ ID NO : 33)

M1-R: GGGGGCAGACGAGGGTGCAAGCTCCCACGT (SEQ ID NO: 34)

M2-1-F : GGACCGGCGGCTGACCA (SEQ ID NO: 35)

M2-1-R : TGGTCAGCCGCGGTCC (SEQ ID NO : 36)

M2-2-F : TATAAGGACCCTGCCTTCTGCG (SEQ ID NO : 37)

M2-2-R : CGCAGAAGGCAGGGTCCTTAT (SEQ ID NO : 38)

M3-F : CTATAAGGACGCTGCCTTCTGCG (SEQ ID NO : 39)

M3-R : CGCAGAAGGCAGCGTCCTTATAG (SEQ ID NO : 40)

10 Usando el plásmido T-Her2ECD como plantilla, se llevó a cabo mutagénesis específica de sitio con los cebadores anteriores para obtener genes de las tres proteínas variantes (HER2m1, HER2m2, HER2m3) de dominio extracelular de HER2. Luego, se trataron con digestión enzimática doble usando HindIII y BamHI de la empresa Takara y se clonaron en el vector pcDNA4m-Fc, los tres genes HER2m1, HER2m2 y HER2m3 se fusionaron al terminal 5' del gen Fc respectivamente, para obtener tres nuevos vectores denominados como pcDNA4m-Her2m1-Fc, pcDNA4m-Her2m2-Fc y pcDNA4m-Her2m3-Fc. Estos tres vectores pueden usarse para expresar proteínas de fusión HER2m1-Fc, HER2m2-Fc y HER2m3-Fc en una célula de mamífero.

5. Expresión transitoria y purificación de la proteína variante de HER2

20 Dos días antes de la transfección, se prepararon 200 ml x 3 de suspensión celular HEK293 (ATCC, CRL-1573™) para transfección transitoria, y una densidad de inóculo fue de $0,8 \times 10^6$ células/ml. Dos días después, se contabilizaron las células en la suspensión que va a transfectarse y se determinó que la densidad celular fue de $3,5-4 \times 10^6$ células/ml, la suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron con 40 ml x 3 de medio de cultivo Freestyle293 fresco y luego se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm durante 5 min, y se descartó el sobrenadante. 293 células se suspendieron de nuevo con 200 ml x 3 de medio de cultivo de Freestyle293. 200 µg cada uno de los vectores de expresión de las tres proteínas variantes de HER2 obtenidas en los ejemplos 2-4 se diluyeron usando 2 ml de medio de cultivo Freestyle293, respectivamente. Posteriormente, se diluyeron 1,5 ml de polietilimina usando 5 ml de medio de cultivo Freestyle293, y se preparó una disolución PEI requerida para su transformación. Se añadieron 2 ml de disolución PEI respectivamente en 2 ml de plásmidos de expresión diluidos, completamente mezclados, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron respectivamente tres partes de mezclas de plásmido/PEI en tres partes de suspensiones celulares de 200 ml, y se cultivaron a 37°C, CO₂ al 10% y 90 rpm; simultáneamente, se añadió IGF-1 50 µg/l. Cuatro horas más tarde, 200 ml de medio de cultivo EX293, glutamina 2 mM e IGF-1 50 µg/l se añadieron además en cada parte de las muestras transformadas, y se cultivaron con 135 rpm. 24 horas después, se añadió VPA 3,8 mM.

35 Después del cultivo durante 5-6 días, se recogieron tres partes de 400 ml de sobrenadante de cultivo de expresión transitoria de células de proteína variante de HER2, respectivamente, y se purificaron preliminarmente mediante cromatografía de afinidad con proteína A para obtener muestras de proteína variante de HER2. En las que el nivel de expresión de HER2m3 fue muy bajo, y el título de la proteína de plantilla en el sobrenadante de cultivo celular de HER2m3 fue inferior a 0,5 mg/l, se sospechó que esto podría ser resultado de la inestabilidad de la proteína variante, y por tanto esta proteína no se purificó adicionalmente. Los niveles de expresión de las proteínas variantes HER2m1 y HER2m2 obtenidas se calculó que eran de aproximadamente 20 mg/l después de la purificación. Las muestras de proteína obtenidas se examinaron preliminarmente con SDS-PAGE, y se observaron claramente las bandas diana (véase la figura 4).

45 6. Detección de unión específica de proteína variante de HER2 a Trastuzumab o Pertuzumab con ELISA

50 Una placa ELISA se recubrió con una proteína de Trastuzumab o una proteína de Pertuzumab a 4°C durante la noche, luego se añadió disolución de BSA al 3% y se bloqueó a temperatura ambiente durante 2 horas. La muestra (proteína HER2m1 o HER2m2) se etiquetó con biotina de antemano, y luego las proteínas biotiniladas HER2m1-biotina y HER2m2-biotina se diluyeron en gradiente en 1:4, a partir de 16 µg/ml y hasta 0,224 ng/µl, incluyendo 9 gradientes

totalmente. Las muestras de proteína variante de HER2 biotinilada diluida en gradiente se añadieron a la placa ELISA, y se permitió la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego se añadió estreptavidina etiquetada con HRP, y se permitió la reacción a temperatura ambiente durante 1,5 horas, y finalmente se catalizó el sustrato para el desarrollo del color y se obtuvieron los resultados. Las curvas de afinidad se obtuvieron mediante el ajuste de los datos obtenidos usando un método de cuatro parámetros.

Como se muestra en la figura 5, la afinidad aparente de la proteína HER2m1 con Pertuzumab se redujo 20 veces en comparación con la proteína HER2m1 con Trastuzumab. Por tanto, puede concluirse que la proteína variante es una proteína de antígeno específico de Trastuzumab. Por otro lado, la afinidad aparente de la proteína HER2m2 con Pertuzumab se redujo en más de 2 órdenes de magnitud en comparación con la de la proteína HER2m2 con Trastuzumab, mostrando que esta proteína variante es una proteína de antígeno específico de Pertuzumab.

Ejemplo 4 Sustitución de las cadenas ligeras originales de Tmab y Pmab por la cadena ligera común y verificación de los efectos de la cadena ligera común

1. Construcción de vectores de expresión eucariótica de anticuerpos monoclonales de Tmab y Pmab portadores de cadenas ligeras comunes

Las secuencias de ADN de codificación correspondientes se diseñaron usando la herramienta en línea DNAsworks (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) según las secuencias de aminoácidos (figura 2 y figura 16 en la patente correspondiente) de anticuerpos de longitud completa de Trastuzumab y Pertuzumab encontrados en la patente US2009/0285837A1, y el gen de cadena pesada (SEQ ID NO: 16) de Trastuzumab y el gen de cadena pesada (SEQ ID NO: 17) de Pertuzumab se obtuvieron mediante síntesis artificial. Según las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 1-6) de un grupo de cadenas ligeras comunes obtenidas en el ejemplo 1, secuencias de ADN correspondientes se diseñaron usando la herramienta en línea DNAsworks (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>), y el gen CLC1 (SEQ ID NO: 7) de la cadena ligera común del anticuerpo biespecífico de Pmab-Tmab y el gen CLC5 (SEQ ID NO: 11) de la cadena ligera común del anticuerpo biespecífico de Pmab-Tmab se obtuvieron por síntesis artificial.

Entonces los cebadores de mutación se diseñaron según las secuencias de CLC2- CLC6, y las secuencias fueron de las siguientes:

T311-F : GACGTGAACATTGCCGTTGC (SEQ ID NO : 41)

T311-R : GCAACGGCAATGTTACGTC (SEQ ID NO : 42)

T94Y-F : AGCACTATACTTATCCTCCAACATTC (SEQ ID NO : 43)

T94Y-R : ATGTTGGAGGATAAGTATAGTGCTG (SEQ ID NO : 44)

Y94T-F: TCGCCACCACTTATTGTCAG (SEQ ID NO : 45)

Y94T-R: CTGACAATAAGTGGTGGCGA (SEQ ID NO : 46)

Usando el gen CLC1 como plantilla, secuencias de CLC2-CLC4 (SEQ ID NO: 8-SEQ ID NO : 10) se obtuvieron por mutagénesis dirigida a sitio usando los dos pares de cebadores T311 y T94Y; usando CLC5 como plantilla, la secuencia de CLC6 (SEQ ID NO: 12) se obtuvo por mutagénesis dirigida a sitio usando el par de cebador Y94T.

Los genes de cadena pesada de Trastuzumab sintetizados, los genes de cadena pesada de Pertuzumab y los genes de cadena ligera común (CLC1-CLC6) se subclonaron respectivamente en el vector modificado pcDNA4m usando digestión enzimática doble con HindIII y EcoRI de la empresa Takara, la precisión de la construcción de plásmido se verificó mediante secuenciación para obtener ADN de plásmido recombinante, en concreto pcDNA4m-TmabHC, pcDNA4m-PmabHC y los vectores relacionados con cadena ligera común pcDNA4m-CLC1 a pcDNA4m-CLC6.

Los vectores de expresión de gen de cadena ligera común construidos con éxito anteriores pcDNA4m-CLC1 a pcDNA4m-CLC6 se trataron con digestión enzimática doble usando Bgl II y Pvu II de la empresa Takara. Los productos digeridos por enzimas se separaron y purificaron usando electroforesis de agarosa al 0,8%, y se recuperaron aproximadamente fragmentos de ADN de 2 kb que contenían el gen común, respectivamente; pcDNA4m-TmabHC se trató con digestión enzimática doble usando BglII y NruI para recuperar fragmentos de ADN de aproximadamente 6kb que contienen genes de TmabHC. El pcDNA4m-PmabHC se trató con digestión enzimática doble usando BglII y NruI para recuperar fragmentos de ADN de aproximadamente 6kb que contienen genes de PmabHC. Posteriormente, se ligaron los fragmentos de ADN tratados por digestión enzimática y se combinaron elementos de expresión de TmabHC o PmabHC con elementos de expresión de cadena ligera común de diversas secuencias para obtener los plásmidos recombinantes pcDNA4m-Tmab-CLC1, pcDNA4m-Tmab-CLC2, pcDNA4m-Tmab-CLC3, pcDNA4m-Tmab-CLC4, pcDNA4m-Tmab-CLC5, pcDNA4m-Tmab-CLC6, pcDNA4m-Pmab-CLC1, pcDNA4m-Pmab-CLC2, pcDNA4m-Pmab-CLC3, pcDNA4m-Pmab-CLC4, pcDNA4m-Pmab-CLC5 y pcDNA4m-Pmab-CLC6.

2. Expresión transitoria y purificación de anticuerpos monoclonales de Tmab y Pmab portadores de cadenas ligeras comunes

Dos días antes de la transfección, se prepararon suspensiones celulares de 50 ml x 12 HEK293 (ATCC, CRL-1573™) para transfección transitoria, y una densidad de inoculación fue de $0,8 \times 10^6$ células/ml. Dos días después, se contabilizaron las células en la suspensión a transfectar y la densidad celular fue de $3,5-4 \times 10^6$ células/ml, la suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm y se descartó un sobrenadante. Las células se suspendieron de nuevo con 10 ml x 12 de medio de cultivo Freestyle293 fresco y luego se centrifugaron de nuevo a 1000 rpm durante 5 min, y se descartó el sobrenadante. Se suspendieron de nuevo 293 células con 50 ml x 12 de medio de cultivo Freestyle293. 50 µg de cada uno de los 12 vectores de expresión relacionados con anticuerpo monoclonal de cadena ligera común obtenidos en los ejemplos 4-1 se diluyeron usando 0,5 ml de medio de cultivo Freestyle293 respectivamente. Posteriormente, se diluyeron 1,5 ml de polietilenimina usando 5 ml de medio de cultivo Freestyle293, y se preparó la disolución PEI requerida para la transformación. Se añadieron respectivamente 0,5 ml de disolución PEI a 0,5 ml de plásmidos de expresión diluidos, se mezclaron completamente y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 12 partes de mezclas de plásmido/PEI, respectivamente, en 12 partes de 50 ml de suspensiones celulares para cultivarse a una temperatura de 37°C, CO₂ al 10% y 90 rpm; también se añadió IGF-1 50 µg/l. Cuatro horas después, se añadieron 50 ml de medio de cultivo EX293, se añadieron además glutamina 2 mM y IGF-1 50 µg/l en cada parte de las muestras transformadas, y se cultivaron con 135 rpm. 24 horas después, se añadió VPA 3,8mM.

Después del cultivo durante 5-6 días, se recogieron 12 partes de 100 ml de sobrenadante de cultivo de expresión transitoria de células de anticuerpo monoclonal cadena ligera común, respectivamente, y se purificaron preliminarmente usando cromatografía de afinidad con proteína A para obtener 12 muestras de proteína de anticuerpo monoclonal de cadena ligera común: Tmab-CLC1 a 6 y Pmab-CLC1 a 6; se calculó el nivel de expresión de cada anticuerpo monoclonal obtenido después de la purificación y el resultado se muestra en la tabla 6.

Las muestras de proteína obtenidas por purificación por cromatografía de afinidad en una etapa se detectaron preliminarmente usando SDS-PAGE no reducida. Como se muestra en la figura 6, pueden verse dos bandas claras para cada una de la proteína de anticuerpo monoclonal de cadena ligera común en el gel reducido, que fueron respectivamente una banda de cadena ligera entre 25kDa y 35kDa y una banda de cadena pesada entre 85kDa y 50kDa. Las purezas de las muestras de proteína se examinaron usando SE-HPLC y los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Nivel de expresión transitoria de anticuerpo monoclonal de cadena ligera común y pureza de muestra tras la purificación en una sola etapa

Muestra de anticuerpo monoclonal de cadena ligera común	Nivel de expresión (mg/l)	Pureza de muestra (%)
TmabCLC1	56	98,7
TmabCLC2	28	98,8
TmabCLC3	38	98,7
TmabCLC4	56	96,4
TmabCLC5	25	95,2
TmabCLC6	38	96,1
PmabCLC1	48	95,7
PmabCLC2	50	96,8
PmabCLC3	51	96,9
PmabCLC4	46	98,9
PmabCLC5	40	98,7
PmabCLC6	42	98,9

3. Analizar la afinidad de Tmab y Pmab que comprende las cadenas ligeras comunes con ELISA

Se examinaron cambios en la afinidad de Tratzumab y Pertuzumab que comprenden las cadenas ligeras comunes con sus respectivos antígenos específicos, y el método ELISA indirecto usado fue similar al de los ejemplos 2-6. En el que, cuando se examinaron cambios en la afinidad de Tratzumab que comprende las cadenas ligeras comunes, se usó la proteína de antígeno específico HER2m1; y cuando se examinaron los cambios en la afinidad de Pertuzumab que comprende las cadenas ligeras comunes, se usó la proteína de antígeno específico HER2m2. Las curvas de afinidad obtenidas se mostraron en las figuras 7-8. Según CE50, cuando se usaron las cadenas ligeras comunes (CLC1-CLC4) obtenidas mediante la modificación de las cadenas ligeras del Tratzumab original, la afinidad de Tratzumab con su antígeno específico HER2m1 no se modificó de ninguna manera significativa; mientras que la afinidad de Pertuzumab con su antígeno específico HER2m2 se redujo ligeramente, pero este cambio estuvo en un intervalo aceptable. Sin embargo, cuando se usaron las cadenas ligeras comunes (CLC5 y CLC6) obtenidas mediante la modificación de las cadenas ligeras del Pertuzumab original, la afinidad de Pertuzumab con su antígeno específico HER2m2 no se cambió de ninguna forma significativa, pero la afinidad de Tratzumab con su antígeno específico

HER2m1 se redujo en casi una vez.

Ejemplo 5 Preparación e identificación de anticuerpo biespecífico de Ptmab

5 1. Expresión transitoria y purificación de anticuerpo biespecífico de Ptmab

Se introdujeron mutaciones puntuales en el fragmento Fc de TmabHC en pcDNA4m-Tmab-CLC1, y TmabHC se cambió a TmabHC-botón (su secuencia de cadena pesada fue como se establece en SEQ ID NO: 19; los residuos mutados fueron S354C y T366W), y se construyó además pcDNA4m-Tmab-botón-CLC1; mientras tanto, los residuos de aminoácidos en PmabHC de pcDNA4m-Pmab-CLC1 se mutaron para dar PmabHC-agujero (su secuencia de cadena pesada fue la establecida en SEQ ID NO: 20; los residuos mutados fueron Y349C, T366S, L368A y Y407V) usando mutagénesis dirigida a sitio haciendo referencia a la patente CN102558355A, y se construyó además pcDNA4m-Pmab-agujero-CLC1. Se hizo referencia al documento CN102558355A para esquemas de mutación específicos. Estos dos plásmidos construidos recientemente se usarán para preparar el anticuerpo biespecífico de Pmab-Tmab con un modelo de cadena ligera común, basándose en el modelo de "botón-agujero".

2. Expresión transitoria y purificación de anticuerpo biespecífico de Ptmab

Dos días antes de la transfección, se prepararon 600 ml de suspensión celular HEK293 (ATCC, CRL-1573™) para transfección transitoria, y una densidad de inoculación fue de $0,8 \times 10^6$ células/ml. Dos días después, se contabilizaron las células en la suspensión a transfectar, y la densidad celular fue de $3,5-4 \times 10^6$ células/ml, la suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron con 100 ml de medio de cultivo Freestyle293 fresco y luego se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm durante 5 min, y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron 293 células con 600 ml de un medio de cultivo Freestyle293. Se mezclaron completamente 300 µg de cada uno de pcDNA4m-Tmab-botón-CLC1 y pcDNA4m-Pmabagujero-CLC1 y luego se diluyeron usando 3 ml de medio de cultivo Freestyle293 respectivamente. Posteriormente, se diluyeron 1,5 ml de polietilenimina usando 5 ml de medio de cultivo Freestyle293, y se preparó la disolución PEI requerida para la transformación. Se añadieron 3 ml de disolución PEI en 3 ml de plásmidos mezclados diluidos, completamente mezclados, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla de plásmidos/PEI se añadió en suspensiones celulares de 600 ml, y se cultivó a 37°C, CO₂ al 10% y 90 rpm; también se añadió IGF-1 50 µg/l. Cuatro horas después, se añadieron 600 ml de medio de cultivo EX293, glutamina 2 mM y IGF-1 50 µg/l en las muestras transformadas de nuevo, y se cultivaron con 135 rpm. 24 horas después, se añadió VPA 3,8 mM.

Después del cultivo durante 6-7 días, 1200 ml de sobrenadante de cultivo de expresión transitoria de la célula de anticuerpo biespecífico de Ptmab, y luego se purificó preliminarmente usando cromatografía de afinidad con proteína A, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de tamiz molecular para obtener una muestra de proteína biespecífica de Ptmab denominada KN026. Un nivel de expresión transitoria de KN026 fue tan alto como 80 mg/l, según el cálculo usando OD280.

La muestra de proteína obtenida después de la purificación se examinó preliminarmente con SDS-PAGE. Como se muestra en la figura 9, dos bandas claras de la proteína de anticuerpo biespecífico KN026 pueden verse en el gel reducido, que eran respectivamente una banda de cadena ligera entre 25kDa y 35kDa y una banda de cadena pesada entre 85kDa y 50kDa. Mientras tanto, bajo las condiciones no reducidas, se mostró KN026 como una sola banda. Se examinó la pureza de la muestra de proteína usando SE-HPLC y fue de aproximadamente un 95%, se mostró el resultado en la figura 10.

3. Verificación de la capacidad de la proteína de anticuerpo KN026 para reconocer simultáneamente los antígenos específicos correspondientes de Trastuzumab y Pertuzumab con ELISA de tipo puente

Una placa ELISA se recubrió con proteína de antígeno específico de Trastuzumab Her2M1 a 4°C durante la noche. Luego, se añadió una disolución de BSA al 3%, y se bloqueó a temperatura ambiente durante 2 horas. La muestra que va a someterse a prueba se diluyó en gradiente a 1:3, empezando desde 5 µg/ml hasta 1,06 ng/µl, incluyendo 8 gradientes en total. La muestra después de la dilución de gradiente se añadió a la placa ELISA, y se permitió la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se añadió a la placa ELISA proteína de antígeno específico de Pertuzumab biotinilado Her2M2-biotina para reaccionar con la muestra durante 2 horas. Posteriormente, se añadió estreptavidina etiquetada con HRP para reaccionar con Her2M2-biotina durante 1,5 horas a temperatura ambiente, y finalmente, se catalizó el sustrato para el desarrollo del color y se obtuvieron los resultados. Las curvas de afinidad se obtuvieron después del ajuste de los datos obtenidos, usando el método de cuatro parámetros.

Como se muestra en la figura 11, solo el anticuerpo biespecífico KN026 capaz de reconocer simultáneamente dos antígenos puede proporcionar una curva de afinidad, mientras que para Trastuzumab o Pertuzumab capaces de reconocer específicamente un solo antígeno, el color claramente desarrollado no podía verse ni siquiera a la concentración más alta.

65 Ejemplo 6 Preparación e identificación de la mezcla de anticuerpos de Ptmab

1. Expresión transitoria y purificación de la mezcla de anticuerpos de Ptmab

Se introdujeron mutaciones puntuales en el fragmento Fc de TmabHC en pcDNA4m-Tmab-CLC1, y TmabHC se cambió a TmabHC-mix1 (donde la secuencia de cadena pesada fue como se establece en SEQ ID NO: 21), y se construyó además pcDNA4m-Tmabmix1-CLC1, se hizo referencia al ejemplo 1 de la patente CN103388013A para etapas de construcción específicas. Basándose en el modelo de mezcla de “repulsión de carga” al usar el modelo de cadena ligera común, estos dos plásmidos de nueva construcción se usaron para preparar una mezcla de anticuerpos Pmab y Tmab capaz de expresarse en una sola cepa celular recombinante.

2. Expresión transitoria y purificación de la mezcla de anticuerpos de Pmab y Tmab

Dos días antes de la transfección, se preparó una suspensión celular HEK293 de 600 ml (ATCC, CRL-1573™) para transfección transitoria, y una densidad de inóculo fue de $0,8 \times 10^6$ células/ml. Dos días después, se contabilizaron las células en la suspensión a transfectar, y la densidad celular fue de $3,5-4 \times 10^6$ células/ml, la suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron con 100 ml de medio de cultivo Freestyle293 fresco y luego se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm durante 5 min, y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron 293 células en 600 ml de medio de cultivo Freestyle293. 300 µg de cada una de pcDNA4m-Tmabmix1-CLC1 y pcDNA4m-Pmab-CLC1 (donde la secuencia de cadena pesada fue tal como se indica en SEQ ID NO: 22) se mezclaron completamente, y luego se diluyeron usando 3 ml de medio de cultivo Freestyle293. Posteriormente, se diluyeron 1,5 ml de polietilimina usando 5 ml de medio de cultivo Freestyle293, y se preparó disolución PEI requerida para su transformación. Se añadieron 3 ml de disolución PEI en 3 ml de plásmido mezclado diluido, completamente mezclado, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla de plásmido/PEI se añadió en suspensión celular de 600 ml, y se cultivó a 37°C, CO₂ al 10% y 90rpm; mientras tanto, se añadió IGF-1 50 µg/l. Cuatro horas después, se añadieron 600 ml de medio de cultivo EX293, glutamina 2 mM e IGF-1 50 µg/l en las muestras transformadas de nuevo, y se cultivaron con 135 rpm. 24 horas después, se añadió VPA 3,8 mM.

Después del cultivo durante 6-7 días, se recogieron 1200 ml de sobrenadante de cultivo de expresión transitoria de células de mezcla de anticuerpos de Ptmab y Tmab, y luego se purificó preliminarmente usando cromatografía de afinidad con proteína A para obtener una muestra de proteína de mezcla de anticuerpo de Ptmab y Tmab, denominada KN010. El nivel de expresión transitoria de KN010 se calculó para ser tan alto como 100 mg/l, según la medición OD280.

La muestra de proteína obtenida por purificación por cromatografía de afinidad en una etapa se examinó preliminarmente con SDS-PAGE. Como se muestra en la figura 12, dos bandas claras de la mezcla de anticuerpos monoclonales de cadena ligera común pueden verse en el gel reducido, las cuales eran una banda de cadena ligera entre 25kDa y 35kDa y una banda de cadena pesada entre 85kDa y 50kDa. Mientras tanto, en la condición no reducida, KN010 se mostró como una sola banda. Se examinó la pureza de la muestra de proteína usando SE-HPLC y la pureza fue de aproximadamente un 95%, los resultados se muestran en la figura 13.

3. La capacidad de KN010 para reconocer los antígenos específicos correspondientes de Trastuzumab y Pertuzumab se verificó usando ELISA de tipo puente con el mismo antígeno; se verificó que KN010 era incapaz de reconocer simultáneamente este par de antígenos usando ELISA de tipo puente con diferentes antígenos.

Una placa ELISA se recubrió con proteína de antígeno específico de Trastuzumab HER2m1 a 4°C durante la noche. Luego, se añadió una disolución de BSA al 3%, y se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente. Una muestra a examinar se diluyó en gradiente en 1:4, empezando desde 2,5 µg/ml hasta 0,61 ng/µl, incluyendo 7 gradientes en total. La muestra a examinar después de la dilución de gradiente se añadió en la placa ELISA, y se permitió la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces, se añadió proteína de antígeno específico de Pertuzumab biotinilada HER2m2-biotina o biotinilada HER2m1-biotina a la placa ELISA para reaccionar con la muestra a examinar a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se añadió estreptavidina etiquetada con HRP para reaccionar con HER2m2-biotina o HER2m1-biotina a temperatura ambiente durante 1,5 horas, y finalmente se catalizó el sustrato para el desarrollo del color y se obtuvieron los resultados. Las curvas de afinidad se obtuvieron mediante el ajuste de los datos obtenidos usando el método de cuatro parámetros.

Una placa ELISA se recubrió con proteína de antígeno específico de Perstuzumab HER2m2 a 4°C durante la noche. Luego, se añadió una disolución de BSA al 3%, y se bloqueó a temperatura ambiente durante 2 horas. Una muestra a examinar se diluyó en gradiente en 1:4, empezando desde 2,5 µg/ml hasta 0,61 ng/µl, incluyendo 7 gradientes en total. La muestra a examinar tras la dilución de gradiente se añadió en la placa ELISA, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego, proteína de antígeno específico de Pertuzumab biotinilada HER2m2-biotina se añadió en la placa ELISA para reaccionar con la muestra a examinar a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se añadió estreptavidina etiquetada con HRP para reaccionar con HER2m2-biotina a temperatura ambiente durante 1,5 horas, y finalmente se catalizó el sustrato para el desarrollo del color y se obtuvieron los resultados. Las curvas de afinidad se obtuvieron mediante el ajuste de los datos obtenidos usando el método de cuatro parámetros.

Como se muestra en la figura 14, se demostró en el ELISA de tipo puente con el mismo antígeno que los dos brazos

de la proteína KN010 eran capaces de reconocer simultáneamente el antígeno de Trastuzumab, o reconocer simultáneamente el antígeno de Pertuzumab. Esto indica que la proteína KN010 al menos comprende dos anticuerpos capaces de reconocer diferentes dianas de antígenos. Sin embargo, no se observó el desarrollo del color usando ELISA de tipo puente con diferentes antígenos, demostrando que los dos brazos de KN010 son incapaces de reconocer simultáneamente estos dos antígenos, lo que significa que KN010 no contiene un componente heterodímero de Ptmab.

Ejemplo 7 Actividad de unión del anticuerpo biespecífico de Ptmab a la proteína HER2 de superficie celular

1. Actividad de unión de anticuerpo biespecífico de Ptmab a proteína HER2 de superficie celular BT474 de cáncer de mama humano

Se examinó la unión de célula BT474 de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 y anticuerpos de HER2 (como el anticuerpo biespecífico de Ptmab, Pertuzumab y Trastuzumab) usando citometría de flujo, y también se examinó la dependencia de concentración de los efectos de unión.

Después de la digestión, se resuspendieron las células BT474 en BSA/PBS al 5%, y se añadieron 3×10^5 células/tubo en cada tubo para centrifugadora de 1,5 ml; las muestras a examinar se diluyeron tres veces, empezando desde 100 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,001694 $\mu\text{g/ml}$, incluyendo 11 concentraciones en total. A las muestras se les permitió interactuar con las células, a continuación, se añadió IgG antihumano FITC-conejo para probar la unión de los anticuerpos a las células, y se registró la intensidad de fluorescencia media (MFI) usando citometría de flujo. Se realizaron curvas de MFI representadas gráficamente frente a valores logarítmicos de concentraciones de anticuerpos, y se obtuvieron curvas de dependencia de concentración que revelaban la unión de los anticuerpos a células BT474 mediante ajuste usando el método de cuatro parámetros. Como se muestra en la figura 15, el anticuerpo biespecífico de Ptmab (KN026), así como el Pertuzumab y el Trastuzumab se unieron claramente a BT474, y este efecto fue dependiente de la concentración. Como puede verse a partir de la CE50 de las curvas de unión, la afinidad de KN026 a la proteína HER2 de superficie de célula BT474 fue cercana a la de Trastuzumab.

2. Unión de anticuerpo biespecífico de Ptmab a la proteína HER2 de superficie celular N-87 de cáncer gástrico humano

Se examinó la unión de la célula de cáncer gástrico N-87 de sobreexpresión de HER2 con anticuerpos HER2 (como un anticuerpo biespecífico de Ptmab KN026, Pertuzumab y Trastuzumab) usando citometría de flujo, y también se examinó la dependencia de la concentración de los efectos de unión.

Después de la digestión, se resuspendieron células N-87 en BSA/PBS al 5%, y se añadieron 3×10^5 células/tubo en cada tubo para centrifugadora de 1,5 ml; las muestras a examinar se diluyeron dos veces, empezando desde 40 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,009766 $\mu\text{g/ml}$, incluyendo 13 concentraciones en total. Se permitió que las muestras reaccionaran con células, luego se añadió IgG humano anti-humano FITC-conejo para detectar los anticuerpos unidos a las células, y se midió una intensidad de fluorescencia media (MFI) usando citometría de flujo. Se realizaron curvas de MFI representadas gráficamente frente a valores logarítmicos de concentraciones de anticuerpos, y se obtuvieron curvas de dependencia de concentración para la unión de los anticuerpos a las células BT474 mediante ajuste usando el método de cuatro parámetros. Como se muestra en la figura 16, el anticuerpo biespecífico de Ptmab (KN026), así como el Pertuzumab y el Trastuzumab se unieron claramente a N-87, y el efecto de unión fue dependiente de la concentración. Como puede verse a partir de la CE50 de las curvas de unión, la afinidad de KN026 a la proteína HER2 de superficie de células N-87 fue ligeramente inferior a la de Trastuzumab y Pertuzumab.

Ejemplo 8 Unión de mezcla de anticuerpos de Pmab y Tmab a la proteína Her2 de superficie celular

Unión de mezcla de anticuerpos de Pmab y Tmab a la proteína HER2 de superficie celular BT474 de cáncer de mama humano

Se examinó la unión de la célula BT474 de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 con anticuerpos de HER2 (como una mezcla de anticuerpos de Pmab y Tmab, Pertuzumab y Trastuzumab) usando citometría de flujo, y también se examinó la dependencia de la concentración de los efectos de unión.

Después de la digestión, se resuspendieron células BT474 en BSA/PBS al 5%, y se añadieron 15×10^6 células/tubo en cada tubo para centrifugadora de 1,5 ml; las muestras a examinar se diluyeron tres veces, empezando desde 1000 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0,01694 $\mu\text{g/ml}$, incluyendo 11 concentraciones en total. Se permitió que las muestras reaccionaran con las células, luego se añadió FITC-conejo antihumano para detectar los anticuerpos unidos a las células, y se leyó una intensidad de fluorescencia media (MFI) usando citometría de flujo. Se realizaron curvas de MFI representadas gráficamente frente a valores logarítmicos de concentraciones de anticuerpos, y se obtuvieron curvas de dependencia de concentración de unión de los anticuerpos a las células BT474 mediante ajuste usando el método de cuatro parámetros. Como se muestra en la figura 17, la mezcla de anticuerpo de Pmab y Tmab (KN010), así como Pertuzumab y Trastuzumab se unieron claramente a BT474, y el efecto de unión fue dependiente de la concentración. Como puede verse en la CE50 de las curvas, la afinidad de KN010 a la proteína HER2 de superficie celular BT474 está entre las de Trastuzumab y Pertuzumab.

Ejemplo 9 Inhibición de anticuerpo biespecífico de Ptmab en la proliferación de células cancerosas

1. Inhibición del anticuerpo biespecífico de Ptmab en la proliferación celular BT474 de cáncer de mama humano

Se usó el método CKK-8 para examinar cambios en la proliferación de célula de cáncer de mama BT474 con sobreexpresión HER2 en presencia de anticuerpos HER2 (como un anticuerpo biespecífico de Ptmab, Pertuzumab y Trastuzumab), comparando y evaluando de ese modo el efecto de inhibición del anticuerpo biespecífico de Ptmab sobre la proliferación de células de cáncer BT474.

Las células BT474 se cultivaron por adherencia en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10000 células/pocillo y a 37°C durante 16h. Se prepararon muestras de diversas concentraciones respectivamente usando un medio de ensayo (medio de cultivo DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 1%): una concentración máxima fue de 10 µg/ml-0,0015 µg/m y se diluyó 3 veces, incluyendo 9 concentraciones en total. Se añadieron 150 µl muestras en cada pocillo celular, y 72 h más tarde se midió la vitalidad celular con un kit CKK-8 (DOJNDO). La vitalidad celular se representó gráficamente frente a valores logarítmicos de concentraciones de muestra, y se obtuvieron curvas de actividad de destrucción celular de la muestra (anticuerpo biespecífico de Ptmab KN026) y una referencia (combinación de Trastuzumab y Trastuzumab+Pertuzumab) mediante el ajuste usando el método de cuatro parámetros.

Como se muestra en la figura 18, KN026 y Trastuzumab, así como la combinación Trastuzumab+Pertuzumab tienen un claro efecto de eliminación sobre BT474, y este efecto de eliminación era dependiente de la concentración. Sin embargo, a altas concentraciones, el efecto de inhibición del anticuerpo biespecífico de Ptmab KN026 sobre células BT474 fue claramente superior al de Trastuzumab solo o a la combinación de Pertuzumab y Trastuzumab.

2. Inhibición del anticuerpo biespecífico de Ptmab sobre la proliferación de células N-87 de cáncer gástrico humano

Los cambios en la proliferación de células de cáncer gástricas N-87 con sobreexpresión de HER2 en presencia de anticuerpos de HER2 (como un anticuerpo biespecífico de Ptmab, Pertuzumab y Trastuzumab) se observaron usando un método MTT, comparando y evaluando de ese modo el efecto de inhibición del anticuerpo biespecífico de Ptmab sobre la proliferación de células de cáncer N-87.

Las células N-87 se cultivaron por adherencia en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10000 células/pocillo, a 37°C durante 16 h. Las muestras de diversas concentraciones se prepararon respectivamente usando un medio de ensayo (medio RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 1%): una concentración máxima fue de 10 µg/ml-0,0015 µg/m, y se diluyó tres veces, incluyendo 9 concentraciones en total. Se añadieron muestras de 150 µl en cada pocillo celular, y 72 h más tarde se midió la vitalidad celular con un kit CKK-8 (DOJNDO). La vitalidad celular obtenida se representó gráficamente frente a los valores logarítmicos de concentraciones de muestra, y las curvas de destrucción celular de la muestra (anticuerpo biespecífico de Ptmab) y la referencia (combinación de Trastuzumab y Trastuzumab+Pertuzumab) se obtuvieron mediante ajuste usando el método de cuatro parámetros.

Como se muestra en la figura 19, KN026 y Trastuzumab, así como la combinación de Trastuzumab+Pertuzumab tienen todos un claro efecto destructor sobre N-87, y este efecto destructor era dependiente de la concentración. Sin embargo, a alta concentración, el efecto de inhibición del anticuerpo biespecífico sobre N-87 es claramente superior al de Trastuzumab solo o a la combinación de Pertuzumab y Trastuzumab.

Ejemplo 10 Evaluación de la estabilidad térmica de anticuerpo biespecífico de Ptmab

1. Medición del valor de Tm del anticuerpo biespecífico de Ptmab

Los valores de Tm de un anticuerpo biespecífico de Ptmab KN026 y un anticuerpo de referencia (se usó Trastuzumab como muestra de referencia en el presente documento) se midieron mediante el método DSC (calorímetro de barrido diferencial) y, en consecuencia, se determinó preliminarmente la estabilidad térmica del anticuerpo biespecífico de Ptmab.

Las proteínas de muestra se prepararon a una concentración de 2 µg/ml en un tampón de 1 x PBS (pH 7,4). Las capacidades caloríficas específicas (Cp) de las muestras o tampón en blanco se barrieron a una velocidad de 60°C/h, empezando desde 10°C. Los resultados del tampón correspondiente se dedujeron a partir de los resultados obtenidos para las muestras, los valores de Cp obtenidos se representaron gráficamente frente a la temperatura, en donde la temperatura correspondiente al valor de pico con aumento claro de Cp es la Tm de la muestra.

Como se muestra en la figura 20, similar a un anticuerpo tradicional, tanto el anticuerpo biespecífico de Ptmab KN026 como la muestra de referencia de Trastuzumab mostraron claramente dos valores de Tm, incluyendo una temperatura de desensamblaje de CH2 a aproximadamente 60°C y una temperatura de desensamblaje de CH3 a aproximadamente 80°C. Mientras tanto, puede observarse que, para el valor de Tm a aproximadamente 60°C, no hubo diferencia significativa entre el anticuerpo biespecífico y la referencia de Trastuzumab; para el valor de Tm a aproximadamente

80°C, el anticuerpo biespecífico es ligeramente inferior, pero sigue siendo superior a la de 80°C, y la diferencia con el de la referencia no fue significativa, por tanto, no se considerará que afecte a la estabilidad térmica del anticuerpo.

Ejemplo 11 Experimento farmacocinético en ratones usando anticuerpo biespecífico de Ptmb

1. Examen del metabolismo de anticuerpos biespecíficos de Ptmb en ratones

Se seleccionaron ratones de 6 a 7 semanas de edad, y se dividieron en dos grupos de manera aleatoria. Al grupo experimental se le inyectó por vía intraperitoneal 10 mg/kg de anticuerpo biespecífico de Ptmb KN026, y al grupo de referencia se le inyectó por vía intraperitoneal 10 mg/kg de muestra de referencia de Trastuzumab. Cada grupo se dividió en tres subgrupos, y se tomaron muestras de sangre de cuatro animales en cada subgrupo en diferentes momentos. Durante el experimento, en cada momento (5 min-96 h), se tomaron 0,2 ml de sangre del plexo venoso orbital de cada animal; en el punto final (192 h-576 h), se tomaron muestras de sangre de la vena cava inferior después de la eutanasia de los ratones con anestesia por inhalación de isoflurano. Después de que se recogieran las muestras de sangre, se separaron los sueros y se almacenaron temporalmente a -80°C.

Para las muestras de suero, se examinó la concentración sanguínea de los fármacos usando ELISA específica de Tmb y Ptmb, la cantidad detectada de los anticuerpos en los sueros se representó gráficamente frente al tiempo de muestreo para obtener curvas farmacocinéticas del anticuerpo biespecífico (KN026) y el anticuerpo de referencia (Trastuzumab) (véase la figura 21), y los parámetros farmacocinéticos correspondientes se calcularon adicionalmente (tabla 7). Como puede observarse, la semivida del anticuerpo biespecífico de Ptmb (KN026) en ratones fue ligeramente inferior a la del Trastuzumab, pero aún mayor a 10 días, y similar a la semivida de la mayoría de los anticuerpos monoclonales en ratones, por tanto, puede concluirse que la estabilidad de Ptmb en ratones es similar a la de los anticuerpos monoclonales convencionales.

Tabla 7 Parámetros farmacocinéticos de KN026 y Trastuzumab

	$t_{1/2}$	$T_{m\acute{a}x}$	$C_{m\acute{a}x}$	AUC_{last}	AUC_{INF_obs}	V_d	C_l	MRT
Muestra	h	h	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\text{h} \cdot \text{mg}/\text{ml}$	$\text{h} \cdot \text{mg}/\text{ml}$	ml/kg	$\text{ml}/\text{h}/\text{kg}$	h
Ref.	288,15	24	95,40	25,57	33,51	124,05	0,30	208,55
KN026	259,23	8	83,63	18,48	23,33	160,29	0,43	203,23

Ejemplo 12 Efectos farmacodinámicos del anticuerpo biespecífico de Ptmb en el modelo de xenoinjerto de ratón atímico de cáncer de ovario humano SKOV3

Los ratones atímicos Balb/c se vacunaron por vía subcutánea con células SKOV3 de cáncer de ovario humano a una dosificación de 5×10^6 células+matrigel/ratón al 50%, y los ratones con tumor se agruparon aleatoriamente con 6 ratones en cada grupo (la mitad de ellos eran machos y la otra mitad hembras). Cuando el tumor creció a un volumen de aproximadamente $100\text{-}150 \text{ mm}^3$, se inyectó un fármaco inhibidor de tumor mediante administración intraperitoneal dos veces cada semana durante dos semanas consecutivas. El tamaño del tumor se midió dos veces cada semana. Se administraron 20 mg/kg de anticuerpo biespecífico de Ptmb KN026 al grupo experimental cada vez, se administraron 20 mg/kg de muestra de referencia de Trastuzumab o muestra de referencia de Pertuzumab al grupo de referencia cada vez, y el mismo volumen de tampón de PBS se administró a un grupo de control en blanco cada vez.

Como se muestra en la figura 22, comparando con el grupo control en blanco, tanto el grupo experimental como el grupo de referencia mostraron algún efecto de inhibición de tumor sobre el modelo de xenoinjerto de ratón atímico SKOV3, donde el anticuerpo biespecífico de Ptmb mostró un efecto de inhibición de tumor más fuerte que el de la muestra de referencia de Trastuzumab solo o la muestra de referencia de Pertuzumab solo.

Ejemplo 13 Efecto farmacodinámico del anticuerpo biespecífico de Ptmb sobre el modelo de xenoinjerto de ratón atímico N-87 de cáncer gástrico humano

Los ratones atímicos Balb/c se inocularon por vía subcutánea con células N-87 de cáncer gástrico humano a una dosis de 4×10^6 células/ratón, y los ratones con tumor se agruparon aleatoriamente con 6 ratones en cada grupo (la mitad de ellos eran machos y la otra mitad hembras). Cuando el tumor creció a un volumen de aproximadamente $100\text{-}130 \text{ mm}^3$, se inyectó un fármaco inhibidor de tumor mediante administración IP dos veces por semana durante 4-5 semanas consecutivas. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana.

Se administró al grupo experimental cada vez con 5 mg/kg de anticuerpo biespecífico de Ptmb KN026, se administró al grupo de referencia cada vez con 5 mg/kg de muestra de referencia de Trastuzumab o muestra de referencia de Pertuzumab, y se administró un grupo control blanco con el mismo volumen de tampón de PBS.

Como se muestra en la figura 23, comparando con el grupo control en blanco, tanto el grupo experimental como el grupo de referencia mostraron algún efecto de inhibición de tumor sobre el modelo de xenoinjerto de ratón atímico N-

87, donde el anticuerpo biespecífico de Ptmap mostró un efecto de inhibición de tumor claramente superior al que de la muestra de referencia de Trastuzumab solo o de la muestra de referencia de Pertuzumab solo.

5 Ejemplo 14 Efecto farmacodinámico del anticuerpo biespecífico de Ptmap sobre el modelo de xenoinjerto de ratón atímico N-87 de cáncer gástrico humano

10 Se inoculó por vía subcutánea ratones atímicos Balb/c con células de cáncer gástrico humano N-87 a una dosificación de 4×10^6 células/ratón, y los ratones con tumor se agruparon aleatoriamente con 6 ratones en cada grupo (la mitad de ellos eran machos y la otra mitad hembras). Cuando el tumor creció a un volumen de aproximadamente $100-120 \text{ mm}^3$, se inyectó un fármaco inhibidor de tumor mediante administración IP dos veces cada semana durante tres semanas consecutivas. El tamaño de tumor se midió dos veces cada semana.

15 Se administraron 2,5 mg/kg de anticuerpo biespecífico de PTmap KN026 al grupo experimental, se administró 2,5 mg/kg de la combinación de muestra de referencia de Trastuzumab y muestra de referencia de Pertuzumab al grupo de referencia cada vez, y el mismo volumen de tampón de PBS se administró a un grupo de control en blanco cada vez.

20 Como se muestra en la figura 24, comparando con el grupo de control en blanco, tanto el grupo experimental como el grupo de referencia mostraron algún efecto de inhibición de tumor sobre el modelo de xenoinjerto de ratón atímico N-87, donde el anticuerpo biespecífico de PTmap mostró un efecto de inhibición de tumor más fuerte que la combinación de la muestra de referencia de Trastuzumab y la muestra de referencia de Pertuzumab administrada en una igual cantidad molar.

25 Ejemplo 15 Dependencia de dosificación de anticuerpo biespecífico de PTmap en el modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H522 con cáncer de pulmón de células no pequeñas humano con infraexpresión de HER2

30 Los ratones de inmunodeficiencia NOD/SCID se inocularon por vía subcutánea con la mezcla de células no pequeñas de cáncer de pulmón NCI-H522 y matrigel (la relación de las células con respecto al matrigel fue 1:1) para establecer el modelo, la dosificación de inoculación fue 5×10^6 células/ratón, y los ratones con tumor se agruparon aleatoriamente con 6 ratones en cada grupo (la mitad de ellos eran machos y la otra mitad hembras). Cuando el tumor creció a un volumen de aproximadamente 100 mm^3 , se inyectó un fármaco de inhibición de tumor. El día en el que la administración IP (intraperitoneal) se realizó por primera vez se etiquetó como día 0. Luego, la administración IP se realizó una vez cada semana durante 7 semanas consecutivas, y la concentración de los fármacos administrados se redujo a la mitad (en comparación con la concentración usada en la primera administración). El tamaño del tumor se midió dos veces por semana.

40 El grupo experimental se dividió en tres subgrupos que se administraron con anticuerpo biespecífico de PTmap KN026 según las siguientes dosificaciones respectivamente: se administraron 30 mg/kg por primera vez y, posteriormente, se administraron 15 mg/kg cada vez cada semana; se administraron 10 mg/kg por primera vez y, posteriormente, se administraron 5 mg/kg cada vez cada semana; se administraron 3 mg/kg por primera vez y, posteriormente, se administraron 1,5 mg/kg cada vez cada semana. El grupo de control en blanco se administró con el mismo volumen de tampón de PBS cada vez.

45 Como se muestra en la figura 27, en comparación con el grupo de control en blanco, los tres grupos experimentales mostraron claros efectos de inhibición de tumor sobre el modelo de xenoinjerto de ratones NCI-H522, y este efecto fue dependiente de la dosificación.

50 Ejemplo 16 Efecto farmacodinámico de anticuerpo biespecífico de PTmap sobre modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H522 con cáncer de pulmón de células no pequeñas con infraexpresión de HER2

55 Se inocularon por vía subcutánea ratones de inmunodeficiencia NOD/SCID con la mezcla de células NCI-H522 de cáncer de pulmón de células no pequeñas y matrigel (la relación de las células con respecto al matrigel fue 1:1) para establecer un modelo, la dosificación de inoculación fue 5×10^6 células/ratón, y los ratones con tumor se agruparon aleatoriamente con 6 ratones en cada grupo (la mitad de ellos eran machos y la otra mitad hembras). Cuando el tumor creció a un volumen de aproximadamente 100 mm^3 , se inyectó un fármaco de inhibición de tumor. El día en el que la administración IP (intraperitoneal) se realizó por primera vez se etiquetó como día 0, y la dosis administrada fue de 5 mg/kg. Luego, la administración IP se realizó una vez por semana y la concentración de los fármacos administrados fue la mitad de la administrada por primera vez, en concreto 2,5 mg/kg. La administración IP se realizó durante 7 semanas consecutivas. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana.

60 El grupo experimental se administró con anticuerpo biespecífico de PTmap KN026, el grupo de referencia se administró con la combinación de una muestra de referencia de Trastuzumab y una muestra de referencia de Pertuzumab, cada fármaco se administró según la dosificación mencionada anteriormente, en concreto se administraron 5 mgP+5 mgT/kg por primera vez, posteriormente, se administraron 2,5 mgP+2,5 mgT/kg cada vez cada semana, y se administró el grupo de control en blanco con el mismo volumen de tampón de PBS cada vez.

65

Como se muestra en la figura 28, en comparación con el grupo de control en blanco, tanto el grupo experimental como el grupo de referencia mostraron un claro efecto de inhibición de tumor sobre el modelo de xenoinjerto de ratones NCI-H522. Mientras tanto, el anticuerpo biespecífico de Ptmab administrado solo tuvo un efecto de inhibición comparable al de la muestra de referencia de Trastuzumab y la combinación de muestra de referencia de Pertuzumab.

5

Lista de secuencias

<110> SUZHOU ALPHAMAB CO., LTD

<120> ANTICUERPO BIESPECÍFICO O MEZCLA DE ANTICUERPOS CON CADENAS LIGERAS COMUNES

10 <130> IEC150074PCT

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<400> 2

ES 2 811 267 T3

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

- 5 <210> 3
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <400> 3

10

ES 2 811 267 T3

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

<210> 4
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Ile Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

10

ES 2 811 267 T3

<210> 5
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 5

5

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

<210> 6
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 6

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 Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

15

ES 2 811 267 T3

	gacatccaga	tgacccagag	ccccagcagc	ctgagcgcca	gcgtgggcga	ccgcgtgacc	60
	atcacctgcc	gcgccagcca	ggacgtgaac	actgccgttg	catggtacca	gcagaagccc	120
	ggcaaggccc	ccaagctgct	gatctacagc	gccagcttcc	tgtacagcgg	cgtgcccagc	180
	cgcttcagcg	gcagccgcag	cggcaccgac	ttcaccctga	ccatcagcag	cctgcagccc	240
	gaggacttcg	ccacctacta	ctgccagcag	cactatactt	atcctccaac	attcggccag	300
	ggcaccaagg	tggagatcaa	gcgcaccgtg	gccgccccca	gcgtgttcat	cttccccccc	360
	agcgacgagc	agctcaagag	cggcaccgcc	agcgtggtgt	gcctgctgaa	caacttctac	420
	ccccgcgagg	ccaaggtgca	gtggaaggtg	gacaacgccc	tgacagcggg	caacagccag	480
	gagagcgtga	ccgagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctgagcag	caccctgacc	540
	ctgagcaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct	gcgaggtgac	ccaccagggc	600
5	ctgagcagcc	ccgtgaccaa	gagcttcaac	cgcggcgagt	gc		642
	<210> 10						
	<211> 642						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
10	<400> 10						
	gacatccaga	tgacccagag	ccccagcagc	ctgagcgcca	gcgtgggcga	ccgcgtgacc	60
	atcacctgcc	gcgccagcca	ggacgtgaac	attgccgttg	catggtacca	gcagaagccc	120
	ggcaaggccc	ccaagctgct	gatctacagc	gccagcttcc	tgtacagcgg	cgtgcccagc	180
	cgcttcagcg	gcagccgcag	cggcaccgac	ttcaccctga	ccatcagcag	cctgcagccc	240
	gaggacttcg	ccacctacta	ctgccagcag	cactatactt	atcctccaac	attcggccag	300
	ggcaccaagg	tggagatcaa	gcgcaccgtg	gccgccccca	gcgtgttcat	cttccccccc	360
	agcgacgagc	agctcaagag	cggcaccgcc	agcgtggtgt	gcctgctgaa	caacttctac	420
	ccccgcgagg	ccaaggtgca	gtggaaggtg	gacaacgccc	tgacagcggg	caacagccag	480
	gagagcgtga	ccgagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctgagcag	caccctgacc	540
	ctgagcaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct	gcgaggtgac	ccaccagggc	600
	ctgagcagcc	ccgtgaccaa	gagcttcaac	cgcggcgagt	gc		642
	<210> 11						
15	<211> 642						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<400> 11						
	gacatccaga	tgacccagag	ccccagcagc	ctgagcgcca	gcgtgggcga	ccgcgtgacc	60
	atcacctgca	aggccagcca	ggacgtgagc	atcggcgttg	cctggtacca	gcagaagccc	120
	ggcaaggccc	ccaagctgct	gatctacagc	gccagctacc	gctacaccgg	cgtgcccagc	180
	cgcttcagcg	gcagcggcag	cggcaccgac	ttcaccctga	ccatcagcag	cctgcagccc	240
	gaggacttcg	ccacctacta	ctgccagcag	tactacatct	accctacac	cttcggccag	300
	ggcaccaagg	tggagatcaa	gcgcaccgtg	gccgccccca	gcgtgttcat	cttccccccc	360
	agcgacgagc	agctcaagag	cggcaccgcc	agcgtggtgt	gcctgctgaa	caacttctac	420
	ccccgcgagg	ccaaggtgca	gtggaaggtg	gacaacgccc	tgacagcggg	caacagccag	480
	gagagcgtga	ccgagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctgagcag	caccctgacc	540
	ctgagcaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct	gcgaggtgac	ccaccagggc	600
20	ctgagcagcc	ccgtgaccaa	gagcttcaac	cgcggcgagt	gc		642
	<210> 12						
	<211> 642						
	<212> ADN						
25	<213> Secuencia artificial						
	<400> 12						

ES 2 811 267 T3

gacatccaga	tgacccagag	ccccagcagc	ctgagcgcca	gcgtgggcga	ccgcgtgacc	60
atcacctgca	aggccagcca	ggacgtgagc	atcggcgtgg	cctggtacca	gcagaagccc	120
ggcaaggccc	ccaagctgct	gatctacagc	gccagctacc	gctacaccgg	cgtgcccagc	180
cgcttcagcg	gcagcggcag	cggcaccgac	ttcaccctga	ccatcagcag	cctgcagccc	240
gaggacttcg	ccacctacta	ctgccagcag	tactacatca	ccccctacac	cttcggccag	300
ggcaccaagg	tggagatcaa	gcgcaccgtg	gccgccccca	gcgtgttcat	cttccccccc	360
agcgacgagc	agctcaagag	cggcaccgcc	agcgtggtgt	gcctgctgaa	caacttctac	420
ccccgcgagg	ccaaggtgca	gtggaaggtg	gacaacgccc	tgagagcgg	caacagccag	480
gagagcgtga	ccgagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctgagcag	caccctgacc	540
ctgagcaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct	gcgaggtgac	ccaccagggc	600
ctgagcagcc	ccgtgaccaa	gagcttcaac	cgcggcgagt	gc		642

<210> 13

<211> 630

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 13

ES 2 811 267 T3

Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln
 20 25 30
 Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser
 35 40 45
 Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile
 50 55 60
 Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val
 65 70 75 80
 Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp
 85 90 95
 Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro
 100 105 110
 Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
 115 120 125
 Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr
 130 135 140
 Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met
 165 170 175
 Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser
 180 185 190
 Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro
 195 200 205
 Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 210 215 220
 Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
 225 230 235 240
 Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr
 245 250 255
 Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser
 260 265 270
 Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ala
 275 280 285
 Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu Ala Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp
 290 295 300
 Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys
 305 310 315 320
 Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser
 325 330 335
 Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu
 340 345 350
 Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala
 355 360 365
 Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile
 370 375 380
 Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn
 405 410 415
 Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly
 420 425 430
 Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His
 435 440 445
 Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe
 450 455 460
 Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp
 465 470 475 480

ES 2 811 267 T3

Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly
 485 490 495
 His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe
 500 505 510
 Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu
 515 520 525
 Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu
 530 535 540
 Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp
 545 550 555 560
 Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala
 565 570 575
 Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp
 580 585 590
 Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 595 600 605
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln
 610 615 620
 Arg Ala Ser Pro Leu Thr
 625 630

<210> 14
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 14

5

ES 2 811 267 T3

Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln
 20 25 30
 Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser
 35 40 45
 Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile
 50 55 60
 Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val
 65 70 75 80
 Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp
 85 90 95
 Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro
 100 105 110
 Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
 115 120 125
 Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr
 130 135 140
 Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met
 165 170 175
 Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser
 180 185 190
 Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro
 195 200 205
 Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 210 215 220
 Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
 225 230 235 240
 Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr
 245 250 255
 Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser
 260 265 270
 Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser
 275 280 285
 Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp

ES 2 811 267 T3

290						295						300					
Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys	Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys		
305					310					315					320		
Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser		
				325					330					335			
Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu		
			340					345					350				
Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp	Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala		
		355					360					365					
Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile		
	370					375					380						
Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro	Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu		
385					390					395					400		
Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn		
				405					410					415			
Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly		
			420					425					430				
Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	His	His		
		435					440					445					
Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val	Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe		
	450					455					460						
Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr	Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp		
465					470					475					480		
Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His	Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly		
				485					490					495			
His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys	Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe		
			500					505					510				
Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu		
		515					520					525					
Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu		
	530					535					540						
Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys	Phe	Gly	Pro	Ala	Ala	Asp		
545					550					555					560		
Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp	Pro	Ala	Phe	Cys	Val	Ala		
				565					570					575			
Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp		
			580					585					590				
Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys		
		595					600					605					
Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu	Gln		
	610					615					620						
Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr												
625					630												

<210> 15
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 15

5

ES 2 811 267 T3

Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser
1				5					10					15	
Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln
			20				25						30		
Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser
		35					40					45			
Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile
	50					55					60				
Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val
65					70						75				80
Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp
				85					90					95	
Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro
			100					105					110		

Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
 115 120 125
 Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr
 130 135 140
 Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met
 165 170 175
 Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser
 180 185 190
 Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro
 195 200 205
 Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 210 215 220
 Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
 225 230 235 240
 Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr
 245 250 255
 Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser
 260 265 270
 Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser
 275 280 285
 Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp
 290 295 300
 Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys
 305 310 315 320
 Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser
 325 330 335
 Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu
 340 345 350
 Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala
 355 360 365
 Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile
 370 375 380
 Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn
 405 410 415
 Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly
 420 425 430
 Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His
 435 440 445
 Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe
 450 455 460
 Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp
 465 470 475 480
 Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly
 485 490 495
 His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe
 500 505 510
 Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu
 515 520 525
 Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu
 530 535 540
 Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp
 545 550 555 560
 Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Ala Ala Phe Cys Val Ala
 565 570 575
 Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp
 580 585 590
 Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 595 600 605
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln

ES 2 811 267 T3

610
Arg Ala Ser Pro Leu Thr
625 630

620

5
<210> 16
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<400> 16

gaggtgcagc	tcgtggagag	cggcggcggc	ctggtgcagc	ccggcggcag	cctgcgcctg	60
agctgcgccg	ccagcggctt	caacatcaag	gacacctaca	tccactgggt	gcgccaggcc	120
cccggcaagg	gcctggagtg	ggtggcccgc	atctaccca	ccaacggcta	cacccgctac	180
gccgacagcg	tgaagggccg	cttcaccatc	agcgcgcgaca	ccagcaagaa	caccgcctac	240
ctgcagatga	acagcctgcg	cgccgaggac	accgccgtgt	actactgcag	ccgctggggc	300
ggcgacggct	tctacgccat	ggactactgg	ggccagggca	ccctggtgac	cgtgagcagc	360
gccagacca	agggccccag	cgtgttcccc	ctggccccc	gcagcaagag	caccagcggc	420
ggcaccgccg	ccctgggctg	cctggtgaag	gactacttcc	ccgagcccgt	gaccgtgagc	480
tggaacagcg	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	ccgccgtgct	gcagagcagc	540
ggcctgtaca	gcctgagcag	cgtggtgacc	gtgccagca	gcagcctggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaacca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	ggtggagccc	660
aagagctgcg	acaagaccca	cacctgcccc	ccctgccccg	cccccgagct	gctgggcggc	720
cccagcgtgt	tcctgttccc	cccccaagccc	aaggacaccc	tgatgatcag	ccgcaccccc	780
gaggtgacct	gcgtggtggt	ggacgtgagc	cacgaggacc	ccgaggtgaa	gttcaactgg	840
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcacaacgcc	aagaccaagc	cccgcgagga	gcagtacaac	900
agcacctacc	gcgtggtgag	cgtgctgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaag	960
gagtacaagt	gcaaggtgag	caacaaggcc	ctgcccgcc	ccatcgagaa	gaccatcagc	1020
aaggccaagg	gccagccccg	cgagccccag	gtgtacacc	tgccccccag	ccgcgaggag	1080
atgaccaaga	accaggtgag	cctgacctgc	ctggtgaagg	gcttctaccc	cagcgacatc	1140
gccgtggagt	gggagagcaa	cggccagccc	gagaacaact	acaagaccac	cccccccgctg	1200
ctggacagcg	acggcagctt	cttcctgtac	agcaagctga	ccgtggacaa	gagccgctgg	1260
cagcagggca	acgtgttctc	gtgcagcgtg	atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	1320
cagaagagcc	tgagcctgag	ccccggcaag				1350

10
<210> 17
<211> 1347
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <400> 17

ES 2 811 267 T3

```

gaggtgcagc tcgtggagag cggcggcggc ctggtgcagc cggcggcag cctgcgccctg      60
agctgcgccg ccagcggcctt caccttcacc gactacacca tggactgggt gcgccaggcc      120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggccgac gtgaaccca acagcggcgg cagcatctac      180
aaccagcgct tcaagggccg cttcaccctg agcgtggacc gcagcaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcaacctg      300
ggccccagct tctacttcga ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagcgcc      360
agcaccaagg gccccagcgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc      420
accgccgccg tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgagctgg      480
aacagcggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc      540
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggac ccagacctac      600
atctgcaacg tgaaccacaa gccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag      660
agctgcgaca agaccacac ctgccccccc tgccccgcc ccgagctgct gggcggcccc      720
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagccg ccccccgag      780
gtgacctgcg tggtggtgga cgtgagccac gaggaccccg aggtgaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaa accaagcccc gcgaggagca gtacaacagc      900
acctaccgcg tggtgagcgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag      960
tacaagtgca aggtgagcaa caaggccctg cccgccccca tcgagaagac catcagcaag     1020
gccaagggcc agccccgcga gcccaggtg tacaccctgc cccccagccg cgaggagatg     1080
accaagaacc aggtgagcct gacctgcctg gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccaccc ccccgctgctg     1200
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag ccgctggcag     1260
cagggcaacg tgttctcgtg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag     1320
aagagcctga gcctgagccc cggcaag

```

<210> 18
<211> 630
5 <212> PRT
<213> HER2-ECD
<400> 18

ES 2 811 267 T3

Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln
 20 25 30
 Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser
 35 40 45
 Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile
 50 55 60
 Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val
 65 70 75 80
 Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp
 85 90 95
 Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro
 100 105 110
 Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
 115 120 125
 Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr
 130 135 140
 Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met
 165 170 175
 Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser
 180 185 190
 Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro
 195 200 205
 Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 210 215 220
 Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
 225 230 235 240
 Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr
 245 250 255
 Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser
 260 265 270
 Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser
 275 280 285
 Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp
 290 295 300
 Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys
 305 310 315 320
 Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser
 325 330 335
 Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu
 340 345 350
 Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala
 355 360 365
 Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile
 370 375 380
 Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn
 405 410 415
 Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly
 420 425 430
 Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His
 435 440 445
 Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe
 450 455 460
 Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp

ES 2 811 267 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 20
 <211> 449
 <212> PRT

5

ES 2 811 267 T3

<213> Secuencia artificial

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu 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 Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe 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 Cys Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365
Cys Ala 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 Val 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

5 Lys

<210> 21
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 21

5

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20          25          30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100         105         110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115         120         125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130         135         140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145         150         155         160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165         170         175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180         185         190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195         200         205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210         215         220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225         230         235         240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245         250         255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
    
```

ES 2 811 267 T3

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

<210> 22
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 22

5

ES 2 811 267 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu 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 Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe 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 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 Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp 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> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<400> 23

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20          25          30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100         105         110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

5 <210> 24
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 24

10

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20          25          30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu 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 Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100         105         110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

15 <210> 25
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 25

ES 2 811 267 T3

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

<210> 26
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 26

5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

ES 2 811 267 T3

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225

<210> 27
 <211> 227
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 27

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

10 <210> 28
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <400> 28

ES 2 811 267 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo tiene una cadena ligera común, en el que dicha cadena ligera común se refiere a dos cadenas ligeras que tienen la misma secuencia, en el que dicha cadena ligera común se ensambla con una cadena pesada de Pertuzumab o la parte de unión a antígeno de la misma y una cadena pesada de Trastuzumab o la parte de unión a antígeno de la misma para formar un anticuerpo biespecífico o un Fab, respectivamente, en condiciones fisiológicas o durante la expresión de proteína *in vitro*; y
5
- en el que la región variable de dicha cadena ligera común comprende una secuencia seleccionada de las indicadas en las posiciones de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6.
10
2. Anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que regiones variables de cadena pesada de dicho anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo son una región variable de cadena pesada de Pertuzumab y una región variable de cadena pesada de Trastuzumab, respectivamente.
15
3. Anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que regiones variables de cadena pesada de dicho anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo comprenden una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO: 23 y una secuencia tal como se indica en SEQ ID NO: 24, respectivamente.
20
4. Molécula de ácido nucleico, que codifica el anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
25
5. Vector recombinante, que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4.
30
6. Célula recombinante, que comprende el vector recombinante según la reivindicación 5 o la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4.
35
7. Método para preparar un anticuerpo biespecífico o una parte de unión a antígeno del mismo basándose en dos anticuerpos monoclonales anti-HER2 o partes de unión a antígeno del mismo contra diferentes epítomos de antígeno de HER2, comprendiendo el método la etapa de obtener una secuencia de cadena ligera común capaz de ensamblar con la cadena pesada de Pertuzumab o la parte de unión a antígeno de la misma y la cadena pesada de Trastuzumab o la parte de unión a antígeno de la misma para formar un anticuerpo biespecífico o un Fab respectivamente, basándose en secuencias de cadena ligera de los dos anticuerpos monoclonales anti-HER2,
40
- en el que la región variable de dicha cadena ligera común comprende una secuencia seleccionada de las indicadas en posiciones de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6.
45
8. Composición que comprende el anticuerpo biespecífico o la parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y opcionalmente un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
50
9. Anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del tumor HER2 positivo.
10. Anticuerpo biespecífico o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según la reivindicación 9, en el que un tumor HER2 positivo comprende cáncer de mama y/o cáncer gástrico.

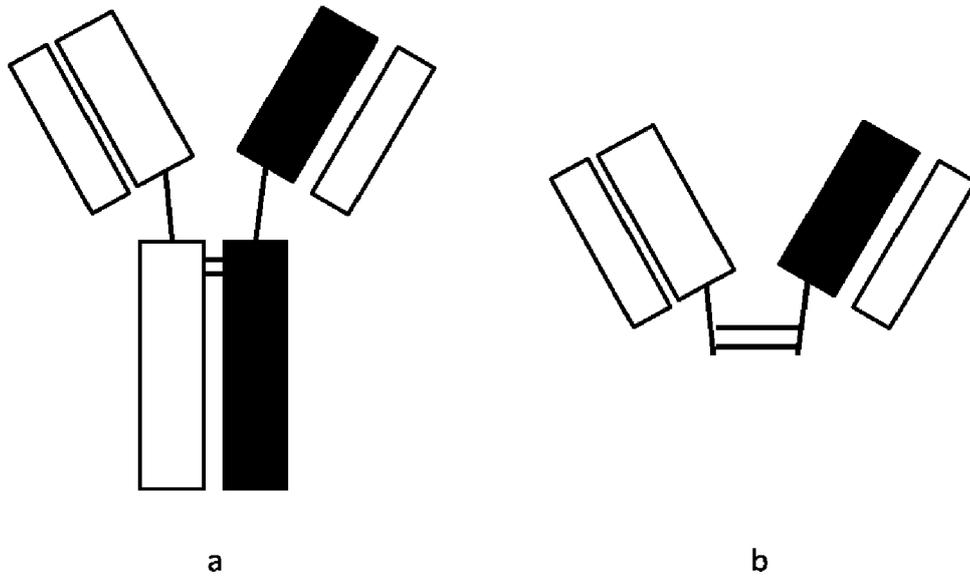


FIG. 1

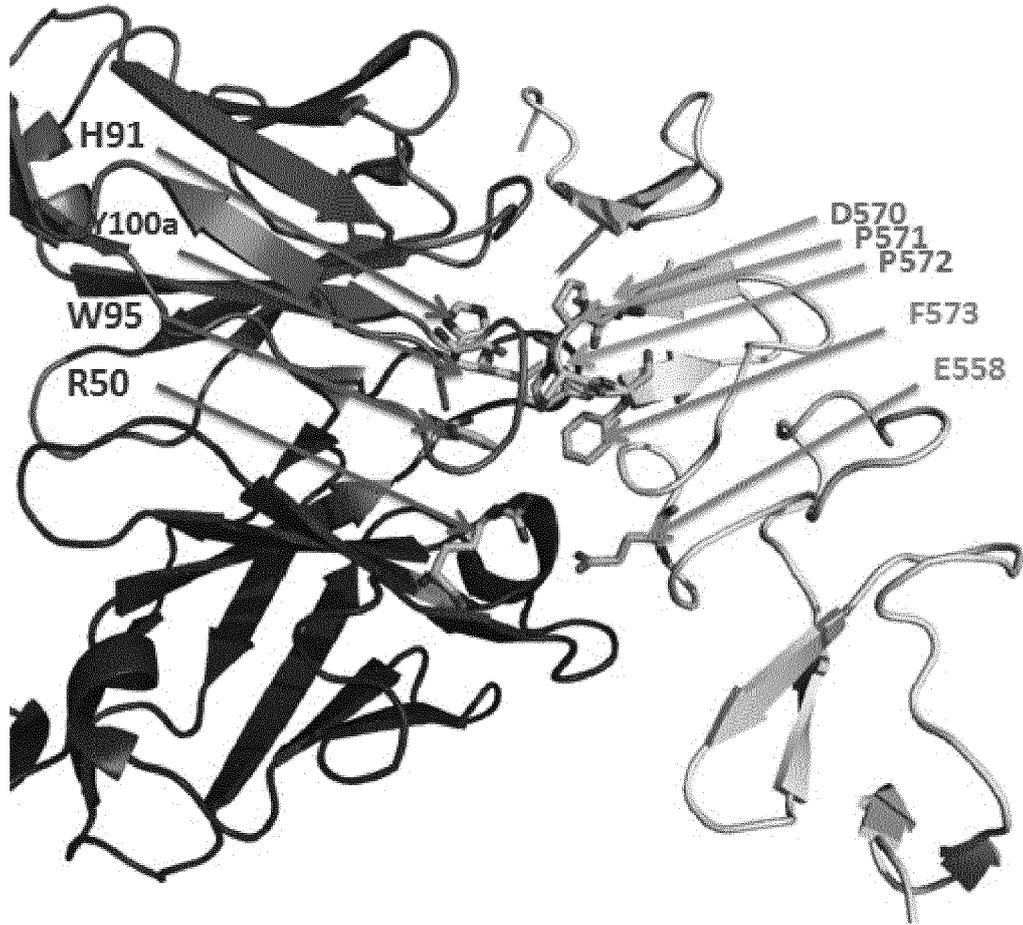


FIG. 3

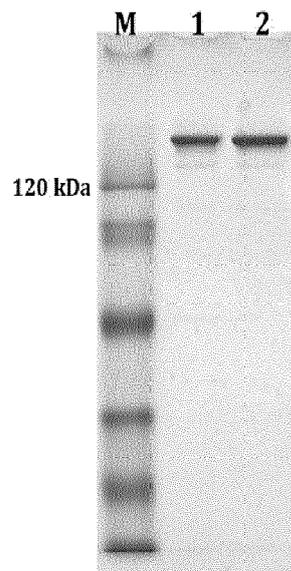
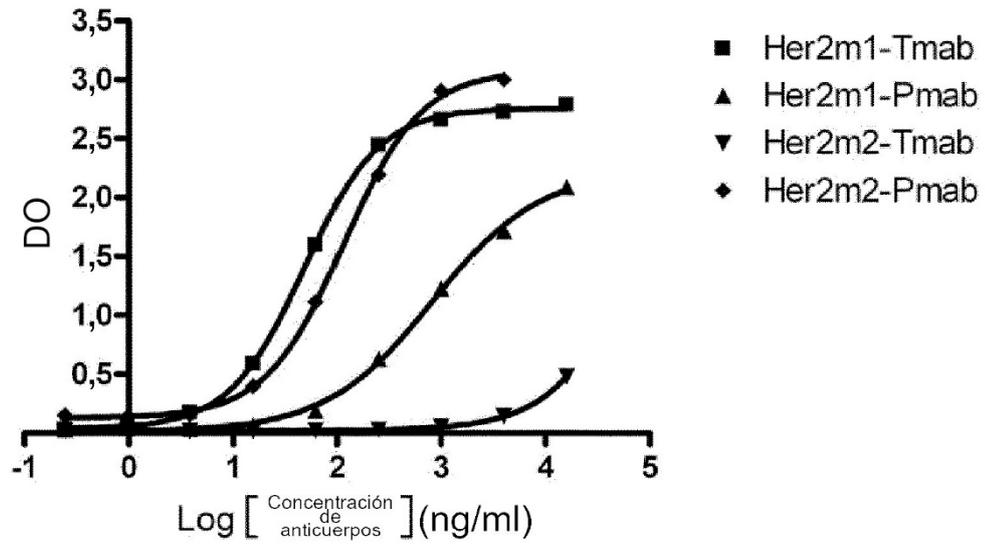


FIG. 4



	Her2m1-Tmab	Her2m1-Pmab	Her2m2-Tmab	Her2m2-Pmab
CE50	48,51	834,0	337471	115,6

FIG. 5

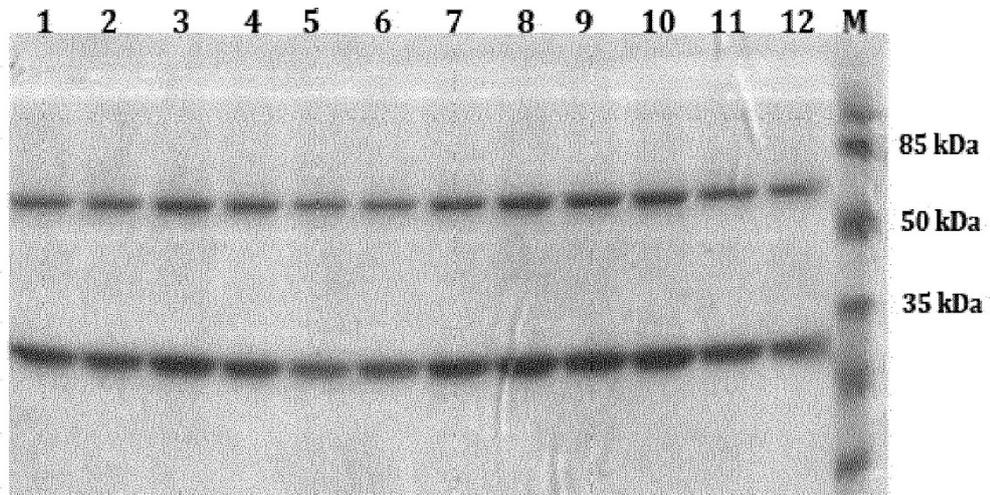
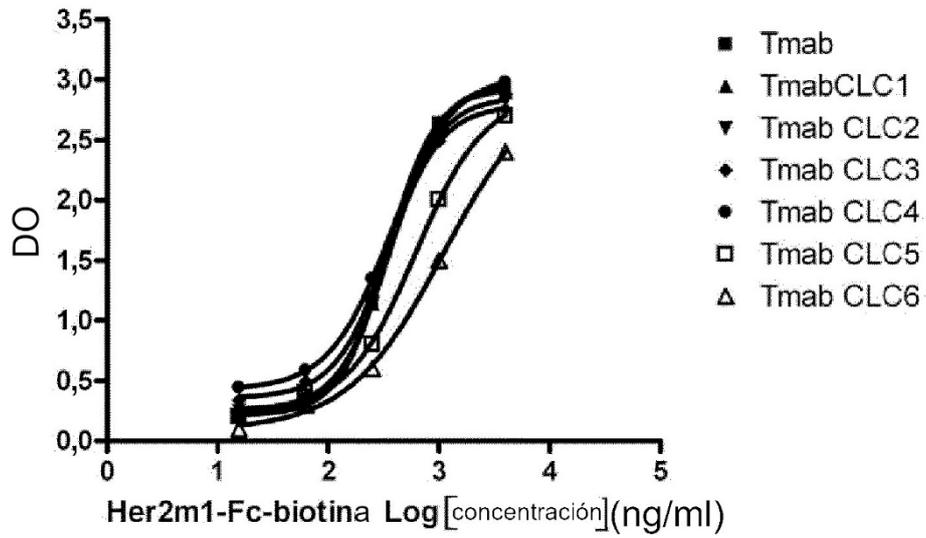
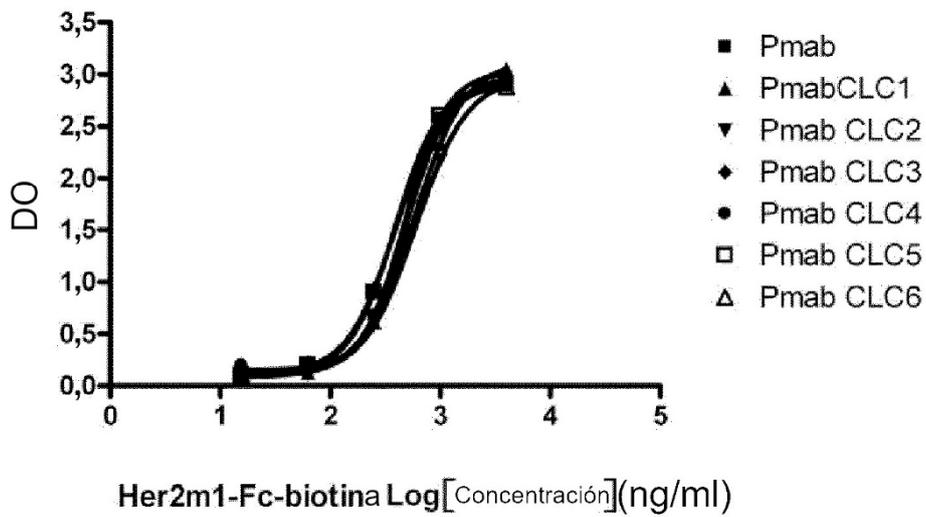


FIG. 6



	Tmab	TmabCLC1	Tmab CLC2	Tmab CLC3	Tmab CLC4	Tmab CLC5	Tmab CLC6
CE50	351,5	344,2	355,7	346,3	370,0	615,9	1105

FIG. 7



	Pmab	PmabCLC1	Pmab CLC2	Pmab CLC3	Pmab CLC4	Pmab CLC5	Pmab CLC6
CE50	389,0	577,4	598,4	489,8	479,2	388,5	393,3

FIG. 8

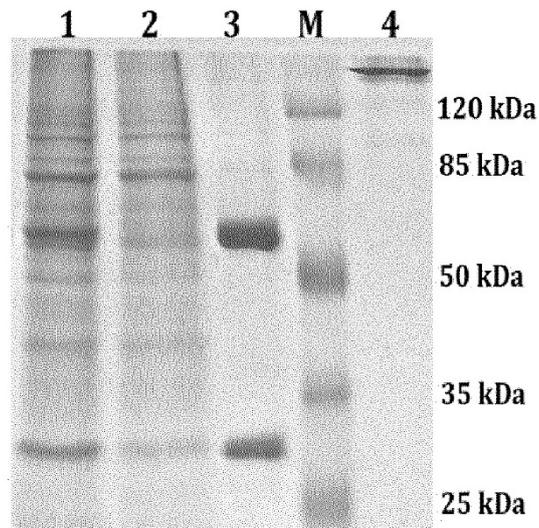


FIG. 9

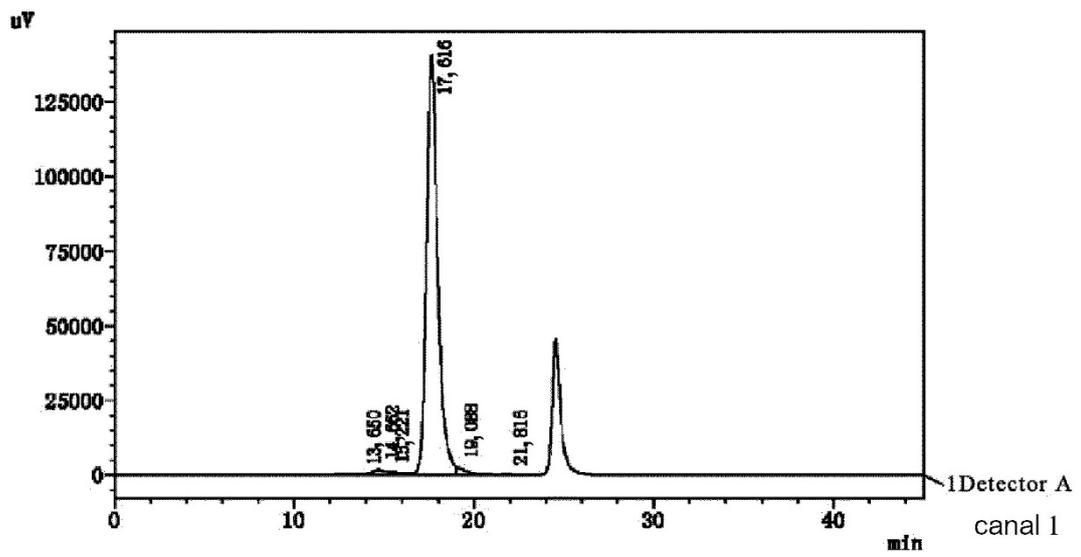


FIG. 10

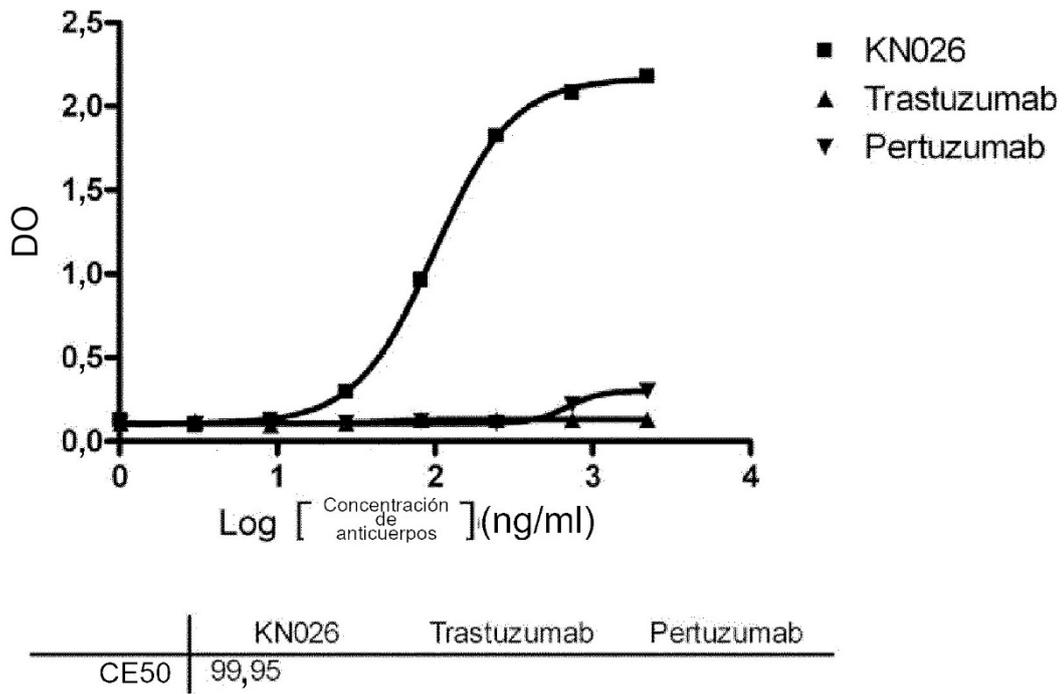


FIG. 11

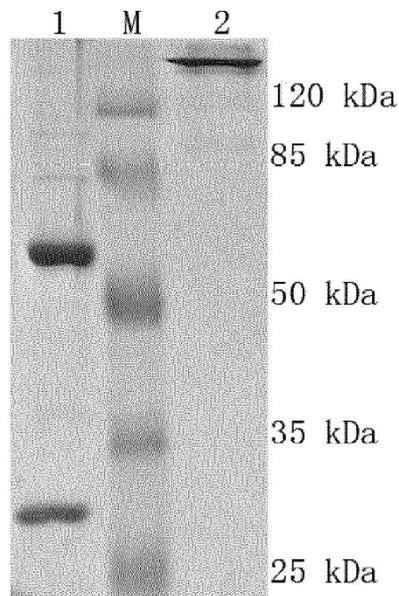


FIG. 12

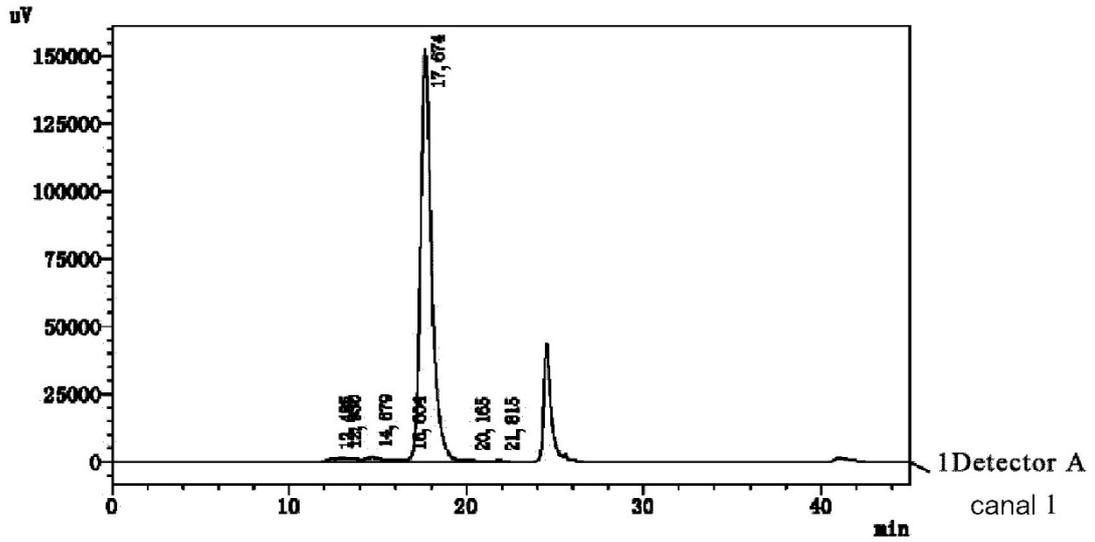


FIG. 13

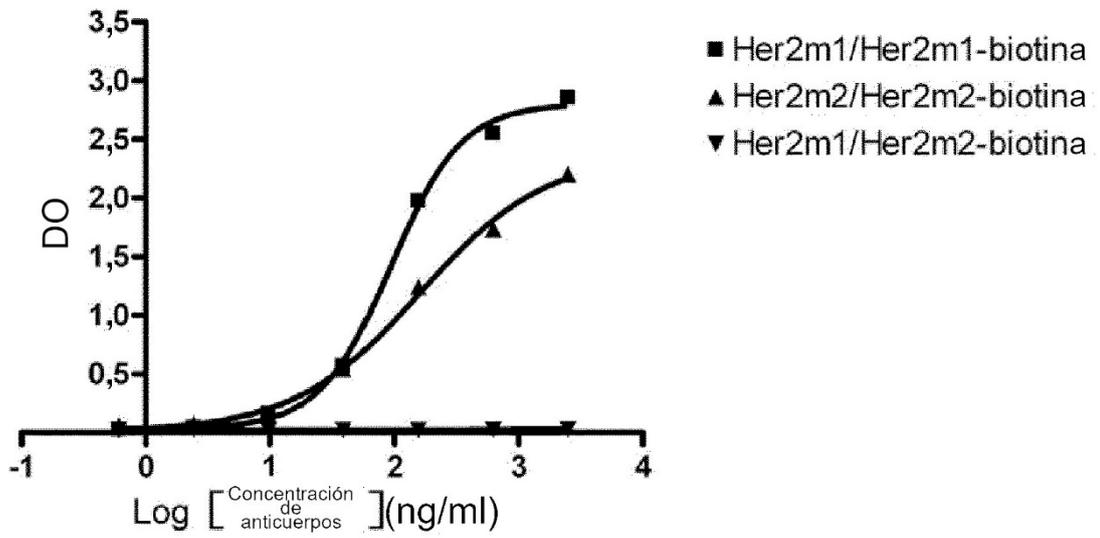


FIG. 14

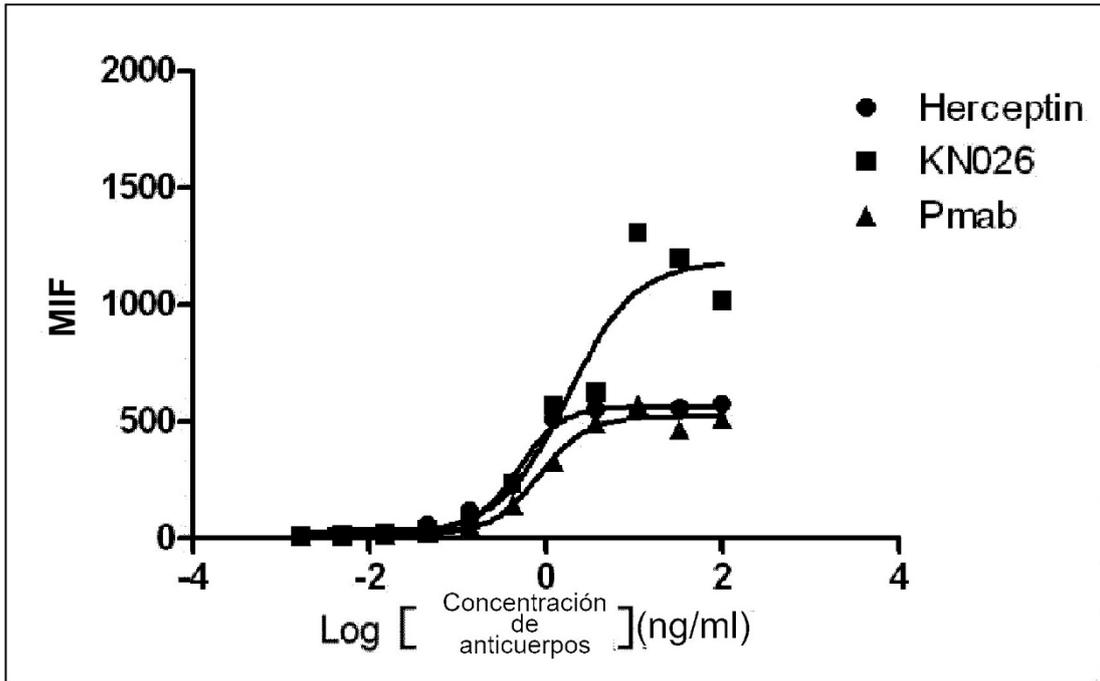


FIG. 15

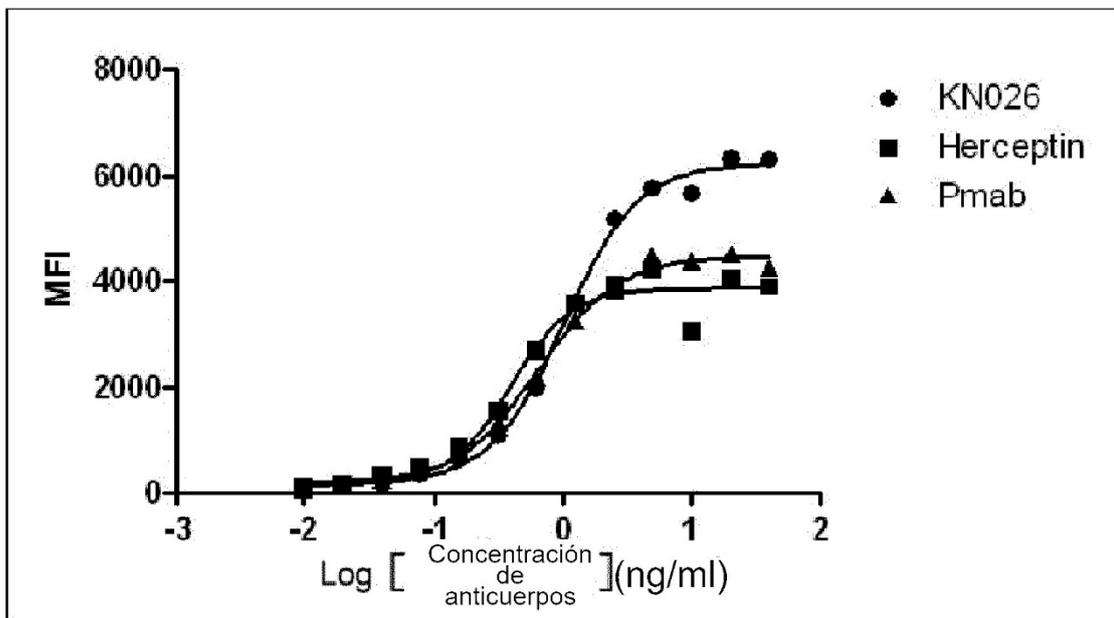


FIG. 16

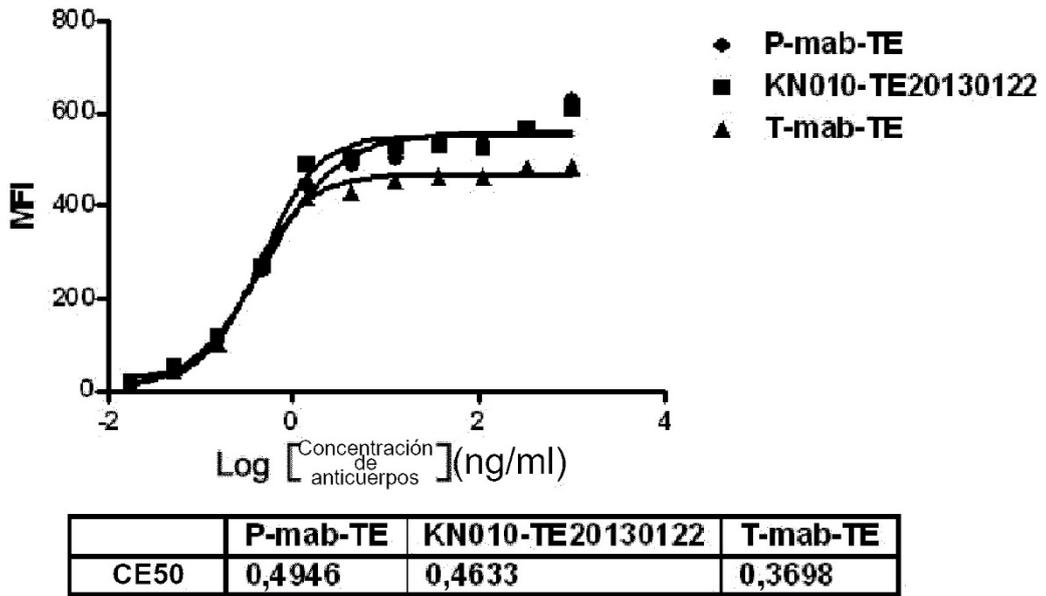


FIG. 17

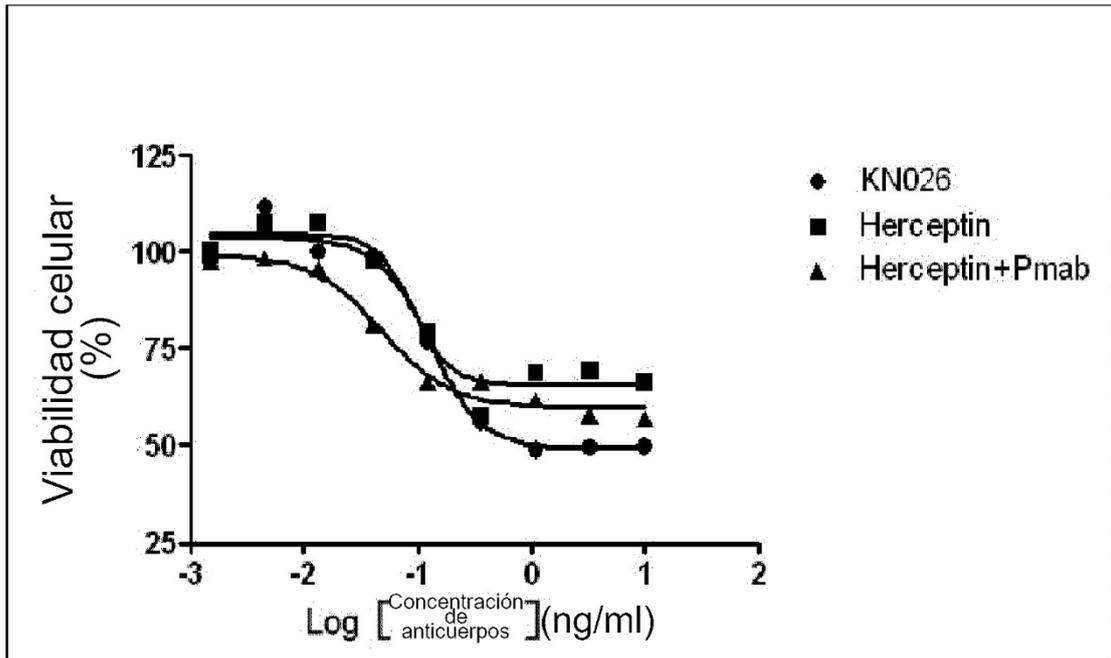


FIG. 18

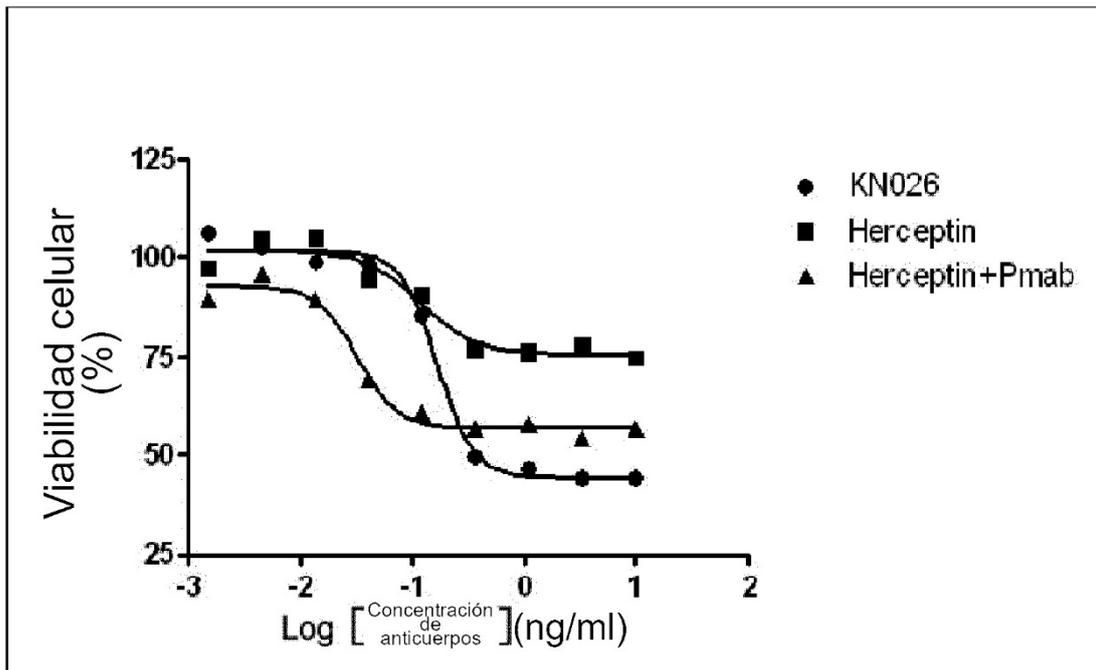


FIG. 19

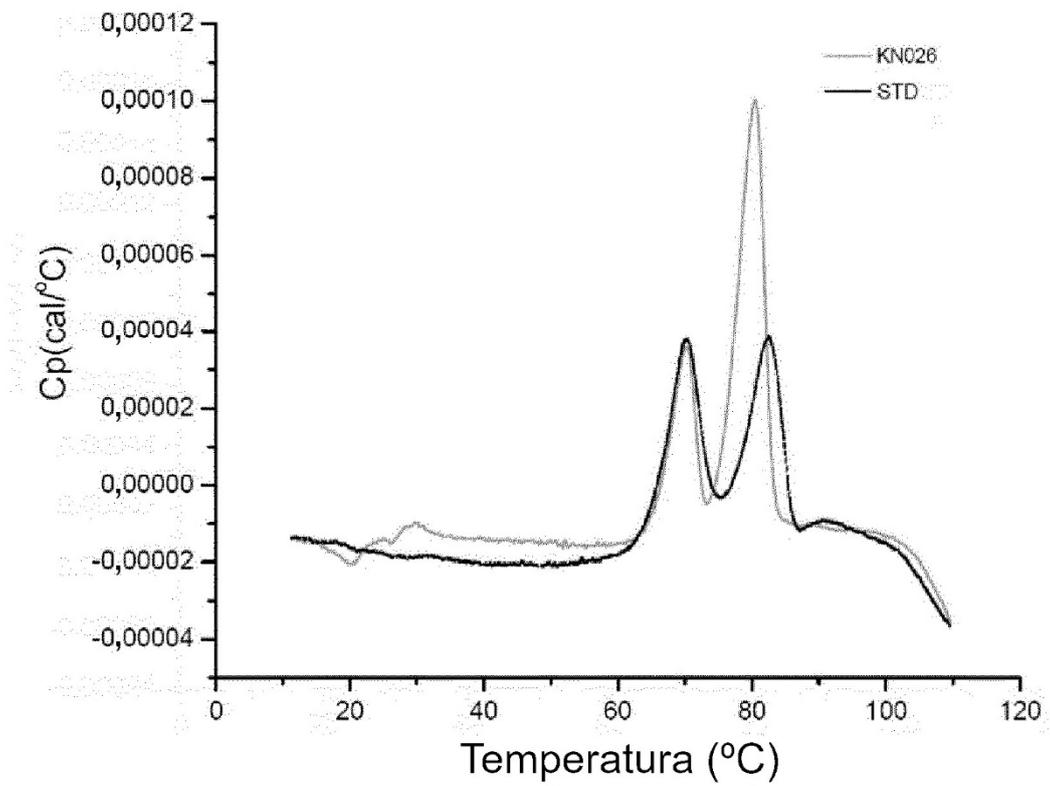


FIG. 20

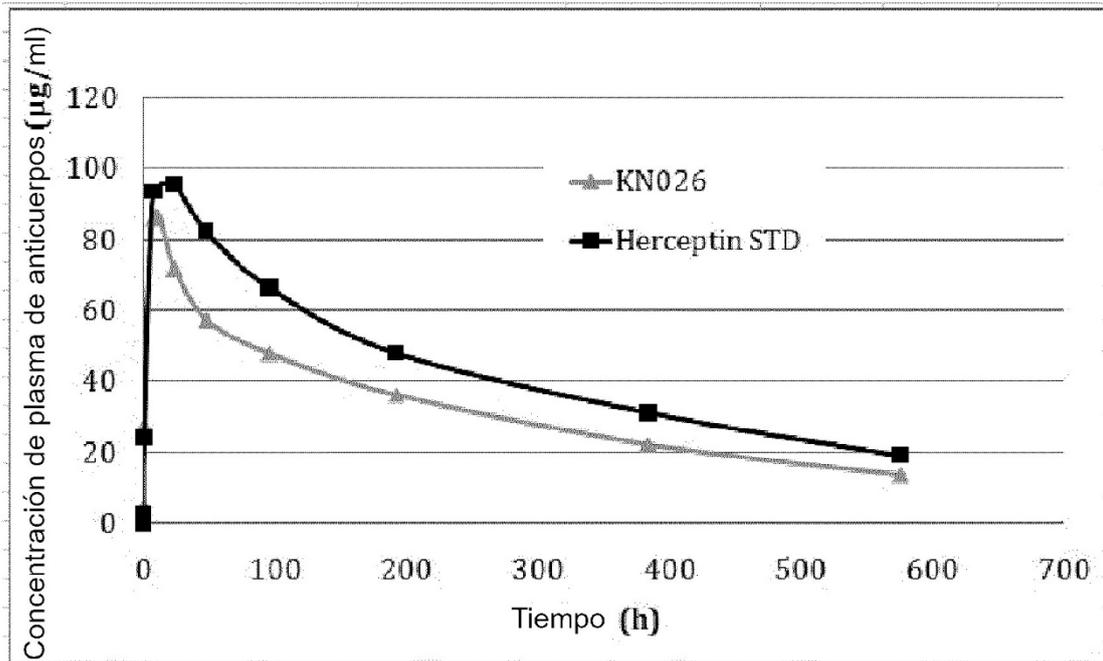


FIG. 21

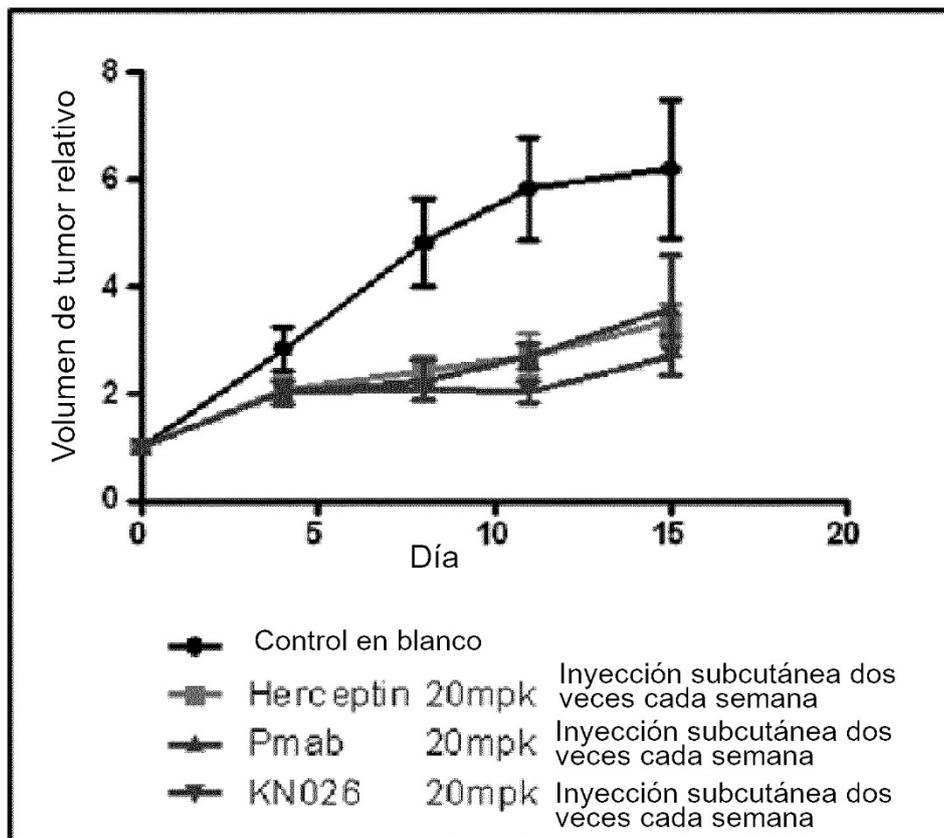


FIG. 22

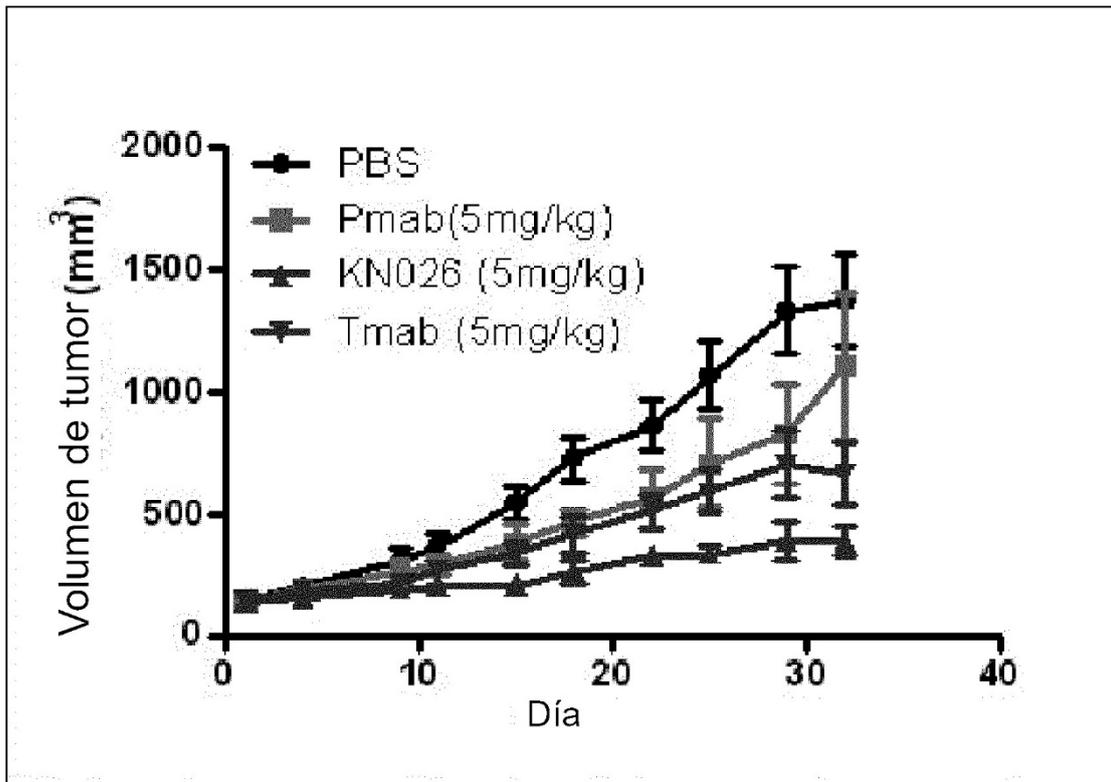


FIG. 23

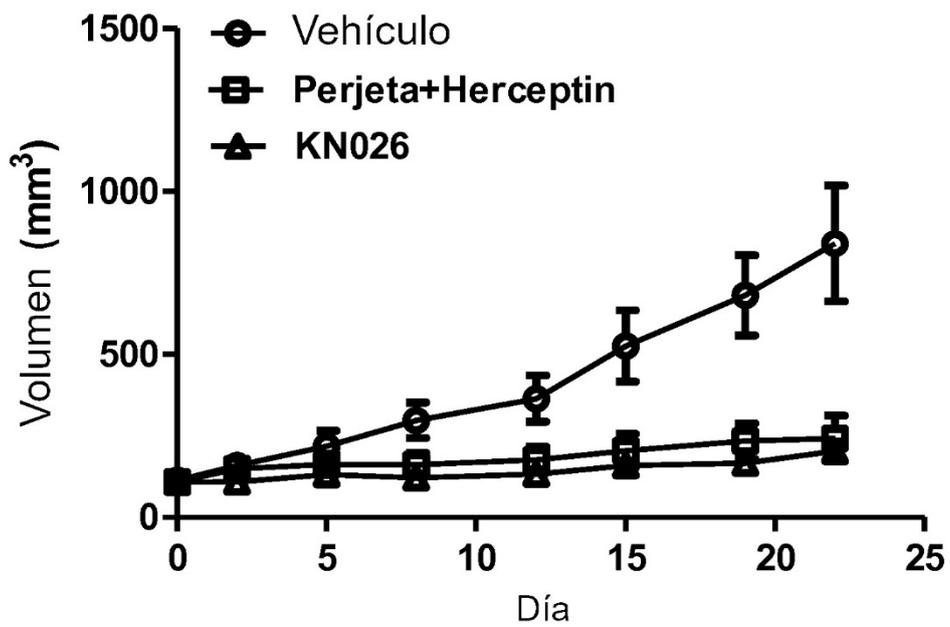


FIG. 24

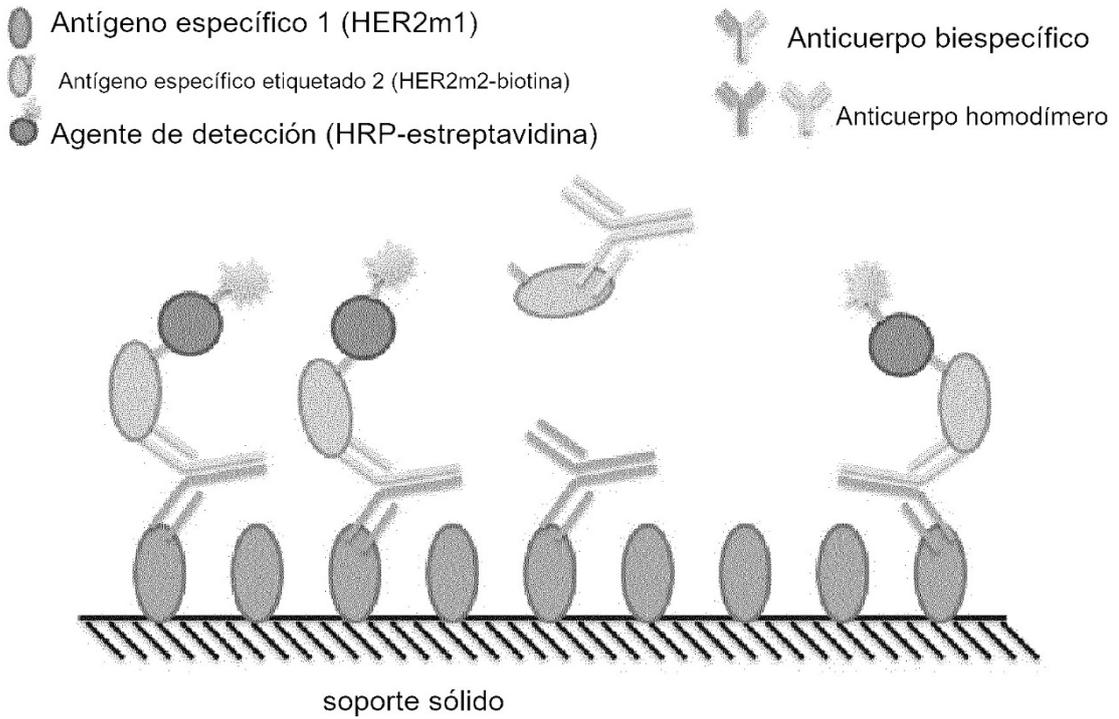


FIG. 25

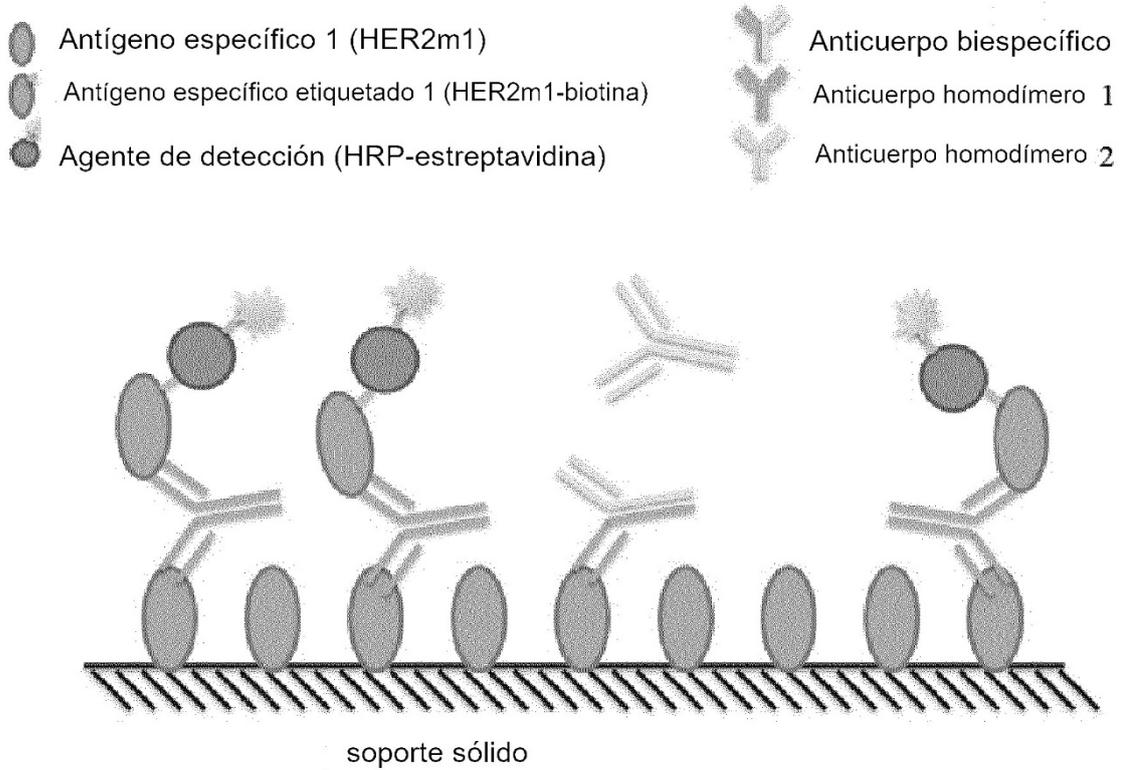


FIG. 26

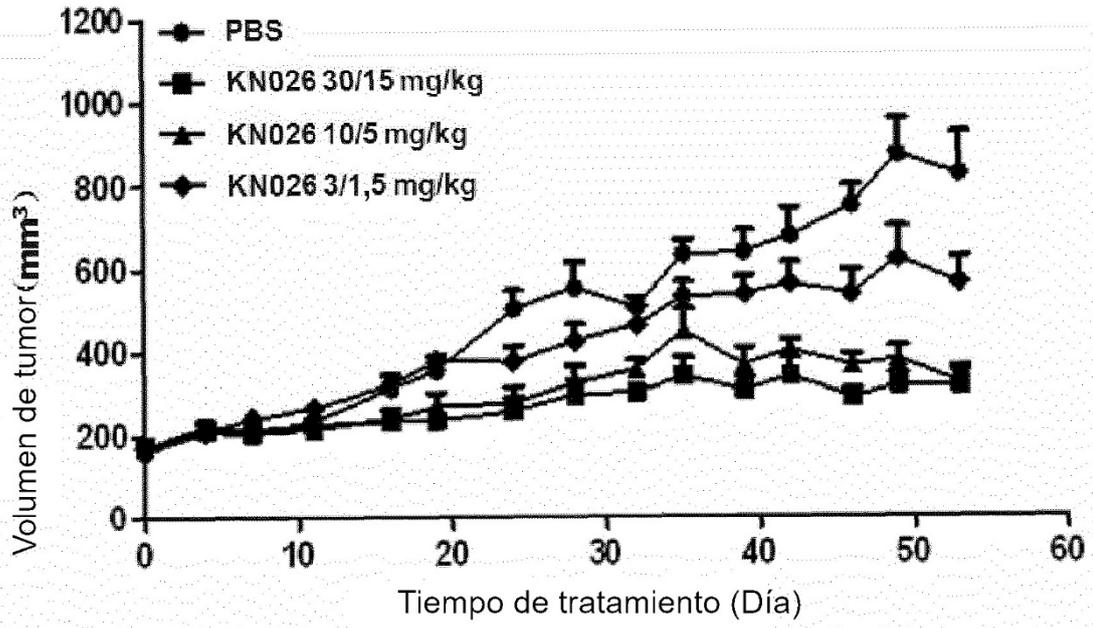


FIG. 27

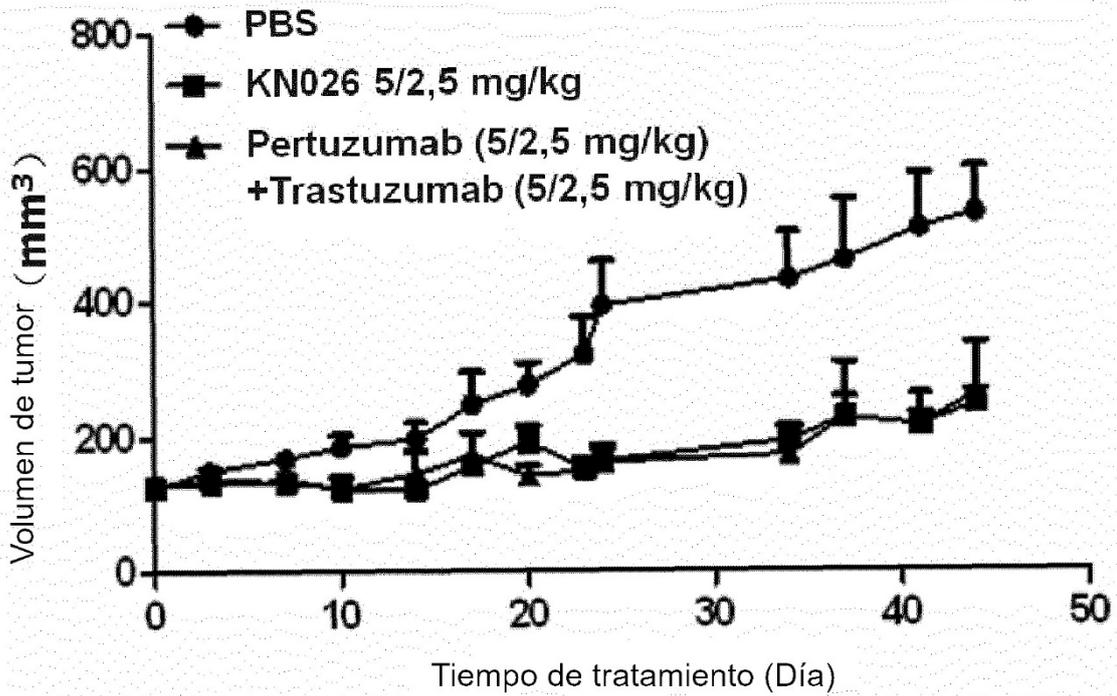


FIG. 28