

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 802**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2010 E 10721130 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2435473**

54 Título: **Anticuerpos tri- o tetraespecíficos**

30 Prioridad:

27.05.2009 EP 09007052

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

24.01.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

CROASDALE, REBECCA;

KLEIN, CHRISTIAN;

SCHAEFER, WOLFGANG y

SCHANZER, JUERGEN MICHAEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 439 802 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

Anticuerpos tri- o tetraespecíficos

5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos tri- o tetraespecíficos, a su preparación y a su utilización.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas manipuladas, tales como anticuerpos bi- o multiespecíficos capaces de unirse a dos o más antígenos, son conocidas de la técnica. Estas proteínas de unión multiespecíficas pueden generarse mediante fusión celular, conjugación química o técnicas de ADN recombinante.

15 Recientemente se ha desarrollado una amplia diversidad de formatos de anticuerpo multiespecífico recombinante, por ejemplo anticuerpos biespecíficos tetravalentes mediante fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (ver, por ejemplo, Coloma M.J. *et al.*, Nature Biotech. 15:159-163, 1997; documento WO nº 2001/077342, y Morrison S.L., Nature Biotech. 25:1233-1234, 2007).

20 También se han desarrollado otros formatos nuevos en los que la estructura del núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) ya no se conserva, tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, minicuerpos, varios formatos de cadena sencilla (scFv, bis-scFv), que son capaces de unirse a dos o más antígenos (Hollinger P. *et al.*, Nature Biotech. 23:1126-1136, 2005; Fischer N. y Léger O., Pathobiology 74:3-14, 2007; Shen J., *et al.*, J. Immunol. Methods 318:65-74, 2007; Wu C., *et al.*, Nature Biotech. 25:1290-1297, 2007).

25 La totalidad de dichos formatos utiliza conectores, para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a una proteína adicional de unión (por ejemplo scFv) o para fusionar, por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv (Fischer N. y Léger O., Pathobiology 74:3-14, 2007). Aunque resulta evidente que los conectores presentan ventajas para la manipulación de los anticuerpos biespecíficos, también pueden provocar problemas en contextos terapéuticos. En efecto, estos péptidos foráneos pueden inducir una respuesta inmunológica contra el conector mismo o la unión entre la proteína y el conector. Además, la naturaleza flexible de estos péptidos provoca que presenten una mayor tendencia al corte proteolítico, conduciendo potencialmente a una pobre estabilidad del anticuerpo, a la agregación y a una mayor inmunogenicidad. Además, puede resultar deseable conservar funciones efectoras, tales como, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), las cuales se encuentran mediadas por la parte Fc, mediante el mantenimiento de un elevado grado de similitud a los anticuerpos naturales.

35 De esta manera, idealmente, el objetivo debe ser desarrollar anticuerpos biespecíficos que resulten muy similares en su estructura general a anticuerpos naturales (tales como IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) con una desviación mínima respecto a las secuencias humanas.

40 En un enfoque, se han producido anticuerpos biespecíficos que son muy similares a anticuerpos naturales utilizando la tecnología del cuadroma (ver Milstein C. y Cuello A.C., Nature 305:537-540, 1983), basada en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes que expresan anticuerpos monoclonales murinos con las especificidades deseadas del anticuerpo biespecífico. Debido al apareamiento aleatorio de las cadenas pesada y ligera de dos anticuerpos diferentes dentro de la línea celular de hibridoma (o cuadroma) híbrido resultante, se generan hasta diez especies diferentes de anticuerpo de entre las que únicamente una es el anticuerpo biespecífico funcional deseado. Debido a la presencia de productos secundarios mal apareados, y rendimientos de producción significativamente reducidos, resultan necesarios procedimientos de purificación sofisticados (ver, por ejemplo, Morrison S.L., Nature Biotech. 25:1233-1234, 2007). En general, se mantiene el mismo problema de productos secundarios mal apareados en el caso de que se utilicen técnicas de expresión recombinante.

50 Un enfoque para evitar el problema de los productos secundarios mal apareados, que se conoce como "botón en ojal", pretende forzar el apareamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfaz de contacto. En una cadena se sustituyen aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas, para crear un "ojal". A la inversa, se introducen aminoácidos con cadenas laterales grandes en el otro dominio CH3, para crear un "botón". Mediante la coexpresión de estas dos cadenas pesadas (y de dos cadenas ligeras idénticas, que deben ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se han observado rendimientos elevados de formación de heterodímeros ("botón-ojal") frente a la formación de homodímeros ("ojal-ojal" o "botón-botón") (Ridgway J.B. *et al.*, Protein Eng. 9:617-621, 1996, y documento WO nº 96/027011). El porcentaje de heterodímeros podría incrementarse adicionalmente mediante el remodelaje de las superficies de interacción de los dos dominios CH3 utilizando un enfoque de expresión fágica e introduciendo un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant A.M. *et al.*, Nature Biotech. 16:677-681, 1998; Atwell S. *et al.*, J. Mol. Biol. 26:35, 1997). Se describen nuevos enfoques para la tecnología de botones-en-ojales en, por ejemplo, el documento EP nº 1 870 459 A1. Aunque este formato aparentemente resulta muy

5 atractivo, en la actualidad no se dispone de datos que describan la progresión hacia el uso clínico. Una importante limitación de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos parentales deben ser idénticas para evitar el apareamiento incorrecto y la formación de moléculas inactivas. De esta manera, esta técnica no resulta apropiada como base para el desarrollo sencillo de anticuerpos trispecíficos o tetraespecíficos recombinantes contra tres o cuatro antígenos de anticuerpo partiendo de dos anticuerpos contra el primer y segundo antígenos, debido a que las cadenas pesadas de estos anticuerpos y/o las cadenas ligeras idénticas deben optimizarse en primer lugar y después añadirse los péptidos de unión a antígeno adicionales contra el tercer y cuarto antígenos.

10 El documento WO n° 2006/093794 se refiere a composiciones heterodiméricas de unión a proteínas. El documento WO n° 99/37791 describe derivados de anticuerpo multiuso. Morrison S.L. *et al.*, J. Immunolog. 160:2802-2808, 1998, se refieren a la influencia del intercambio del dominio de región variable sobre las propiedades funcionales de la IgG.

15 Descripción resumida de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo trispecífico o tetraespecífico, que comprende:

- 20 a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y
b) la cadena ligera modificada y la cadena pesada modificada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en las que los dominios variables VL y VH se sustituyen mutuamente, y/o en las que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente, y
25 c) en donde uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales se fusionan mediante un conector de péptidos con el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas ligeras o de las cadenas pesadas de a) y/o de b).

Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de un anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención que comprende las etapas de:

30 a) transformar una célula huésped con

- vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de:

- 35 aa) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
ab) la cadena ligera modificada y la cadena pesada modificada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en las que los dominios variables VL y VH se sustituyen mutuamente, y/o en las que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente, y
40 ac) en donde uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales se fusionan mediante un conector de péptidos con el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas ligeras o de las cadenas pesadas de a) y/o de b).

b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo, y

45 c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

Una realización adicional de la invención es una célula huésped que comprende:

- vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de:

- 50 a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
b) la cadena ligera modificada y la cadena pesada modificada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en las que los dominios variables VL y VH se sustituyen mutuamente, y/o en las que los dominios constantes CL y CH se sustituyen mutuamente, y
55 c) en donde uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales se fusionan mediante un conector de péptidos con el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas ligeras o cadenas pesadas de a) y/o de b).

60 Una realización adicional de la invención es una composición, preferentemente una composición farmacéutica o diagnóstica, del anticuerpo según la invención.

Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se describe un método para el tratamiento de un paciente que necesita terapia, caracterizado por la administración en el paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención.

- 5 Según la invención, puede mejorarse la proporción entre un anticuerpo trispecífico o tetraespecífico deseado y los productos secundarios no deseados, mediante la sustitución de determinados dominios en únicamente la pareja de cadena pesada y cadena ligera (HC/LC) del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al segundo antígeno (el segundo anticuerpo). De esta manera, el apareamiento incorrecto no deseado de la cadena ligera con la cadena pesada incorrecta puede reducirse (cadena ligera del primer anticuerpo con la cadena pesada del segundo anticuerpo o la cadena ligera del segundo anticuerpo con la cadena pesada del primer anticuerpo).

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo trispecífico o tetraespecífico, que comprende:

- 15 a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y
b) la cadena ligera modificada y la cadena pesada modificada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en las que los dominios variables VL y VH se sustituyen mutuamente, y/o en las que los dominios constantes CL y CH se sustituyen mutuamente, y
20 c) en donde uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales se fusionan mediante un conector de péptidos con el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas ligeras o cadenas pesadas de a) y/o de b).

- 25 En una realización de la invención, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención comprende bajo c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales.

En una realización de la invención, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención se caracteriza porque los péptidos de unión a antígeno se seleccionan de entre el grupo de un fragmento scFv y un fragmento scFab.

En una realización de la invención, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención se caracteriza porque los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFv.

- 35 En una realización de la invención, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención se caracteriza porque los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFab.

En una realización de la invención, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención se caracteriza porque los péptidos de unión a antígeno se fusionan con el extremo C-terminal de las cadenas pesadas de a) y/o de b).

En una realización de la invención, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención comprende bajo c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno adicional.

- 45 En una realización de la invención, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención comprende bajo c) dos péptidos de unión a antígeno idénticos que se unen específicamente a un tercer antígeno. Preferentemente, dichos dos péptidos de unión a antígeno idénticos se fusionan mediante el mismo conector de péptidos con el extremo C-terminal de las cadenas pesadas de a) y b). Preferentemente, dichos dos péptidos de unión a antígeno idénticos son fragmentos scFv o fragmentos scFab.

50 En una realización de la invención, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención comprende bajo c) dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a un tercer y a un cuarto antígenos. En una realización, dichos dos péptidos de unión a antígeno se fusionan mediante el mismo conector de péptidos con el extremo C-terminal de las cadenas pesadas de a) y b). Preferentemente, dichos dos péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFv o fragmentos scFab.

60 Según la invención, la proporción entre un anticuerpo trispecífico o tetraespecífico deseado y productos secundarios no deseados (debido al apareamiento incorrecto de la cadena ligera con la cadena pesada "incorrecta" del anticuerpo que se une específicamente al otro antígeno) puede mejorarse mediante la sustitución de determinados dominios en únicamente una pareja de cadena pesada y cadena ligera (HC/LC). Aunque la primera de las dos parejas HC/LC de longitud completa se origina en un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno y se deja esencialmente sin modificación, la segunda de las parejas HC/HL de longitud completa se origina

en un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y se modifica mediante la sustitución siguiente:

- cadena ligera: sustitución del dominio variable de cadena ligera VL por el dominio variable de cadena pesada VH de dicho anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y/o el dominio constante de cadena ligera CL por el dominio constante de cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y

- cadena pesada: sustitución del dominio variable de cadena pesada VH por el dominio variable de cadena ligera VL de dicho anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y/o el dominio constante de cadena pesada CH1 por el dominio constante de cadena ligera CL de dicho anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno.

A este anticuerpo biespecífico de proporción mejorada se fusionan uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales mediante un conector de péptidos con el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas ligeras o de las cadenas pesadas de dichos dos anticuerpos que se unen específicamente al primer y segundo antígenos, resultando en el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención.

De esta manera, los anticuerpos trispecíficos y tetraespecíficos resultantes según la invención son anticuerpos artificiales que comprenden:

- a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
- b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde dicha cadena ligera (de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno) contiene un dominio variable VH en lugar de VL y/o un dominio constante CH1 en lugar de CL en donde dicha cadena pesada (de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno) contiene un dominio variable VL en lugar de VH y/o un dominio constante CL en lugar de CH1.

En un aspecto adicional de la invención, dicha proporción mejorada entre un anticuerpo biespecífico bivalente deseado y productos secundarios no deseados puede mejorarse adicionalmente mediante modificaciones de los dominios CH3 de dichos anticuerpos de longitud completa que se unen específicamente a un primer y segundo antígenos dentro del anticuerpo trispecífico o tetraespecífico.

De esta manera, en una realización preferente de la invención, los dominios CH3 de dicho anticuerpo trispecífico o tetraespecífico (en la cadena pesada y en la cadena pesada modificada) según la invención pueden alterarse mediante la tecnología de "botón-en-ochal", que se describe en detalle con varios ejemplos en, por ejemplo, el documento WO nº 96/027011, Ridgway J.B. *et al.*, Protein Eng. 9:617-621, 1996, y Merchant A.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 16:677-681, 1998. En este método, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen dichos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ochal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente los heterodímeros (Merchant A.M. *et al.*, Nature Biotech. 16:677-681, 1998; Atwell S. *et al.*, J. Mol. Biol. 270:26-35, 1997), e incrementa el rendimiento.

De esta manera, en un aspecto de la invención, dicho anticuerpo trispecífico o tetraespecífico se caracteriza adicionalmente porque el dominio CH3 de la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa de a) y el dominio CH3 de la cadena pesada modificada del anticuerpo de longitud completa de b) se reúnen cada uno en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo, en donde dicha interfaz se altera para estimular la formación del anticuerpo trispecífico o tetraespecífico, en donde la alteración se caracteriza porque

i) el dominio CH3 de una cadena pesada se ha alterado, de manera que dentro de la interfaz original, el dominio CH3 de una cadena pesada que se reúne con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo trispecífico o tetraespecífico, se sustituye un aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral mayor, generando de esta manera una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que se encuentra en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada,

y

ii) el dominio CH3 de la otra cadena pesada ha sido alterado, de manera que, dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo trispecífico o tetraespecífico se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más pequeño,

generando de esta manera una cavidad en el interior de la interfaz del segundo dominio CH3, en el interior de la cual puede situarse una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.

5 Preferentemente, dicho residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más grande se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Preferentemente, dicho residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

10 En un aspecto de la invención, ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como el aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de manera que pueda formarse un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

15 En una realización preferente, dicho anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena del botón", y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal". También puede utilizarse un puente disulfuro entre cadenas adicional entre los dominios CH3 (Merchant A.M. *et al.*, Nature Biotech. 16:677-681, 1998), por ejemplo mediante la introducción de una mutación Y349C en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la "cadena del ojal". De esta manera, en otra realización preferente, dicho anticuerpo triespecífico o tetraespecífico
20 comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones E356C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o dicho anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 de las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación E356C o S354C adicional en el otro dominio CH3 que forma un puente disulfuro entre cadenas) (en todos los casos la numeración sigue el índice EU de Kabat). Sin embargo, también pueden utilizarse alternativa o adicionalmente otras tecnologías de botones en ojales, tal como se describe en el documento EP n° 1 870 459 A1. Un ejemplo preferente de dicho anticuerpo triespecífico o tetraespecífico son las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal" (en todos los casos la numeración sigue el índice EU de Kabat).

30 En otra realización preferente, dicho anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal", y además las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

35 En otra realización preferente, dicho anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3, y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o dicho anticuerpo triespecífico o tetraespecífico comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, y además las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena del botón" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

45 La expresión "anticuerpo de longitud completa" se refiere a un anticuerpo que consiste de dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo (ver la fig. 1). Una cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste en la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 de cadena pesada (CH1) de anticuerpo, una región bisagra (HR) de anticuerpo, un dominio constante 2 de cadena pesada (CH2) de anticuerpo, y un dominio constante 3 de cadena pesada (CH3) de anticuerpo, abreviadamente: VH-CH1-RB-CH2-CH3, y opcionalmente un dominio constante 4 de cadena pesada (CH4) de anticuerpo en el caso de un anticuerpo de la subclase IgE. Preferentemente, la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste, en la dirección N-terminal a C-terminal, de VH, CH1, HR, CH2 y CH3. La cadena ligera del anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, abreviadamente VL-CL. El dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo puede ser κ (kappa) o λ (lambda). Las cadenas del anticuerpo de longitud completa se unen entre sí mediante enlaces disulfuro entre polipéptidos, entre el dominio CL y el dominio CH1 (es decir, entre la cadena ligera y la cadena pesada) y entre las regiones bisagra de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa. Son ejemplos de anticuerpos de longitud completa típicos anticuerpos naturales tales como IgG (por ejemplo IgG1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos de longitud completa según la invención pueden ser de una única especie, por ejemplo el ser humano, o puede ser anticuerpos quimerizados o humanizados. Los anticuerpos de longitud completa según la invención comprende dos sitios de unión de antígeno formados por una pareja de VH y VL, los cuales se unen específicamente al mismo antígeno. El extremo C-terminal de las cadenas pesada y ligera de dicho anticuerpo de longitud completa indica el último aminoácido en el extremo C-terminal de dicha cadena pesada o ligera. La expresión "conector de péptidos" tal como se utiliza en la invención se refiere a un péptido con

secuencias de aminoácidos que preferentemente es de origen sintético. Estos conectores de péptidos según la invención se utilizan para fusionar los péptidos de unión a antígeno con el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas del anticuerpo de longitud completa y/o de longitud completa modificado, para formar un anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención. Preferentemente, dichos conectores de péptidos bajo c) son péptidos con una secuencia de aminoácidos que presenta una longitud de por lo menos 5 aminoácidos, preferentemente con una longitud de entre 5 y 100, más preferentemente de entre 10 y 50 aminoácidos. En una realización, dicho péptido conector es $(G_xS)_n$ o $(G_xS)_nG_m$, con G=glicina, S=serina y $(x=3, n=3, 4, 5 \text{ ó } 6, \text{ y } m=0, 1, 2 \text{ ó } 3)$ o $(x=4, n=2, 3, 4 \text{ ó } 5, \text{ y } m=0, 1, 2 \text{ ó } 3)$, preferentemente $x=4$ y $n=2 \text{ ó } 3$, más preferentemente con $x=4$ y $n=2$. En una realización, dicho péptido conector es $(G_4S)_2$.

La expresión "péptido de unión a antígeno" tal como se utiliza se refiere a un fragmento de unión a antígeno monovalente o a un derivado de un anticuerpo de longitud completa que incluye dominios variables de cadena pesada (VH) de anticuerpo y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, o parejas de VH/VL derivadas de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo, tal como un dominio VH y/o un dominio VL, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) o un fragmento Fab de cadena sencilla (scFab). Preferentemente, el péptido de unión a antígeno comprende por lo menos un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo. En una realización preferente, dichos péptidos de unión a antígeno se seleccionan de entre el grupo que consiste de un dominio VH, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) y un fragmento Fab de cadena sencilla (scFab), preferentemente de entre el grupo que consiste de un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) y un fragmento Fab de cadena sencilla (scFab).

Las expresiones "sitio de unión" o "sitio de unión a antígeno" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a una o más regiones de una molécula de anticuerpo a la que se une físicamente un ligando (por ejemplo el antígeno o fragmento de antígeno del mismo) y se derivan a partir de un anticuerpo. El sitio de unión a antígeno incluye dominios variables de cadena pesada (VH) de anticuerpo y/o dominios variables de cadena ligera (VL) de anticuerpo, o parejas VH/VL.

Los sitios de unión de antígeno que se unen específicamente al antígeno deseado pueden derivarse a) de anticuerpos conocidos contra el antígeno, o b) de nuevos anticuerpos o de fragmentos de anticuerpo obtenidos mediante métodos de inmunización *de novo* utilizando, entre otros, la proteína o ácido nucleico antigénico o fragmentos de los mismos, o mediante expresión fágica.

Un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención puede contener seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en diversos grados a la afinidad del sitio de unión para el antígeno. Existen tres CDRs de dominio variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDRs de dominio variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las regiones CDR y de marco (FRs) se determina mediante comparación con una base de datos compilada a partir de secuencias de aminoácidos en las que dichas regiones se han definido según la variabilidad entre secuencias. También se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención los sitios de unión a antígeno funcionales que comprenden menos CDR (es decir, en los que la especificidad de unión está determinada por tres, cuatro o cinco CDR). Por ejemplo, menos de un juego completo de 6 CDRs puede resultar suficiente para la unión. En algunos casos, resultará suficiente un dominio VH o un dominio VL.

La especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento específico del anticuerpo para un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que presentan dos especificidades de unión a antígeno diferentes. Los anticuerpos trispecíficos según la invención son anticuerpos que presentan tres especificidades de unión a antígeno diferentes. Los anticuerpos tetraespecíficos según la invención son anticuerpos que presentan cuatro especificidades de unión a antígeno diferentes.

En el caso de que un anticuerpo presente más de una especificidad, los epítopos reconocidos pueden asociarse a un único antígeno o a más de un antígeno.

El término "mono específico" referido a un anticuerpo tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que presenta uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítipo del mismo antígeno.

El término "valente" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Un anticuerpo natural, por ejemplo, o un anticuerpo de longitud completa según la invención, presenta dos sitios de unión y es bivalente. El término "trivalente" se refiere a la presencia de tres sitios de unión en una molécula de anticuerpo. La expresión anticuerpo "trivalente trispecífico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que presenta tres sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales se une a otro antígeno (o a otro epítipo del antígeno). Los anticuerpos de la presente invención

presentan tres a seis sitios de unión, es decir, son trivalentes, tetravalentes, pentavalentes o hexavalentes (preferentemente trivalentes o tetravalentes) y son trispecíficos o tetraespecíficos.

5 Un "fragmento scFv" o "fragmento Fv de cadena sencilla" (ver la fig. 2b) es un polipéptido que consiste de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, y un conector Fv de cadena sencilla, en los que dichos dominios de anticuerpo y dicho conector Fv de cadena sencilla presentan uno de los órdenes siguientes, en dirección N-terminal a C-terminal:

10 a) VH-conector Fv de cadena sencilla-VL, b) VL-conector Fv de cadena sencilla-VH; preferentemente a) VH-conector Fv de cadena sencilla-VL, y en los que dicho conector Fv de cadena sencilla es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que presenta una longitud de por lo menos 15 aminoácidos, en una realización con una longitud de por lo menos 20 aminoácidos. La expresión "extremo N-terminal" se refiere al último aminoácido del extremo N-terminal; la expresión "extremo C-terminal" se refiere al último aminoácido del extremo C-terminal.

15 La expresión "conector Fv de cadena sencilla" tal como se utiliza dentro de un fragmento Fv de cadena sencilla se refiere a un péptido con secuencias de aminoácidos que preferentemente es de origen sintético. Dicho conector Fv de cadena sencilla es un péptido con una secuencia de aminoácido que presenta una longitud de por lo menos 15 aminoácidos; en una realización, con una longitud de por lo menos 20 aminoácidos, y preferentemente con una longitud de entre 15 y 30 aminoácidos. En una realización, dicho conector de cadena sencilla es $(GXS)_n$, en donde G=glucina, S=serina, ($x=3$ y $n=4, 5, \text{ ó } 6$) o ($x=4$, y $n=3, 4, 5 \text{ ó } 6$), preferentemente con $x=4$, $n=3, 4 \text{ ó } 5$, más preferentemente con $x=4$, $n=3 \text{ ó } 4$. En una realización, dicho conector Fv de cadena sencilla es $(G_4S)_3$ o $(G_4S)_4$.

25 Además, dichos fragmentos Fv de cadena sencilla preferentemente se encuentran estabilizados por puentes disulfuro. Dicha estabilización adicional con puentes disulfuro de los anticuerpos de cadena sencilla se consigue mediante la introducción de un puente disulfuro entre los dominios variables de los anticuerpos de cadena sencilla, y se describe en, por ejemplo, el documento WO n° 94/029350, Rajagopal V. *et al.*, Prot. Engin. 10:1453-1459, 1997; Kobayashi H. *et al.*, Nuclear Medicine & Biology 25:387-393, 1998; o Schmidt M. *et al.*, Oncogene 18:1711-1721, 1999.

30 En una realización de los fragmentos Fv de cadena sencilla estabilizados por puentes disulfuro, el puente disulfuro entre los dominios variables de los fragmentos Fv de cadena sencilla comprendidos en el anticuerpo según la invención se selecciona, independientemente para cada fragmento Fv de cadena sencilla, de entre:

35 i) posición 44 del dominio variable de cadena pesada a posición 100 del dominio variable de cadena ligera, ii) posición 105 del dominio variable de cadena pesada a la posición 43 del dominio variable de cadena ligera, o iii) entre la posición 101 del dominio variable de cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera.

40 En una realización, el puente disulfuro entre los dominios variables de los fragmentos Fv de cadena sencilla comprendidos en el anticuerpo según la invención se encuentra entre la posición 44 del dominio variable de cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera.

45 Un "fragmento scFab" o un "fragmento Fab de cadena sencilla" (ver la fig. 2a) es un polipéptido que consiste de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, y un conector, en los que dichos dominios de anticuerpo y dicho conector presentan uno de los siguientes órdenes en la dirección N-terminal a C-terminal: a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1, o d) VL-CH1-conector-VH-CL, y en los que dicho conector es un polipéptido de por lo menos 30 aminoácidos, preferentemente de entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab de cadena sencilla a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1, y d) VL-CH1-conector-VH-CL, se estabilizan mediante el puente disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. La expresión "extremo N-terminal" se refiere al último aminoácido del extremo N-terminal; la expresión "extremo C-terminal" se refiere al último aminoácido del extremo C-terminal.

55 El término "conector" tal como se utiliza en la invención se refiere a un péptido con secuencias de aminoácidos, que preferentemente es de origen sintético. Estos péptidos según la invención se utilizan para unir a) VH-CH1 a VL-CL, b) VL-CL a VH-CH1, c) VH-CL a VL-CH1, o d) VL-CH1 a VH-CL para formar los fragmentos Fab de cadena sencilla siguientes según la invención: a) VH-CH1-conector-VL-CL, b) VL-CL-conector-VH-CH1, c) VH-CL-conector-VL-CH1, o d) VL-CH1-conector-VH-CL. Dicho conector dentro de los fragmentos Fab de cadena sencilla es un péptido con una secuencia de aminoácidos que presenta una longitud de por lo menos 30 aminoácidos, preferentemente con una longitud de entre 32 y 50 aminoácidos. En una realización, dicho conector es $(GxS)_n$, con G=glucina, S=serina, ($x=3$, $n=8, 9 \text{ ó } 10$, y $m=0, 1, 2 \text{ ó } 3$), o ($x=4$ y $n=6, 7 \text{ ó } 8$, y $m=0, 1, 2 \text{ ó } 3$), preferentemente con $x=4$, $n=6 \text{ ó } 7$, y $m=0, 1, 2 \text{ ó } 3$, más preferentemente con $x=4$, $n=7$ y $m=2$. En una realización, dicho conector es $(G_4S)_6G_2$.

En una realización preferente, dichos dominios de anticuerpo y dicho conector en dicho fragmento Fab de cadena sencilla presentan uno de los órdenes siguientes, en dirección N-terminal a C-terminal:

- 5 a) VH-CH1-conector-VL-CL, o b) VL-CL-conector-VH-CH1, más preferentemente VL-CL-conector-VH-CH1.

En otra realización preferente, dichos dominios de anticuerpo y dicho conector en dicho fragmento Fab de cadena sencilla presentan los órdenes siguientes, en dirección N-terminal a C-terminal:

- 10 a) VH-CL-conector-VL-CH1, o b) VL-CH1-conector-VH-CL.

Opcionalmente, en dicho fragmento Fab de cadena sencilla, además del puente disulfuro natural entre el dominio de CL y el dominio de CH1, el dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y el dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo son estabilizados mediante puente disulfuro, mediante la introducción de un puente disulfuro entre las posiciones siguientes:

- 15 i) posición 44 del dominio variable de cadena pesada y posición 100 del dominio variable de cadena ligera, ii) posición 105 del dominio variable de cadena ligera y la posición 43 del dominio variable de cadena ligera, oiii) posición 101 del dominio variable de cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera (numeración en todos los casos según el índice EU de Kabat).
- 20

Dicha estabilización adicional con puentes disulfuro de fragmentos Fab de cadena sencilla se consigue mediante la introducción de un puente disulfuro entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab de cadena sencilla. Las técnicas para introducir puentes disulfuro no naturales para la estabilización de un Fv de cadena sencilla se describen en, por ejemplo, la patente WO nº 94/029350, Rajagopal *et al.*, Prot. Engin. 10:1453-1459, 1997; Kobayashi *et al.*, Nuclear Medicine & Biology 25:387-393, 1998, o Schmidt *et al.*, Oncogene 18:1711-1721, 1999. En una realización, el puente disulfuro opcional entre los dominios variables de los fragmentos Fab de una cadena comprendidos en el anticuerpo según la invención se encuentra entre la posición 44 del dominio variable de cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de cadena ligera. En una realización, el puente disulfuro opcional entre los dominios variables de los fragmentos Fab de cadena sencilla comprendidos en el anticuerpo según la invención se encuentra entre la posición 105 del dominio variable de cadena pesada y la posición 43 del dominio variable de cadena ligera (en todos los casos la numeración es según el índice EU de Kabat).

25

30

En una realización, resulta preferente un fragmento Fab de cadena sencilla sin dicha estabilización opcional con disulfuro entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab de cadena sencilla.

35

Los anticuerpos de longitud completa de la invención comprenden regiones constantes de inmunoglobulina de una o más clases de inmunoglobulina. Entre las clases de inmunoglobulina se incluyen los isotipos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y, en el caso de IgA e IgA, los subtipos de las mismas. En una realización preferente, un anticuerpo de longitud completa de la invención presenta una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG.

40

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

45

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir la región de unión, procedente de una fuente o especie, y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana resultan preferentes. Otras formas preferentes de "anticuerpos quiméricos" comprendidas dentro de la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión del receptor de Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de clase intercambiada". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN codificantes de regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN codificantes de regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Morrison, S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1985, y las patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244).

50

55

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) han sido modificadas para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente de la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, se injerta una CDR murina en la región marco de un anticuerpo humano para preparar un "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo,

60

Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger M.S. *et al.*, Nature 314:268-270, 1985. Otras formas de "anticuerpos humanizados" comprendidas dentro de la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la del receptor de Fc (FcR).

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos del estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5:368-374, 2001). También pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el reto de antígeno (ver, por ejemplo, Jakobovits A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555, 1993; Jakobovits A. *et al.*, Nature 362:255-258, 1993; Brueggemann M. *et al.*, Year Immunol. 7 (1993) 33-40). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de expresión fágica (Hoogenboom H.R. y Winter G.J., Mol. Biol. 227:381-388, 1992; Marks J.D. *et al.*, J. Mol. 222:581-597, 1991). Las técnicas de Cole *et al.* y de Boerner *et al.* también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77, 1985; y Boerner, P. *et al.*, J. Immunol. 147:86-95, 1991). Tal como ya se ha indicado para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, la expresión "anticuerpo humano" tal como se utiliza en la presente memoria también comprende los anticuerpos que se han modificado en la región constante para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o la unión de FcR, por ejemplo mediante "intercambio de clase", es decir, el cambio o mutación de partes Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).

La expresión "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o para anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Dichos anticuerpos recombinantes humanos presentan regiones variables y constantes en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención han sido sometidos a hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de anticuerpos de la línea germinal humana.

La expresión "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada cadena de la pareja de cadenas ligera y pesada que participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de cadenas ligera y pesada variables presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas, conectadas mediante tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones de marco adoptan una conformación de hoja β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de hoja β. Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión a antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y, por lo tanto, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

Las expresiones "región hipervariable" o "parte de unión a antígeno del anticuerpo" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "de marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada cadena se encuentran separadas por aminoácidos de marco. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "de unión"/"que se une específicamente"/"específicamente de unión" se refieren a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) con antígeno de tipo salvaje purificado. La afinidad de la unión está definida por los términos k_a (constante de

- 5 velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_d/k_a). En una realización, la unión o unión específica se refiere a una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o inferior, preferentemente de entre 10^{-9} M y 10^{-13} moles/l. De esta manera, un anticuerpo trispecifico o tetraespecifico según la invención se une específicamente a cada antígeno para el que es específico con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o inferior, preferentemente de entre 10^{-9} y 10^{-13} moles/l.
- 10 La unión del anticuerpo a FcγRIII puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión está definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_d/k_a).
- 15 El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el determinante epítipo incluye grupos superficiales químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales sacáridas, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas realizaciones, puede presentar características estructurales tridimensionales específicas, o presentar características de carga específica. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo.
- 20 En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno en el caso de que reconozca preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.
- 25 En una realización adicional, el anticuerpo trispecifico o tetraespecifico según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A.
- En una realización adicional, el anticuerpo trispecifico o tetraespecifico según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG2 humana.
- 30 En una realización adicional, el anticuerpo trispecifico o tetraespecifico según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG3 humana o de la subclase IgG3 humana con la mutación adicional S228P.
- 35 En una realización adicional, el anticuerpo trispecifico o tetraespecifico según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG4 humana o de la subclase IgG4 humana con la mutación adicional S228P.
- Ahora se ha encontrado que los anticuerpos trispecificos o tetraespecificos según la invención presentan características mejoradas, tales como actividad biológica o farmacológica, propiedades farmacocinéticas o toxicidad. Pueden utilizarse, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.
- 40 La expresión "región constante" tal como se utiliza en las presentes solicitudes se refiere a la suma de los dominios de un anticuerpo que no son de la región variable. La región constante no se encuentra directamente implicada en la unión de un antígeno, aunque muestra diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpo se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de cadena ligera (CL) que pueden encontrarse en la totalidad de las cinco clases de anticuerpo se denominan κ (kappa) y λ (lambda).
- 45 La expresión "región constante derivada de origen humano" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una región constante de cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4 y/o a una región constante de cadena ligera kappa o lambda. Dichas regiones constantes son bien conocidas del estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, Kabat, E.A. (ver, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28:214-218, 2000; Kabat, E.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2785-2788, 1975).
- 50 Mientras que los anticuerpos de la subclase IgG4 muestran un nivel reducido de unión del receptor de Fc (FcγRIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 son residuos que, en caso de alterarse, también proporcionan un nivel reducido de unión de Fc (Shields, R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, 2001; Lund, J. *et al.*, *FASEB J.* 9:115-119, 1995; Morgan, A. *et al.*, *Immunology* 86:319-324, 1995; patente EP nº 0 307 434).
- 55
- 60

En una realización, un anticuerpo según la invención presenta un nivel reducido de unión de FcR en comparación con un anticuerpo IgG1. De esta manera, el anticuerpo parental de longitud completa es, en referencia a la unión de FcR, de la subclase IgG4 ó de la subclase IgG1 ó IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una realización, las mutaciones en el anticuerpo parental de longitud completa son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236. En otra realización, las mutaciones en el anticuerpo parental de longitud completa son, en IgG4, S228P, y en IgG1, L234A y L235A.

La región constante de un anticuerpo participa directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y en la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia a partir de la unión del factor del complemento C1q a la región constante de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión de la región constante son conocidos del estado de la técnica y son descritos por, por ejemplo, Lukas T.J. *et al.*, *J. Immunol.* 127:2555-2560, 1981; Brunhouse R. y Cebra J.J., *Mol. Immunol.* 16:907-917, 1979; Burton D.R. *et al.*, *Nature* 288:338-344, 1980; Thomason J.E. *et al.*, *Mol. Immunol.* 37:995-1004, 2000; Idusogie E.E. *et al.*, *J. Immunol.* 164:4178-4184, 2000; Hezareh M. *et al.*, *J. Virol.* 75:12161-12168, 2001; Morgan A. *et al.*, *Immunology* 86:319-324, 1995, y en la patente EP nº 0 307 434. Dichos sitios de unión de la región constante se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat).

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células diana humanas por parte de un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células expresantes de antígeno con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, tales como PBMC recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, por ejemplo monocitos o células asesinas naturales (NK) o de una línea celular de NK de crecimiento continuo.

La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a un proceso iniciado por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión de la parte Fc son conocidos del estado de la técnica (ver anteriormente). Dichos sitios de unión de la parte Fc se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente muestran activación del complemento, incluyendo la unión de C1q y C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q y/o a C3.

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales pueden potenciarse mediante la manipulación de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umana, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180, 1999, y la patente US nº 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos terapéuticos utilizados más habitualmente, son glucoproteínas que presentan un sitio N-ligado de glucosilación conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia resulta esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely M. R. *et al.*, *Glycobiology* 5:813-822, 1995; Jefferis R. *et al.*, *Immunol. Rev.* 163:59-76, 1998; Wright A. y Morrison S.L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32). Umana P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180, 1999, y el documento WO nº 99/54342 mostraron que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de la $\beta(1)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, incrementaba significativamente la actividad de ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición del carbohidrato de Asn297 ó su eliminación también afecta a la unión a Fc γ R y a C1q (Umana, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180, 1999; Davies, J. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 74:288-294, 74; Mimura, Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:45539-45547, 2001; Radaev, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:16478-16483, 2001; Shields, R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, 2001; Shields, R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740, 2002; Simmons, L.C. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 263:133-147, 2002.

Los métodos para potenciar las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se informan en, por ejemplo, los documentos WO nº 2005/018572, nº 2006/116260, nº 2006/114700, nº 2004/065540, nº 2005/011735, nº 2005/027966, nº 1997/028267, US nº 2006/0134709, nº 2005/0054048, nº 2005/0152894, WO nº 2003/035835 y nº 2000/061739.

En una realización preferente de la invención, el anticuerpo trispecifico o tetraespecifico se glucosila (en el caso de que comprenda una parte Fc de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4, preferentemente de la subclase IgG1 ó IgG3) con una cadena sacárida en Asn297, de manera que la cantidad de fucosa en dicha cadena sacárida sea de 65% o inferior (numeración según Kabat). En otra realización, la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena sacárida se encuentra comprendida entre 5% y 65%, preferentemente entre 20% y 40%. El término "Asn297" según la invención

se refiere al aminoácido asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región de Fc. Basado en variaciones de secuencia menores de los anticuerpos, Asn297 también puede encontrarse situado a algunos aminoácidos (habitualmente no más de 63 aminoácidos) cadena arriba o abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300. En una realización, el anticuerpo glucosilado según la invención es de la subclase IgG1 humana, de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A o de la subclase IgG3. En una realización adicional, la cantidad de ácido N-glucolilneuramínico (NGNA) es de 1% o inferior, y/o la cantidad de alfa-1,3-galactosa N-terminal es de 1% o inferior dentro de dicha cadena sacárida. La cadena sacárida muestra preferentemente las características de los glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula CHO.

La expresión "las cadenas sacáridas muestran características de glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula CHO" se refiere a que la cadena sacárida en Asn297 del anticuerpo parental de longitud completa según la invención presenta la misma estructura y secuencia de residuos sacáridos, excepto por el residuo fucosa, que los del mismo anticuerpo expresado en células CHO no modificadas, por ejemplo que las células de las que se informa en el documento WO nº 2006/103100.

El término "NGNA" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al residuo sacárido del ácido N-glucolilneuramínico.

La glucosilación de IgG1 ó IgG3 humana se produce en Asn297 en forma de glucosilación de oligosacárido complejo biantenarico fucosilado terminado en, como máximo, dos residuos Gal. Las regiones constantes de cadena pesada humana de la subclase IgG1 o IgG3 se informan en detalle en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y en Brüggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987; Love, T.W. *et al.*, Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Estas estructuras se denominan G0, G1 (α -1,6- ó α -1,3-) o residuos glicanos G2, dependiendo de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju, T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de partes Fc de anticuerpo se describe en, por ejemplo, Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14:201-207, 1997. Los anticuerpos que se expresan recombinantemente en células huésped CHO no glucomodificadas habitualmente se fucosilan en Asn297 en una proporción de por lo menos 85%. Los oligosacáridos modificados del anticuerpo parental de longitud completa pueden ser híbridos o complejos. Preferentemente, los oligosacáridos bifurcados, reducidos/no fucosilados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos bifurcados reducidos/no fucosilados son complejos.

Según la invención, la expresión "cantidad de fucosa" se refiere a la cantidad de dicho azúcar en la cadena sacárida en Asn297, referida a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) según medición realizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y calculado como valor medio. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa en relación a la totalidad de las glucoestructuras identificadas en una muestra tratada con N-glucosidasa F (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y estructuras de bajo y alto contenido en manosa, respectivamente) según el MALDI-TOF.

El anticuerpo según la invención se produce por medios recombinantes. De esta manera, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico codificante del anticuerpo según la invención, y un aspecto adicional es una célula que comprende dicho ácido nucleico codificante de un anticuerpo según la invención. Los métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprende la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el aislamiento posterior del anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos tal como se ha indicado anteriormente en una célula huésped, se insertan ácidos nucleicos codificantes de las cadenas ligeras y pesadas modificadas respectivas en los vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de E. coli, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o de la parte celular tras la lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos del estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17:183-202, 1999; Geisse, S. *et al.*, Protein Expr. Purif. 8:271-282, 1996; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16:151-161, 2000; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos triespecíficos o tetraespecíficos según la invención se preparan convenientemente a partir del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células

huésped.

5 Las variantes (o mutantes) de secuencia de aminoácidos del anticuerpo trispecífico o tetraespecífico se preparan mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos. Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones que no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tal como el isotipo y la unión de antígeno del IgG pero que podrían mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

10 La expresión "célula huésped" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a cualquier tipo de sistema celular que puede manipularse para generar los anticuerpos según la presente invención. En una realización, se utilizan células HEK293 y CHO como células huésped. Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto
15 primaria y los cultivos derivados de la misma, con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada. Resultará claro a partir del contexto se se pretenden utilizar denominaciones diferenciadas.

20 La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes, L.M. *et al.*, Cytotechnology 32:109-123, 2000; Barnes, L.M. *et al.*, Biotech. Bioeng. 73:261-270, 2001. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher, Y. *et al.*, Nucl. Acids Res. 30:E9, 2002. La clonación de los dominios variables ha sido descrita por Orlandi R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989; Carter P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289, 1992, y Norderhaug L. *et al.*, J. Immunol. Methods 204:77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK293) ha sido descrito por Schlaeger E.-J. y Christensen K., en Cytotechnology 30:71-83, 1999, y por Schlaeger E.-J., J. Immunol. Methods 194:191-199, 1996.

30 Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariontes se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión ribosómica. Es conocido que las células eucarióticas utilizan promotores, intensificadores y señales de poliadenilación.

35 Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se encuentre situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN de un polipéptido en el caso de que se exprese en forma de una preproteína que participe en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre situado de manera que facilite la traducción. Generalmente, la expresión "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN
40 que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, contiguas y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o conector según la práctica convencional.

45 La purificación de los anticuerpos se lleva a cabo con el fin de eliminar los componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/de SDS, la formación de bandas en CsCl, la cromatografía de columna, la electroforesis en gel de agarosa, y otras técnicas bien conocidas de la técnica (ver Ausubel, F. *et al.*, editor, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados diferentes métodos para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefara, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75:93-102, 1998).

60 Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. Otro aspecto de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica. Un aspecto adicional de la invención es un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona

una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo según la presente invención, formulado conjuntamente con un portador farmacéutico.

5 Una realización de la invención es el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico según la invención para el tratamiento del cáncer.

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

10 Otro aspecto de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéutico" incluye cualquiera y la totalidad de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión).

20 Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede resultar necesario recubrir el compuesto con un material, o coadministrar el compuesto con un material, para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse en un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo liposomas o un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina y soluciones tamponadoras acuosas. Entre los portadores farmacéuticos se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida de la técnica.

30 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal

35 El término "cáncer" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de células pulmonares no pequeñas (NSCL), cáncer pulmonar de células bronquioloalveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependinomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewings, incluyendo las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriormente indicados, o de una combinación de uno o más de los cánceres anteriormente indicados.

50 Dichas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabén, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

60 Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente

5 invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se utiliza, la duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general e historia médica del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de la técnica médica.

10 La composición debe ser estéril y líquida en grado suficiente para que la composición resulte administrable mediante jeringa. Además de agua, el portador preferentemente es una solución salina tamponada isotónica.

15 Puede mantenerse la fluidez correcta, por ejemplo mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición.

20 El término "transformación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento de transferencia de un vector/ácido nucleico al interior de una célula huésped. En el caso de que se utilicen células sin grandes barreras de pared celular como células huésped, la transfección se lleva a cabo mediante, por ejemplo, el método de precipitación con fosfato de calcio, tal como describen Graham y Van der Eb, *Virology* 52:456ff, 1978. Sin embargo, también pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como la inyección nuclear o la fusión de protoplasto. En el caso de que se utilicen células procarióticas o células que contenga construcciones sustanciales de pared celular, un método de transfección es, por ejemplo, el tratamiento de calcio utilizando cloruro de calcio tal como se describe en Cohen, S.N. *et al.*, *PNAS* 69:7110 y siguientes, 1972.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "expresión" se refiere al procedimiento por el que se transcribe un ácido nucleico en ARNm y/o al procedimiento por el que el ARNm transcrito (también denominado "transcrito") se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente "producto génico". En el caso de que se derive el polinucleótido de ADN genómico, la expresión en una célula eucariótica puede incluir el procesamiento del ARNm.

35 Un "vector" es una molécula de ácidos nucleicos, en particular autorreplicativa, que transfiere una molécula de ácidos nucleicos insertada al interior de células huésped o entre las mismas. El término incluye vectores que funcionan principalmente insertando ADN o ARN en una célula (por ejemplo la integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan principalmente replicando ADN o ARN, y los vectores de expresión que funcionan transcribiendo y/o traduciendo ADN o ARN. También se encuentran incluidos los vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriormente descritas.

40 Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, al introducirlo en una célula huésped apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión" habitualmente se refiere a una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar rindiendo un producto de expresión deseado.

45 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las secuencias de aminoácidos

- 50 SEC ID nº 1 cadena ligera <Ang-2>
- SEC ID nº 2 botón-cadena pesada <Ang-2> con scFv <EGFR> fusionado C-terminalmente
- SEC ID nº 3 cadena ligera <VEGF> con intercambio CH1-CL
- SEC ID nº 4 ojal-cadena pesada <VEGF> con intercambio CH1-CL y scFv <IGF-1R> fusionado C-terminalmente
- 55 SEC ID nº 5 botón-cadena pesada <Ang-2> con scFab <EGFR> fusionado C-terminalmente
- SEC ID nº 6 ojal-cadena pesada <VEGF> con intercambio CH1-CL y scFab <IGF-1R> fusionado C-terminalmente
- SEC ID nº 7 ojal-cadena pesada <VEGF> con intercambio CH1-CL y scFv <EGFR> fusionado C-terminalmente
- 60 SEC ID nº 8 ojal-cadena pesada <VEGF> con intercambio CH1-CL
- SEC ID nº 9 ojal-cadena pesada <VEGF> con intercambio CH1-CL y scFab <EGFR> fusionado C-terminalmente
- SEC ID nº 10 botón-cadena pesada <Ang-2> con scFab <IGF-1R> fusionado C-terminalmente

Descripción de las figuras

- Figura 1 Estructura esquemática de un anticuerpo de longitud completa sin unión específica del dominio CH4 a un primer antígeno 1 con dos parejas de cadena pesada y cadena ligera que comprenden dominios variables y constantes en un orden típico.
- Figura 2a Estructura esquemática de los cuatro posibles fragmentos Fab de cadena sencilla de unión específica a un antígeno.
- Figura 2b Estructura esquemática de los fragmentos Fv de cadena sencilla de unión específica a un antígeno.
- Figura 3a-d Estructura esquemática de diferentes anticuerpos triespecíficos o tetraespecíficos según la invención, caracterizada por la sustitución de dominios VL/VH y/o de los dominios CL/CH1 en la cadena ligera/pesada del anticuerpo de longitud completa, que se unen específicamente al segundo antígeno (sin y con modificaciones de botón-en-ojal adicionales de los dominios CH3).
- Figura 4a Estructura esquemática de un anticuerpo tetraespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fv de cadena sencilla estabilizados por disulfuro como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 1).
- Figura 4b Estructura esquemática de un anticuerpo tetraespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fab de cadena sencilla como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 1).
- Figura 5a Estructura esquemática de un anticuerpo triespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fv de cadena sencilla estabilizados por disulfuro, como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 2).
- Figura 5b Estructura esquemática de un anticuerpo triespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fab de cadena sencilla como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 2).
- Figura 6 Estructura esquemática de un anticuerpo triespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fv de cadena sencilla estabilizados por disulfuro, como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 3).
- Figura 7 Estructura esquemática de un anticuerpo tetraespecífico según la invención, que reconoce EGFR, IGF-1R, c-Met y HER3, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fv de cadena sencilla estabilizados por disulfuro como péptidos de unión a antígeno.
- Figura 8 Cromatografía de exclusión por tamaño de un anticuerpo tetraespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina 2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fab de cadena sencilla como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 1) en una columna Superdex 200 26/60 de carga elevada.
- Figura 9 Análisis de SDS-PAGE de un anticuerpo tetraespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fab de cadena sencilla como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 1) bajo condiciones nativas y desnaturizantes.
- Figura 10 Cromatografía de exclusión por tamaño de un anticuerpo triespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fab de cadena sencilla como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 2) en una columna Superdex 200 26/60 de carga elevada.
- Figura 11 Análisis de SDS-PAGE de un anticuerpo triespecífico según la invención, que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR, que es tetravalente y utiliza fragmentos Fab de cadena sencilla como péptidos de unión a antígeno (Ejemplo 2) bajo condiciones nativas y desnaturizantes.

Ejemplos

50 Materiales y métodos generales

Se proporciona información general sobre secuencias de nucleótidos de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas en: Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se numeran y se hace referencia a las mismas según la numeración EU (Edelman G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:78-85, 1969; Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

60 Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándares para manipular el ADN, tales como los descritos en Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Síntesis génica

5 Se prepararon los segmentos génicos deseados a partir de oligonucleótidos construidos mediante síntesis química. Los segmentos génicos de 600 a 1800 pb de longitud, que se encontraban flanqueados por sitios de corte de endonucleasa únicos, se ensamblaron mediante hibridación y ligación de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron mediante los sitios de restricción indicados, por ejemplo KpnI/SacI o AscI/PacI en un vector de clonación pPCRScripT (Stratagene) basado en pGA4. Las secuencias de ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Los fragmentos de síntesis génica se ordenaron según las especificaciones proporcionadas por Geneart (Regensburg, Alemania).

Determinación de la secuencia de ADN

15 Se determinaron las secuencias de ADN mediante secuenciación de doble cadena realizada en MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o en Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).

Análisis de secuencias de ADN y de proteínas y gestión de los datos de secuencias

20 Se utilizó el paquete informático versión 10.2 del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) y Vector NTI Advance suite versión 8.0 de Infomax para la creación, mapeado, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.

Vectores de expresión

25 Para la expresión de los anticuerpos indicados, se aplicaron variantes de plásmidos de expresión para células de expresión transitoria (por ejemplo HEK293 EBNA o HEK293-F) basadas en una organización de ADNc con o sin un promotor del CMV con intrón A o en una organización genómica con un promotor del CMV.

Aparte del casete de expresión de anticuerpo, los vectores contenían:

- 30
- un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
 - un gen β -lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción del gen de anticuerpo está compuesta de los elementos siguientes:

- 35
- uno o más sitios de restricción únicos en el extremo 5'
 - el intensificador temprano inmediato y el promotor del citomegalovirus humano,
 - seguido de la secuencia del intrón A en el caso de la organización de ADNc,
 - una región 5' no traducida de un gen de anticuerpo humano, - una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina,
- 40
- la cadena de anticuerpo humano (de tipo salvaje o con intercambio de dominios) en forma de ADNc o como organización genómica con una organización exón-intrón de inmunoglobulina
 - una región 3' no traducida con una secuencia de señal de poliadenilación, y
 - uno o más sitios de restricción únicos en el extremo 3'.

45 Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpo indicadas posteriormente se generaron mediante PCR y/o síntesis génica, y se ensamblaron utilizando métodos y técnicas recombinantes conocidos mediante conexión de los segmentos de ácidos nucleicos correspondientes, por ejemplo utilizando sitios de restricción únicos en los vectores respectivos. Las secuencias subclonadas de ácidos nucleicos se verificaron mediante secuenciación del ADN. Para las transfecciones transitorias, se prepararon cantidades mayores de los plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

50

Técnicas de cultivo celular

55 Se utilizaron técnicas estándares de cultivo celular tales como las descritas en Current Protocols in Cell Biology, Bonifacio J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. y Yamada K.M. (editores), John Wiley & Sons, Inc.

Se expresaron anticuerpos triespecíficos o tetraespecíficos mediante cotransfección transitoria de los plásmidos de expresión respectivos en HEK293-EBNA en crecimiento adherente o en célula HEK29-F cultivadas en suspensión, tal como se describe posteriormente.

60 Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-EBNA

Se expresaron anticuerpos triespecíficos o tetraespecíficos mediante cotransfección transitoria de los plásmidos de

expresión respectivos (por ejemplo codificantes de la cadena pesada y de la cadena pesada modificada, así como las cadenas ligera y ligera modificada correspondientes) en células HEK293-EBNA en crecimiento adherente (línea celular renal embrionaria humana 293 que expresa el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr; American Type Culture Collection número de depósito ATCC nº CRL-10852, Lote nº 959 218) cultivadas en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco®) suplementado con FCS (suero de feto bovino, Gibco®) al 10% con niveles ultrabajos de IgG, L-glutamina 2 mM (Gibco®) y geneticina 250 mg/ml (Gibco®). Para la transfección, se utilizó reactivo de transfección FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) en una proporción de reactivo FuGENE™ (µl) a ADN (µg) de 4: 1 (comprendida entre 3: 1 y 6: 1). Se expresaron proteínas a partir de los plásmidos respectivos utilizando una proporción molar de plásmidos codificantes de cadena (modificada y de tipo salvaje) ligera y pesada de 1:1 (equimolar) comprendida entre 1:2 y 2:1, respectivamente. Las células se alimentan el día 3 con L-glutamina 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco®]. Se recolectaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos trispecíficos o tetraespecíficos entre los días 5 y 11 posteriores a la transfección, mediante centrifugación, y se almacenaron a -20°C. Se proporciona información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas en, por ejemplo, células HEK293, en: Meissner P. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 75:197-203, 2001.

15 Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

Se generaron anticuerpos trispecíficos y tetraespecíficos mediante transfección transitoria de los plásmidos respectivos (por ejemplo codificantes de cadena pesada y de cadena pesada modificada, así como las cadenas ligera y ligera modificada correspondientes) utilizando el sistema HEK293-F (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se transfectaron células HEK293-F (Invitrogen) cultivadas en suspensión en un matraz oscilante o en un fermentador bajo agitación en medio de expresión FreeStyle 293 libre de suero (Invitrogen) con una mezcla de los cuatro plásmidos de expresión y 293fectina™ o con fectina (Invitrogen). Para un matraz oscilante de 2 litros (Corning) se sembraron células HEK293-F a una densidad de 10^6 células/ml en 600 ml y se incubaron a 120 rpm, en 8% de CO₂. El día después de transfectar las células a una densidad celular de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con aproximadamente 42 ml de mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 mg de ADN total de plásmido (1 µg/ml) codificante de la cadena pesada o de la cadena pesada modificada, respectivamente, y la cadena ligera correspondiente en una proporción equimolar, y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml de 293 fectina o fectina (2 µl/ml). Según el consumo de glucosa, se añadió solución de glucosa durante el curso de la fermentación. El sobrenadante que contenía el anticuerpo secretado se recolectó tras 5 a 10 días y los anticuerpos se purificaron directamente del sobrenadante o el sobrenadante se congeló y se almacenó.

35 Determinación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas de los anticuerpos purificados y derivados de los mismos mediante la determinación de la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado a partir de la secuencia de aminoácidos según Pace *et al.*, *Protein Science* 4:2411-2423, 1995.

40 Determinación de la concentración de anticuerpos en sobrenadantes

Se estimó la concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular mediante inmunoprecipitación con perlas de agarosa-proteína A (Roche). Se lavaron 60 µl de perlas de agarosa-proteína A tres veces en TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 al 1%). Posteriormente, se aplicaron 1 a 15 ml de sobrenadante de cultivo celular a las perlas de agarosa-proteína A preequilibradas en TBS-NP40. Tras la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las perlas se lavaron en una columna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) una vez con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml de 2x de solución salina tamponada con fosfato (2xPBS, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de citrato sódico 100 mM, pH 5,0. El anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de 35 µl de tampón para muestras NuPAGE® LDS (Invitrogen). Se combinó la mitad de la muestra con agente reductor de muestras NuPAGE® o se dejó sin reducir, respectivamente, y se calentó durante 10 minutos a 70°C. Después, se aplicaron 5 a 30 µl a un SDS-PAGE Bis-Tris NuPAGE® al 4-12% (Invitrogen) (con tampón MOPS para SDS-PAGE no reducido y tampón MES con aditivo antioxidante de tampón de migración NuPAGE® (Invitrogen) para un SDS-PAGE reducido) y se tiñó con azul de Coomassie.

La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se midió cuantitativamente mediante cromatografía HPLC de afinidad. Brevemente, se aplicaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos y derivados que se unen a la proteína A a una columna Poros A/20 de Applied Biosystems en KH₂PO₄ 200 mM, citrato sódico 100 mM, pH 7,4, y se eluyeron de la matriz con NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM, pH 2,5 en un sistema HPLC 1100 de Agilent. Las proteínas eluidas se cuantificaron mediante absorbancia de UV e integración de las áreas de los picos. Un anticuerpo IgG1 estándar purificado sirvió como estándar.

Alternativamente, se midió la concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular

mediante ELISA tipo sándwich de IgG. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina StreptaWell High Bind (Roche) con 100 µl/pocillo de molécula de captura biotinilada anti-IgG humana F(ab')₂<h-Fcγ> BI (Dianova) a una concentración de 0,1 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente, o alternativamente durante la noche a 4°C y posteriormente se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBS, Tween al 0,05% (PBST, Sigma). Se añadieron 100 µl/pocillo de una serie de dilución en PBS (Sigma) de sobrenadantes de cultivo celular que contenían el anticuerpo respectivo, a los pocillos y se incubaron durante 1 a 2 horas en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo ligado se detectó con 100 µl de F(ab')₂<h-Fcγ>POD (Dianova) a una concentración de 0,1 µg/ml como anticuerpo de detección durante 1 a 2 horas en un agitador para placas de microtitulación a temperatura ambiente. Se lavó el anticuerpo de detección no unido tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia: 492 nm).

15 Purificación de proteínas

Se purificaron proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados siguiendo protocolos estándares. Brevemente, se aplicaron anticuerpos a una columna de proteína A-sefariosa (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. La elución de los anticuerpos se consiguió a pH 2,8, seguido de la neutralización inmediata de la muestra. Se separaron las proteínas agregadas de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0. Se agruparon las fracciones de anticuerpo monomérico, se concentraron (en caso necesario) utilizando, por ejemplo, un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (valor de corte de 30 MWCO), se congelaron y se almacenaron a -20°C o a -80°C. Parte de las muestras se proporcionaron a la analítica de proteínas posterior y caracterización analítica mediante, por ejemplo, SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (CET) o espectrometría de masas.

SDS-PAGE

Se utilizó el sistema de gel premoldeado NuPAGE[®] (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En particular, se utilizaron geles premoldeados NuPAGE[®] Novex[®] Bis-TRIS (pH 6,4) al 10% o al 4-12% y un NuPage[®] MES (geles reducidos con aditivo antioxidante NuPAGE[®] para tampón de migración) o tampón de migración MOPS (geles no reducidos).

35 Cromatografía analítica de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño (CET) para la determinación de la agregación y estado oligomérico de los anticuerpos se llevó a cabo mediante cromatografía HPLC. Brevemente, se aplicaron anticuerpos purificados con proteína A en una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,5 en un sistema HPLC 1100 de Agilent o en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2xPBS en un sistema de HPLC de Dionex. Las proteínas eluidas se cuantificaron mediante absorbancia de UV e integración de las áreas de los picos. El estándar de filtración en gel 151-1901 de BioRad sirvió de estándar.

Espectrometría de masas

Se determinó la masa desglucosilada total de los anticuerpos entrecruzados y se confirmó mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización (EM-IEP). Brevemente, se desglucosilaron 100 mg de anticuerpos purificados con N-glucosidasa F (PNGasaF, ProZyme) 50 mM en KH₂PO₄/K₂HPO₄ 100 mM, pH 7, a 37°C durante 12 a 24 horas a una concentración de proteínas de hasta 2 mg/ml y posteriormente se desalaron mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa de las cadenas pesada y ligera respectivas se determinó mediante EM-IEP tras la desglucosilación y reducción. Brevemente, se incubaron 50 mg de anticuerpo en 115 µl con 60 µl de TCEP 1 M y 50 µl de hidrocloreuro de guanidina 8 M posteriormente desalado. Se determinó la masa total y la masa de las cadenas pesada y ligera reducidas mediante EM-IEP en un sistema de EM Q-Star Elite dotado de una fuente NanoMate[®].

55 IGF-1R, EGFR, HER3 y c-Met ECD Biacore

Se investigó la unión de los anticuerpos generados a los DEC (dominios extracelulares) de IGF-1R, EGFR, HER3 y c-Met, mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para las mediciones de afinidad, se inmovilizaron anticuerpos JIR 109-005-098 de cabra anti-IgG humana en un chip CM5 mediante acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos contra DEC humanos etiquetados con Fc. Se midió la unión en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005%, pH 7,4), 25°C. Se añadió DEC de c-Met, IGF-1R o EGFR (R&D Systems o purificado en el propio laboratorio) en solución a diversas concentraciones. Se midió la asociación mediante una

inyección de DEC de 80 segundos a 3 minutos; la disociación se midió mediante lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 a 10 minutos y se estimó un valor de K_D utilizando un modelo de unión Langmuir 1:1. Debido a la baja densidad de carga y nivel de captura, se obtuvo una unión monovalente de DEC. Se restaron los datos de control negativo (por ejemplo las curvas del tampón) de las curvas de muestras para la corrección de la deriva intrínseca de la línea base del sistema y para la reducción de la señal de ruido. Se utilizó el programa Biacore T100 Evaluation versión 1.1.1, para el análisis de los sensorgramas y para el cálculo de los datos de afinidad. La figura 11 muestra un esquema del ensayo Biacore.

BIACORE de unión de ANGPT2 y de VEGF

También se investigó la unión de los anticuerpos generados a ANGPT2 y VEGF humanos mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para las mediciones de afinidad se inmovilizaron anticuerpos policlonales <hIgG-Fcg> de cabra en un chip CM5 ó CM4 mediante acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos contra ANGPT2 y VEGF humanos. Se midió la unión en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005%, pH 7,4) con o sin Ca^{2+} 5 mM, a 25°C. Se añadió ANGPT2-His o VEGF165/VEGF121-His purificados, respectivamente (R&D Systems o purificados en el propio laboratorio) a diversas concentraciones en solución. Se midió el grado de asociación mediante una inyección de ANGPT2/VEGF de 3 minutos; la disociación se midió mediante lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 a 5 minutos y se estimó un valor de K_D utilizando un modelo de unión Langmuir 1:1. Se restaron los datos de control negativo (por ejemplo las curvas del tampón) de las curvas de muestras para la corrección de la deriva intrínseca de la línea base del sistema y para la reducción de la señal de ruido. Se utilizó el programa Biacore T100 Evaluation versión 1.1.1, para el análisis de los sensorgramas y para el cálculo de los datos de afinidad.

Unión simultánea en BIACORE

Unión simultánea de anticuerpos tetraespecíficos y trispecíficos a EGFR, IGF-1R, Ang-2 y VEGF o EGFR, IGF-1R, HER3 y c-Met o EGFR, Ang-2 y VEGF, respectivamente.

Se comparó la unión de los formatos de anticuerpo tetraespecífico o trispecífico con la unión de las IgG “de tipo salvaje” a partir de las que se derivaron los módulos de unión y los anticuerpos biespecíficos. Estos análisis se llevaron a cabo mediante la aplicación de resonancia de plasmón superficial (Biacore), tal como se ha indicado anteriormente. Con el fin de mostrar la unión simultánea, se analizaron las propiedades de unión mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un instrumento Biacore T100 (Biacore AB, Uppsala).

Se capturó anticuerpo anti-IgG humana sobre la superficie de un chip biosensor CM5 utilizando la reacción de acoplamiento de aminas. Se activaron las celdas de flujo con una mezcla 1:1 de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida 0,1 M a un caudal de 5 μ l/min. Se inyectó anticuerpo anti-IgG humana en acetato sódico, pH 5,0 a una concentración de 10 mg/ml, que resultó en una densidad superficial de aproximadamente 12.000 RU. Se trató una celda de flujo de control de referencia de la misma manera, aunque con tampones de vehículo únicamente en lugar del anticuerpo de captura. Las superficies se bloquearon con una inyección de etanolamina 1 M/HCl, pH 8,5. Los anticuerpos multiespecíficos se diluyeron en HBS-P y se inyectaron a un caudal de 5 μ l/min. El tiempo de contacto (fase de asociación) fue de 1 minuto para los anticuerpos, a una concentración de entre 1 y 50 nM. Se inyectaron EGFR/IGF-1R/HER3/c-Met-DEC y Ang-2 ó VEGF, respectivamente, a concentraciones crecientes. Todas las interacciones se llevaron a cabo a 25°C (temperatura estándar). Se inyectó la solución de regeneración de cloruro de magnesio 3 M durante 60 segundos a un caudal de 5 μ l/min para eliminar cualquier proteína unida no covalentemente tras cada ciclo de unión. Se detectaron las señales a una tasa de una señal por segundo. Las muestras se inyectaron a concentraciones crecientes.

Ejemplo 1

Producción, expresión, purificación y caracterización de un anticuerpo tetraespecífico y tetravalente que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R

En un primer ejemplo, se construyó un anticuerpo tetraespecífico y tetravalente que reconocía angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R, fusionando mediante un conector $(G_4S)_4$, un scFv estabilizado con disulfuro contra EGFR con la parte C-terminal de la primera cadena pesada, y un scFv contra IGF-1R con la parte C-terminal de la segunda cadena pesada de un anticuerpo con intercambio de dominios CH1/CL(C_{kappa}) con botones-en-ojales que reconocía angiopoyetina-2 y VEGF con sus dominios variables (fig. 4a). Las secuencias de las 4 cadenas de anticuerpo respectivas se proporcionan en SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.

Datos clave	
Expresión (rendimiento) -mg/ml	14,5
Purificación (homogeneidad según prot. A) -%	91,3
Rendimiento tras CET-mg/ml	10,4
Homogeneidad tras CET preparativa -%	99,7

5 En un segundo ejemplo, se construyó un anticuerpo tetraespecífico y tetravalente que reconocía angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R fusionando mediante un conector (G₄S)₂- un scFab contra EGFR con la parte C-terminal de la primera cadena pesada y un scFab contra IGF-1R con la parte C-terminal de la segunda cadena pesada de un anticuerpo con intercambio de dominios CH1/CL(C_{kappa}) con botones-en-ojales que reconocía angiopoyetina-2 y VEGF con sus dominios variables (fig. 4b). Las secuencias de las 4 cadenas de anticuerpo respectivas se proporcionan en SEC ID n° 1, SEC ID n° 5, SEC ID n° 3 y SEC ID n° 6.

Datos clave	
Expresión (rendimiento) -mg/ml	12,2
Purificación (homogeneidad según prot. A) -%	74,4
Rendimiento tras CET-mg/ml	6,8
Homogeneidad tras CET preparativa -%	98,4

10 En un ejemplo adicional análogo al segundo ejemplo, se construyó un anticuerpo tetraespecífico y tetravalente que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R fusionando, mediante un conector (G₄S)₂-, un scFab contra EGFR con la parte C-terminal de la segunda cadena pesada, y un scFab contra IGF-1R con la parte C-terminal de la primera cadena pesada de un anticuerpo con intercambio de dominios CH1/CL (C_{kappa}) con botones-en-ojales que reconocía angiopoyetina-2 y VEGF con sus dominios variables (análogamente a la fig. 4b, aunque con un scFab contra IGF-1R fusionado con el botón-cadena pesada de unión a ANG2, y un scFab contra EGFR fusionado con ojales-cadena pesada de unión a VEGF). Las secuencias de las 4 cadenas de anticuerpo respectivas se proporcionan en SEC ID n° 1, SEC ID n° 3, SEC ID n° 9 y SEC ID n° 10.

20 Estos anticuerpos variantes se generaron tal como se ha indicado anteriormente, en la sección de métodos generales, mediante técnicas clásicas de biología molecular, y se expresaron transitoriamente en células HEK293F tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, se purificaron del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Los productos obtenidos se caracterizaron para su identificación mediante espectrometría de masas y para sus propiedades analíticas, tales como la pureza, mediante SDS-PAGE, contenido de monómeros y estabilidad (figuras 8-9, basándose en las secuencias SEC ID n° 1, SEC ID n° 3, SEC ID n° 9 y SEC ID n° 10).

30 Se demostró la unión (simultánea) de las cuatro especificidades de anticuerpo a los cuatro antígenos cubiertos (angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R) mediante Biacore utilizando los métodos descritos anteriormente.

Tabla: Unión de anticuerpo tetraespecífico y tetravalente que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R, basándose en las secuencias SEC ID n° 1, SEC ID n° 3, SEC ID n° 9 y SEC ID n° 10.

Analito	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (nM)
EGFR (HER1)	3,1x10 ^{5*}	3,9x10 ^{-5*}	12.8*
IGF-1R			Baja afinidad de unión
Ang-2	n.d.***	n.d.***	138 ***
VEGF	5,0x10 ^{4*}	10 ^{-6*}	10 ^{-11*}
* Captura mediante anticuerpo anti-humano ** Captura mediante HER1 *** Superficie de Ang-2			

Ejemplo 2

35 Producción, expresión, purificación y caracterización de un anticuerpo trispecífico y tetravalente que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR

40 En un primer ejemplo, se construyó un anticuerpo trispecífico y tetravalente que reconocía angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R fusionando mediante un conector (G₄S)₄- un scFv estabilizado con disulfuro contra EGFR con las partes C-terminales de las dos cadenas pesadas de un anticuerpo con intercambio de dominios CH1/CL(C_{kappa}) con botón-en-ojal que reconoce angiopoyetina-2 y VEGF con sus dominios variables (fig. 5a). Las secuencias de las 4 cadenas de anticuerpo respectivas se proporcionan en SEC ID n° 1, SEC ID n° 2, SEC ID n° 3 y SEC ID n° 7.

Datos clave	
Expresión (rendimiento) -mg/ml	20,1
Purificación (homogeneidad según prot. A) -%	64,1
Rendimiento tras CET-mg/ml	12,0
Homogeneidad tras CET preparativa -%	100

Tabla: Unión de un anticuerpo trispecífico y tetravalente que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR según la fig. 5a.

5

Afinidad de unión a:	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
EGFR (HER1)	4,7E+04	2,3E-04	6
Ang-2_h	1E+06	1,7E-04	0,2
VEGF_h	1E+05	< 1 E-06	< 0,1

10 En un segundo ejemplo, se construyó un anticuerpo trispecífico y tetravalente que reconocía angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R fusionando mediante un conector (G₄S)₂- dos scFab contra EGFR con las partes C-terminales de las dos cadenas pesadas de un anticuerpo con intercambio de dominios CH1/CL(C_{kappa}) con botón-en-
 15 ojla que reconocía angiopoyetina-2 y VEGF con sus dominios variables (fig. 5b). Las secuencias de las 4 cadenas de anticuerpo respectivas se proporcionan en SEC ID n° 1, SEC ID n° 5, SEC ID n° 3 y SEC ID n° 9.

20 Estos anticuerpos variantes se generaron tal como se ha indicado anteriormente, en la sección de métodos generales, mediante técnicas clásicas de biología molecular, y se expresaron transitoriamente en células HEK293F tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, se purificaron del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Los productos obtenidos se
 25 caracterizaron para su identidad mediante espectrometría de masas, y para sus propiedades analíticas, tales como la pureza, mediante SDS-PAGE, contenido de monómeros y estabilidad (figuras 10-11, basándose en las secuencias SEC ID n° 1, SEC ID n° 5, SEC ID n° 3 y SEC ID n° 9).

Se demostró la unión (simultánea) de las cuatro especificidades de anticuerpo a los tres antígenos cubiertos (angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR) mediante Biacore utilizando los métodos anteriormente descritos.

Tabla: Unión de un anticuerpo trispecífico y tetravalente que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR según la fig. 5b.

Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
EGFR (HER1)	3,7x10 ^{4*}	3,4x10 ^{-4*}	2.7*
Ang-2	n.d.**	n.d.**	176**
VEGF	6,7x10 ^{4*}	10 ^{-6*}	<0.01*
* Captura mediante anticuerpo anti-humano			
** Superficie de Ang-2			

Ejemplo 3

30 Producción, expresión, purificación y caracterización de un anticuerpo trispecífico y trivalente que reconoce angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR

35 En un primer ejemplo, se construyó un anticuerpo trispecífico y trivalente que reconocía angiopoyetina-2, VEGF-A, EGFR e IGF-1R fusionando mediante un conector (G₄S)₄- un scFv estabilizado con disulfuro contra EGFR con las partes C-terminales de las dos cadenas pesadas de un anticuerpo con intercambio de dominios CH1/CL(C_{kappa}) con botón-en-
 40 ojla que reconocía angiopoyetina-2 y VEGF con sus dominios variables (fig. 6). Las secuencias de las 4 cadenas de anticuerpo respectivas se proporcionan en SEC ID n° 1, SEC ID n° 2, SEC ID n° 3 y SEC ID n° 8.

45 Este anticuerpo variante se generó tal como se ha indicado anteriormente, en la sección de métodos generales, mediante técnicas clásicas de biología molecular, y se expresó transitoriamente en células HEK293F tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, se purificaron del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Los productos obtenidos se caracterizaron para su identidad mediante espectrometría de masas y propiedades analíticas, tales como la pureza mediante SDS-PAGE, contenido de monómeros y estabilidad.

Datos clave	
Expresión (rendimiento) -mg/ml	40,9
Purificación (homogeneidad según prot. A) -%	77,3
Rendimiento tras CET-mg/ml	22,3
Homogeneidad tras CET preparativa -%	100

Se demostró la unión (simultánea) de las cuatro especificidades de anticuerpo a los tres antígenos cubiertos (angiopoyetina-2, VEGF-A y EGFR) mediante Biacore utilizando los métodos anteriormente descritos.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

10

<120> Anticuerpos triespecíficos o tetraespecíficos

<130> 26144 WO

<150> EP 09007052.5

15

<151> 2009-05-27

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> cadena ligera de <Ang-2>

30

<400> 1

ES 2 439 802 T3

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 2
 <211> 725

ES 2 439 802 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> botón-cadena pesada de <Ang-2> con scFv <EGFR> fusionado C-terminalmente

<400> 2

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

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

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

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

10 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 439 802 T3

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

ES 2 439 802 T3

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 465 470 475 480

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser
 485 490 495

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys
 500 505 510

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

ES 2 439 802 T3

515					520					525					
Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
	530					535					540				
Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
545					550					555					560
Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				565					570					575	
Arg	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Val	Met	Asp	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly
			580					585					590		
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		595					600					605			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr
	610					615					620				
Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile
625					630					635					640
Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln
				645					650					655	
Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Asn	Thr	Asn	Asn
			660					665					670		
Leu	Gln	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
		675					680					685			
Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
	690					695					700				
Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Phe	Pro	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr
705					710					715					720
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys											
				725											

<211> 212
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> cadena ligera de <VEGF> con intercambio de CH1-CL

<400> 3

ES 2 439 802 T3

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

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

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser 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 Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

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

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

ES 2 439 802 T3

180

185

190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
195 200 205

Pro Lys Ser Cys
210

- 5 <210> 4
<211> 718
<212> PRT
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> ojales-cadena pesada de <VEGF> con intercambio CH1-CL y scFv <IGF-1R> fusionado C-terminalmente
<400> 4

ES 2 439 802 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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

ES 2 439 802 T3

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

ES 2 439 802 T3

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

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

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Glu
 465 470 475 480

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg
 485 490 495

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 500 505 510

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile
 515 520 525

Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg
 530 535 540

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 545 550 555 560

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu
 565 570 575

ES 2 439 802 T3

Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser
 580 585 590

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 595 600 605

Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser
 610 615 620

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
 625 630 635 640

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 645 650 655

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 660 665 670

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 675 680 685

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp
 690 695 700

Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
 705 710 715

- <210> 5
- 5 <211> 941
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> botón-cadena pesada de <Ang-2> con scFab <EGFR> fusionado C-terminalmente
- <400> 5

ES 2 439 802 T3

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

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

ES 2 439 802 T3

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255

ES 2 439 802 T3

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 465 470 475 480

ES 2 439 802 T3

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 485 490 495

Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 500 505 510

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro
 515 520 525

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 530 535 540

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His
 545 550 555 560

Asn Ser Phe Pro Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 565 570 575

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 580 585 590

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 595 600 605

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 610 615 620

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 625 630 635 640

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 645 650 655

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 660 665 670

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 675 680 685

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

ES 2 439 802 T3

690						695										700
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	
705					710					715					720	
Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	
				725					730					735		
Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile	His	Trp	Val	Arg	
			740					745					750			
Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Phe	Asn	Pro	Asn	
		755					760					765				
Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	
	770					775					780					
Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	
785					790					795					800	
Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Leu	Ser	Pro	Gly	
				805					810					815		
Gly	Tyr	Tyr	Val	Met	Asp	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	
			820					825					830			
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	
		835					840					845				
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	
	850					855					860					
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	
865					870					875					880	
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	
				885					890					895		
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	
			900					905					910			

ES 2 439 802 T3

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
915 920 925

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
930 935 940

- <210> 6
- 5 <211> 939
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> ojal-cadena pesada de <VEGF> con intercambio CH1-CL y scFab <IGF-1R> fusionado C-terminalmente
- <400> 6

ES 2 439 802 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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140

ES 2 439 802 T3

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

ES 2 439 802 T3

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

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

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
 465 470 475 480

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
 485 490 495

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 500 505 510

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
 515 520 525

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 530 535 540

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys
 545 550 555 560

Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Arg
 565 570 575

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 580 585 590

ES 2 439 802 T3

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 595 600 605

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 610 615 620

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 625 630 635 640

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 645 650 655

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 660 665 670

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly
 675 680 685

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 690 695 700

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Glu Leu Val Glu
 705 710 715 720

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys
 725 730 735

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
 740 745 750

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp
 755 760 765

Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile
 770 775 780

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 785 790 795 800

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg

ES 2 439 802 T3

				805					810					815			
Arg	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Ser	Val	Ser	Ser		
			820					825					830				
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys		
		835					840					845					
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr		
	850					855					860						
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser		
865					870					875					880		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser		
				885					890					895			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr		
			900					905					910				
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
		915					920					925					
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His							
	930					935											

<210> 7
 <211> 723
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> ojal-cadena pesada de <VEGF> con intercambio CH1-CL y scFv <EGFR> fusionado C-terminalmente

<400> 7

ES 2 439 802 T3

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

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

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
 465 470 475 480

ES 2 439 802 T3

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
 485 490 495

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
 500 505 510

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe
 515 520 525

Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg
 530 535 540

Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 545 550 555 560

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu
 565 570 575

Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 580 585 590

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 610 615 620

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 625 630 635 640

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
 645 650 655

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln
 660 665 670

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
 675 680 685

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 690 695 700

ES 2 439 802 T3

Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
705 710 715 720

Glu Ile Lys

<210> 8
<211> 457
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> ojal-cadena pesada de <VEGF> con intercambio de CH1-CL

<400> 8

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
130 135 140

ES 2 439 802 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 195 200 205

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 210 215 220

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

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

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

ES 2 439 802 T3

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

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

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 9

<211> 939

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> ojal-cadena pesada de <VEGF> con intercambio CH1-CL y scFab <EGFR> fusionado C-terminalmente

<400> 9

ES 2 439 802 T3

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 195 200 205

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 210 215 220

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

ES 2 439 802 T3

Arg Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
515 520 525

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
530 535 540

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser
545 550 555 560

Phe Pro Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
565 570 575

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
580 585 590

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
595 600 605

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
610 615 620

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
625 630 635 640

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
645 650 655

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
660 665 670

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
675 680 685

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
690 695 700

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
705 710 715 720

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
725 730 735

ES 2 439 802 T3

Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala
740 745 750

Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly
755 760 765

Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala
770 775 780

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
785 790 795 800

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr
805 810 815

Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
820 825 830

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
835 840 845

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
850 855 860

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
865 870 875 880

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
885 890 895

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
900 905 910

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
915 920 925

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
930 935

<210> 10
<211> 941
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> botón-cadena pesada de <Ang-2> con scFab <IGF-1R> fusionado C-terminalmente

10

<400> 10

ES 2 439 802 T3

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

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

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

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

ES 2 439 802 T3

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

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

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

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

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

ES 2 439 802 T3

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 465 470 475 480

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 485 490 495

Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 500 505 510

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 515 520 525

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 530 535 540

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
 545 550 555 560

Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ser
 565 570 575

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 580 585 590

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 595 600 605

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 610 615 620

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

ES 2 439 802 T3

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
850 855 860

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
865 870 875 880

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
885 890 895

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
900 905 910

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
915 920 925

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
930 935 940

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo trispecífico o tetraespecífico, que comprende:
 - 5 a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y
 - b) la cadena ligera modificada y la cadena pesada modificada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en las que los dominios variables VL y VH se sustituyen mutuamente, y/o en las que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente, y
 - 10 c) en donde uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales se fusionan mediante un conector de péptidos con el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas ligeras o cadenas pesadas de a) y/o de b).
- 15 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende bajo c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende bajo c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a un tercer antígeno.
- 20 4. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende bajo c) dos péptidos de unión a antígeno idénticos que se unen específicamente a un tercer antígeno.
5. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende bajo c) un péptido de unión a antígeno que se une específicamente a un tercer antígeno y un péptido de unión a antígeno que se une específicamente a un cuarto antígeno.
- 25 6. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los péptidos de unión a antígeno se seleccionan de entre el grupo de un fragmento scFv y un fragmento scFab.
- 30 7. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFv.
8. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFab.
- 35 9. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque los péptidos de unión a antígeno se fusionan con el extremo C-terminal de las cadenas pesadas de a) y/o de b).
- 40 10. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el dominio CH3 de la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa de a) y el dominio CH3 de la cadena pesada modificada del anticuerpo de longitud completa de b) se reúnen, cada uno de ellos, en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo, en el que dicha interfaz se altera para inducir la formación del anticuerpo trispecífico o tetraespecífico, en el que la alteración se caracteriza porque:
 - 45 i) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada, de manera que dentro de la interfaz original del dominio CH3 de una cadena pesada que se reúne con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada del anticuerpo trispecífico o tetraespecífico, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más grande, generando de esta manera una protuberancia en el interior de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que puede situarse en una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada,
 - 50 y
 - ii) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada, de manera que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo trispecífico o tetraespecífico,
 - 55 se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más pequeño, generando de esta manera una cavidad en el interior de la interfaz del segundo dominio CH3 dentro del cual puede situarse una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.
- 60 11. Anticuerpo según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más grande se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), y dicho residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

12. Anticuerpo según la reivindicación 10 ó 11, caracterizado porque ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como el aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de manera que pueda formarse un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.
- 5 13. Método para la preparación de un anticuerpo triespecífico o tetraespecífico según la reivindicación 1 ó 10, que comprende las etapas de:
- a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de:
- 10 aa) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
ab) la cadena ligera modificada y la cadena pesada modificada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en las que los dominios variables VL y VH se sustituyen mutuamente, y/o en las que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente, y
15 ac) en donde uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno a dos antígenos adicionales se fusionan mediante un conector de péptidos al extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas ligeras o de las cadenas pesadas de a) y/o b),
- b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo, y
20 c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.
14. Célula huésped que comprende los vectores según la reivindicación 13.
15. Composición, preferentemente una composición farmacéutica o diagnóstica del anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 12.
- 25 16. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 12 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

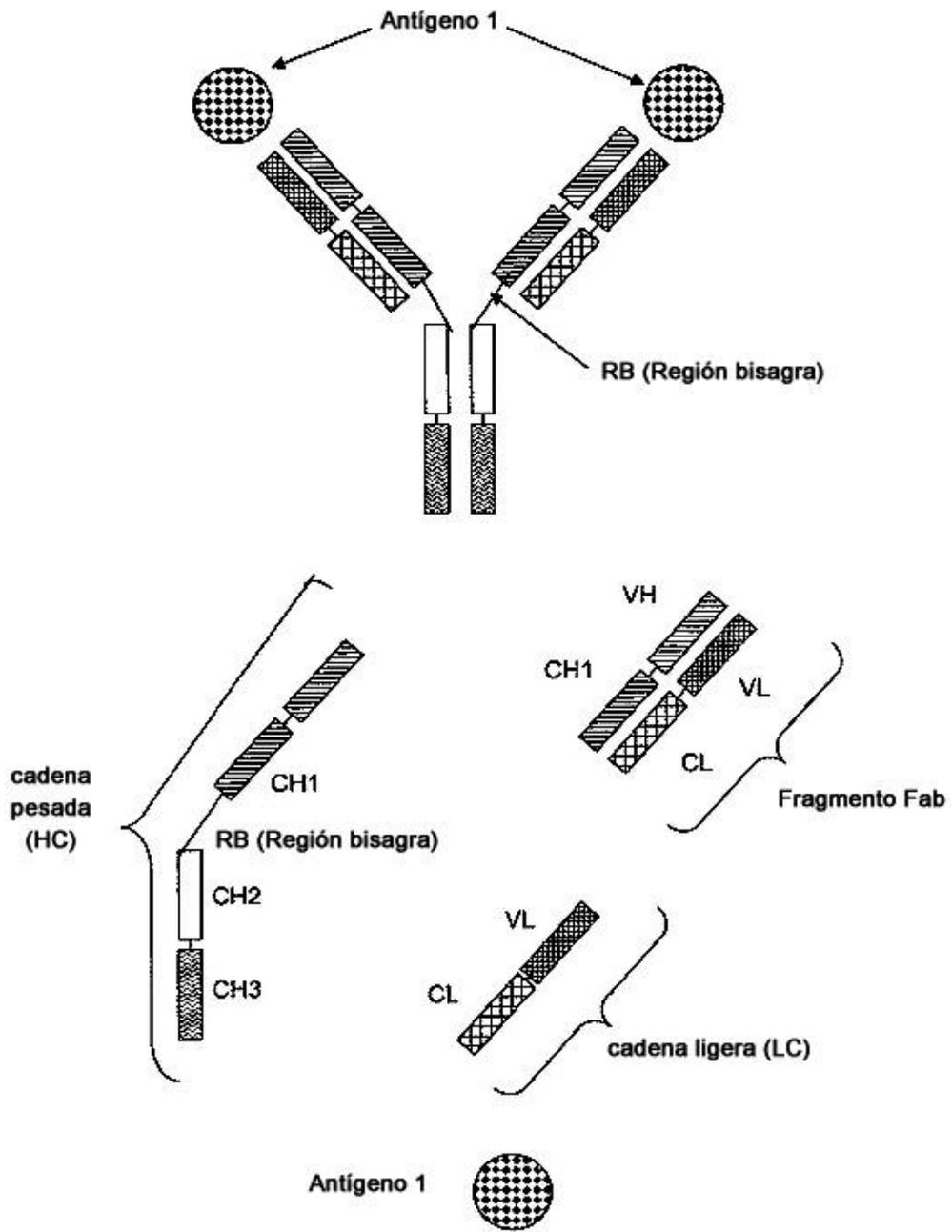


Fig. 2a

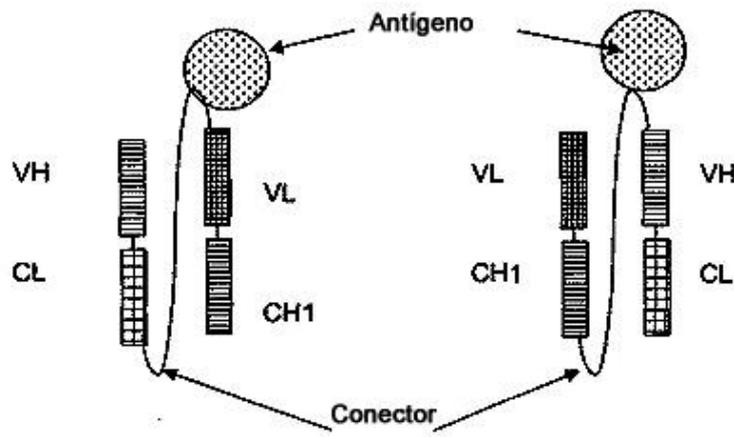
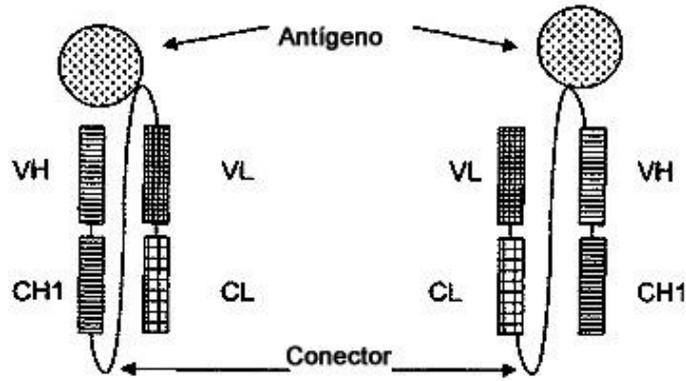


Fig. 2b

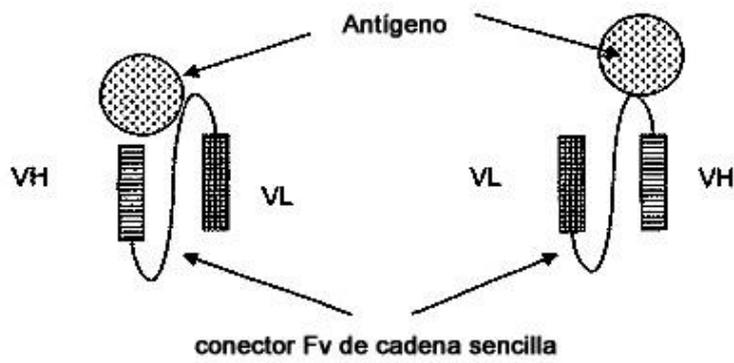


Fig. 3b

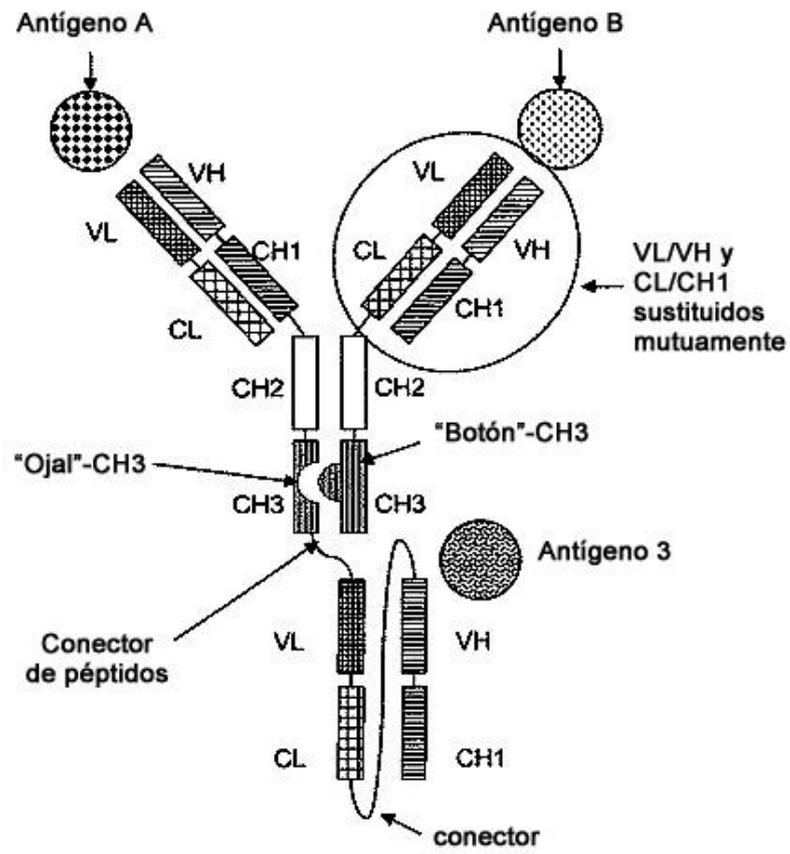


Fig. 3c

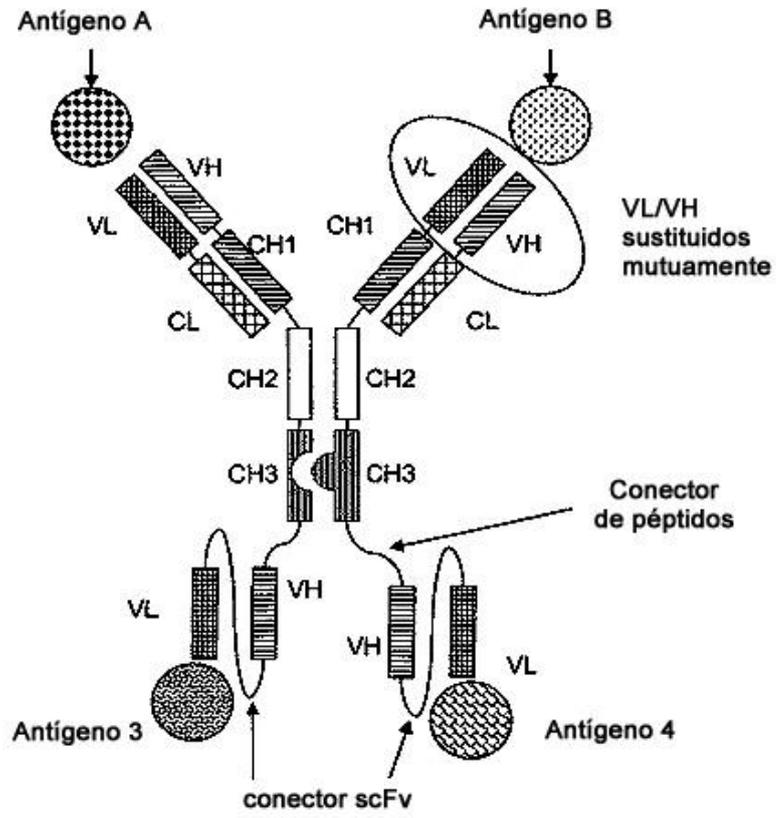


Fig. 3d

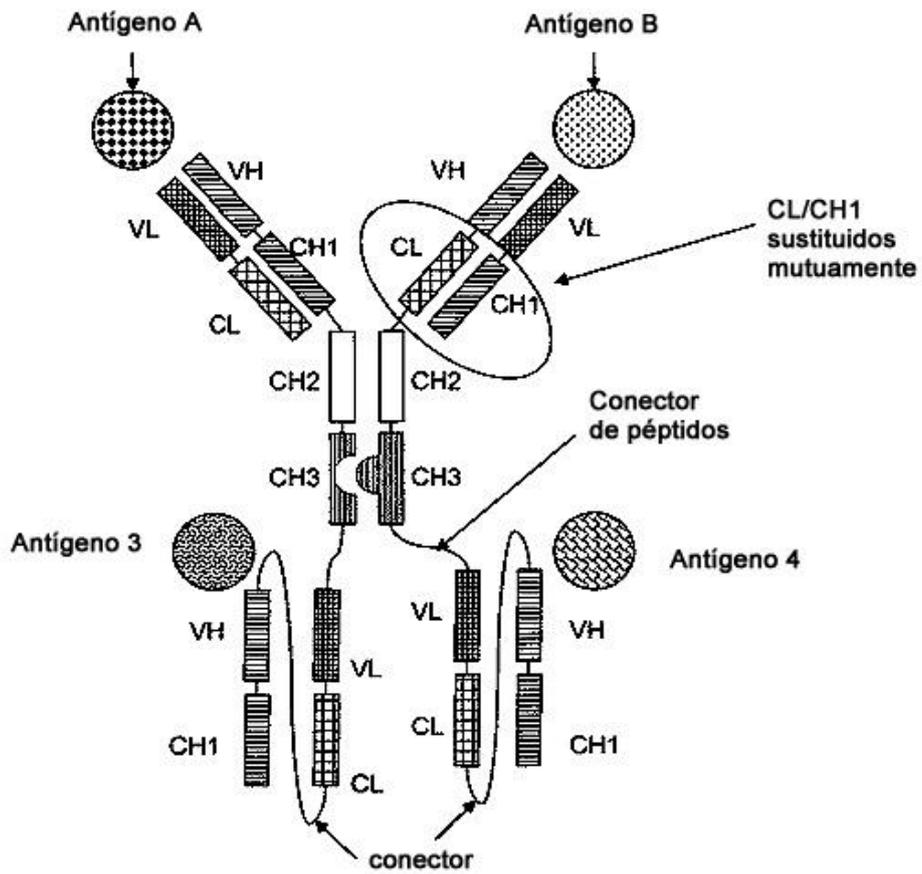


Fig. 4a

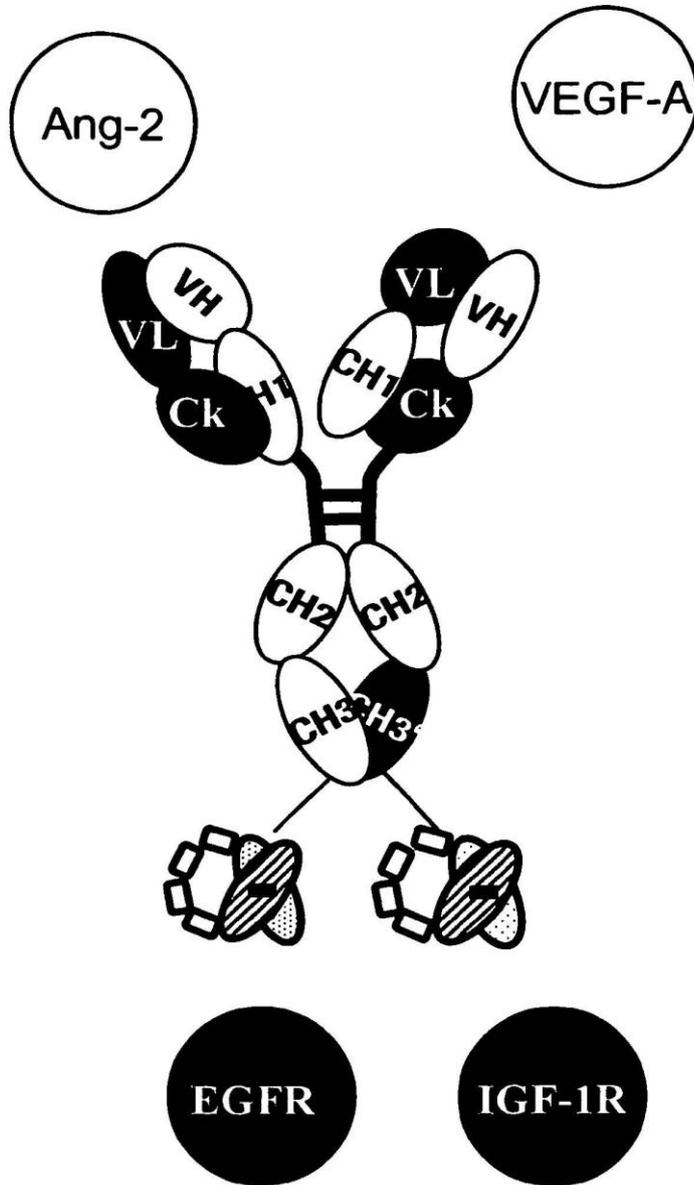


Fig. 4b

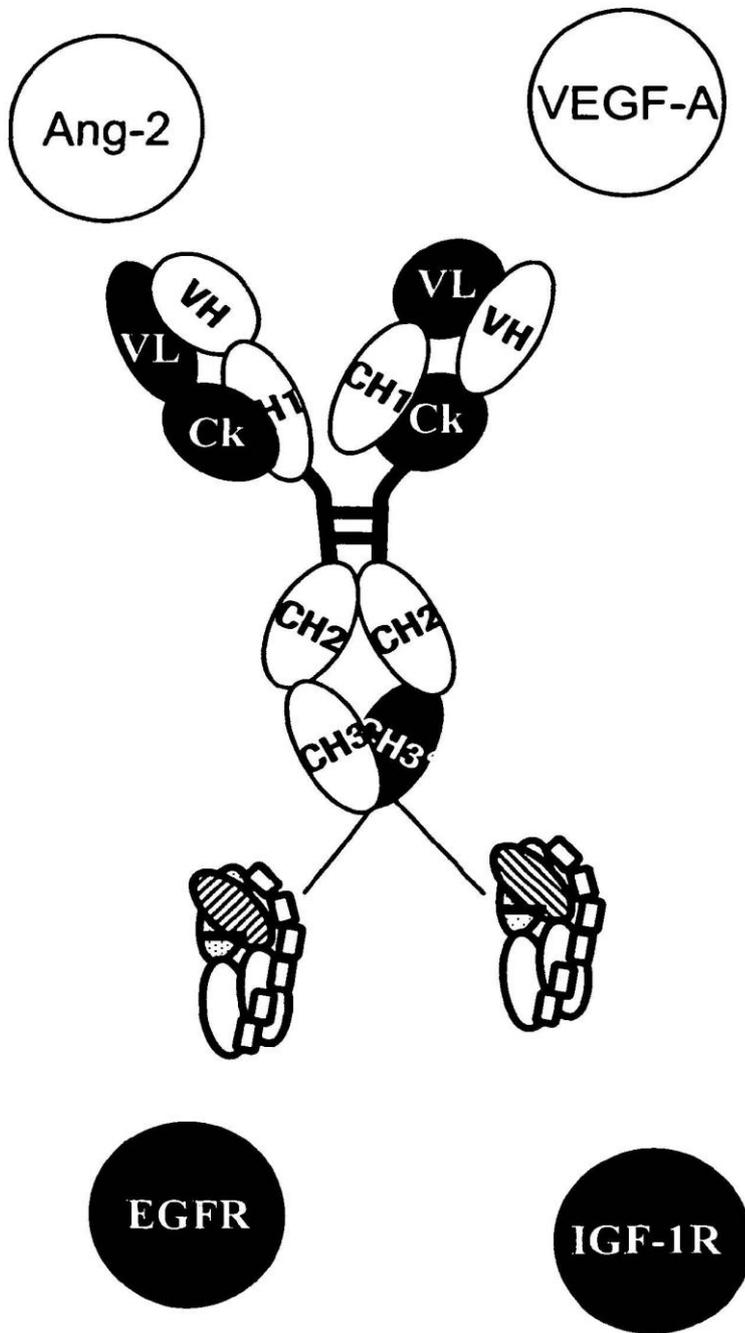


Fig. 5a

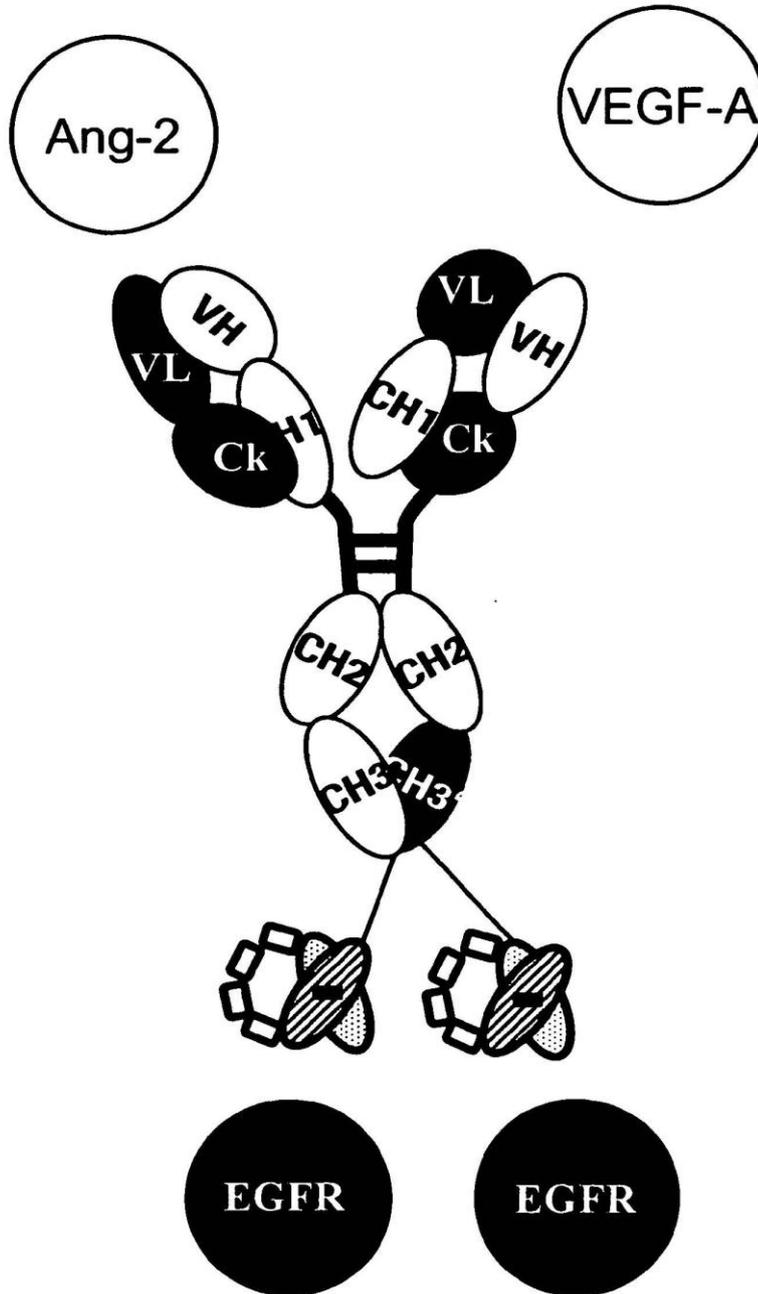


Fig. 5b

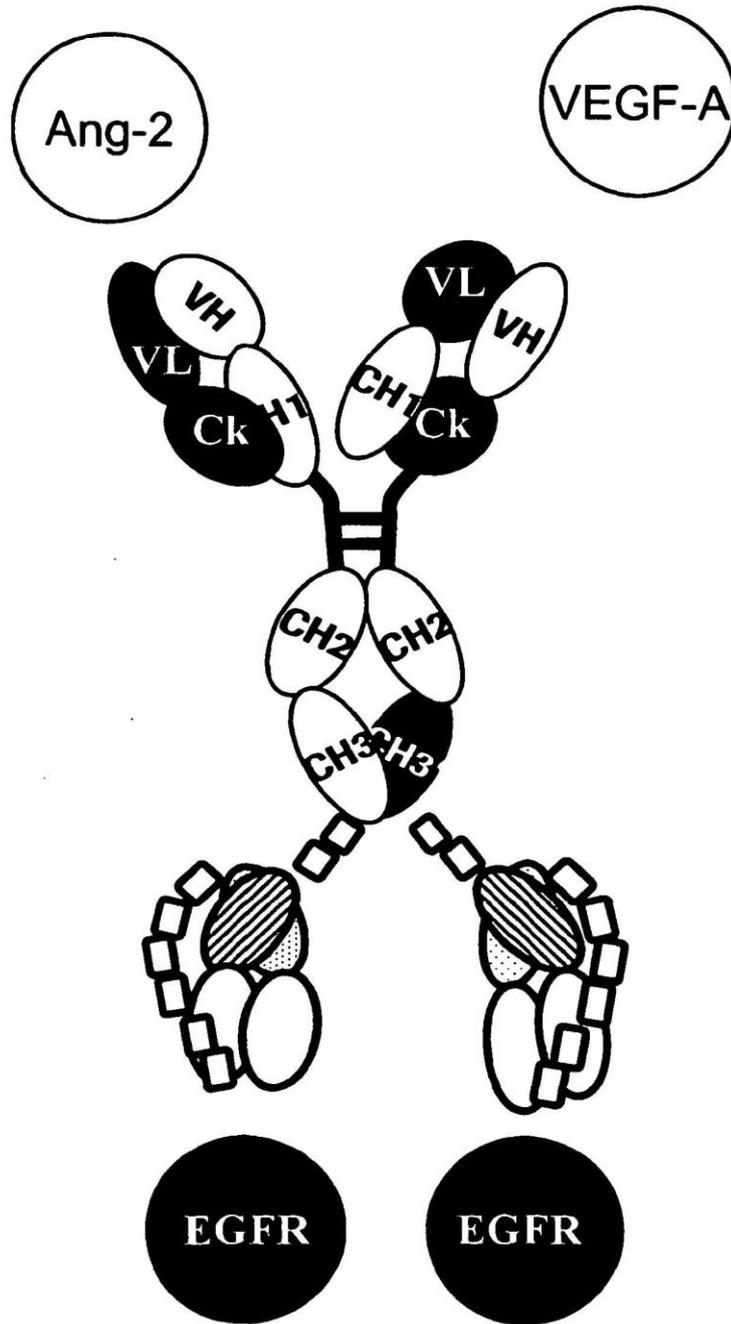


Fig. 6

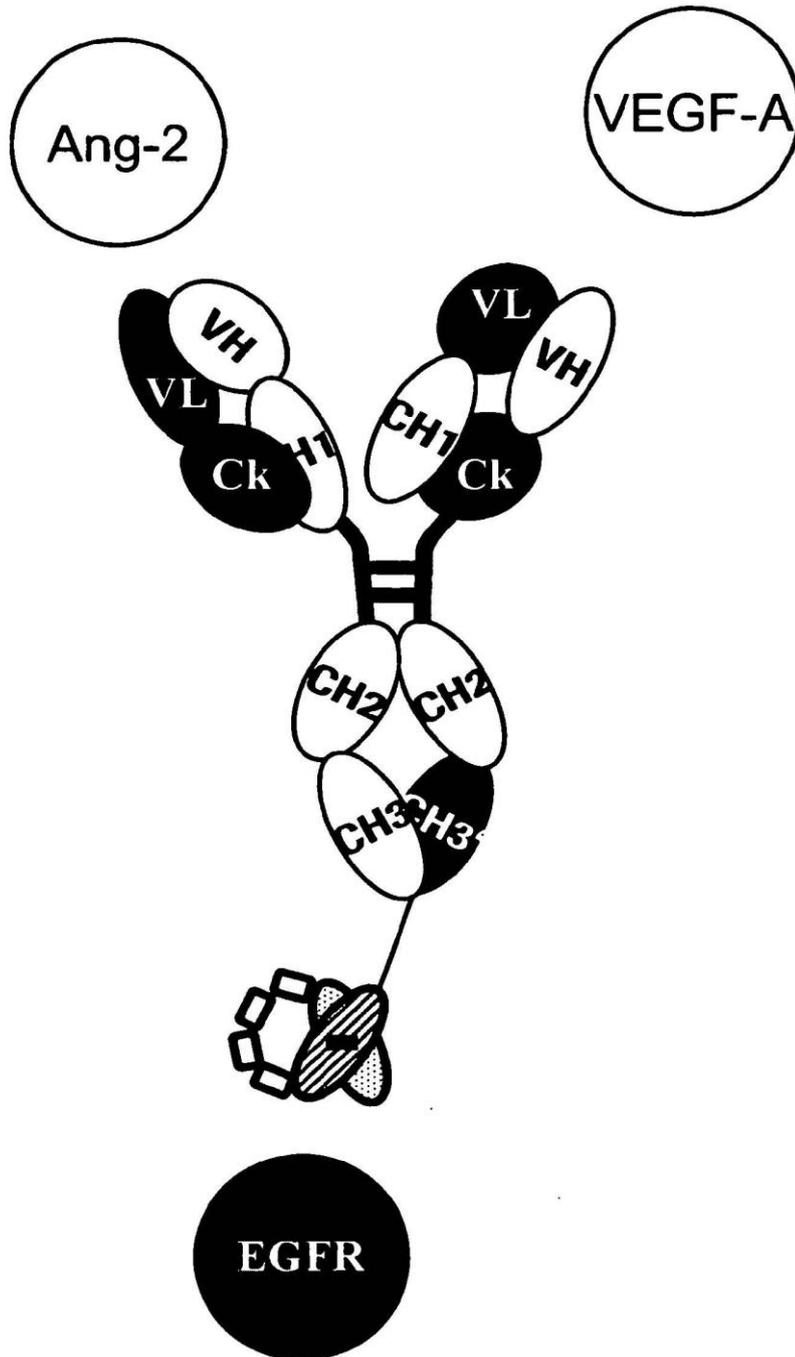


Fig. 7

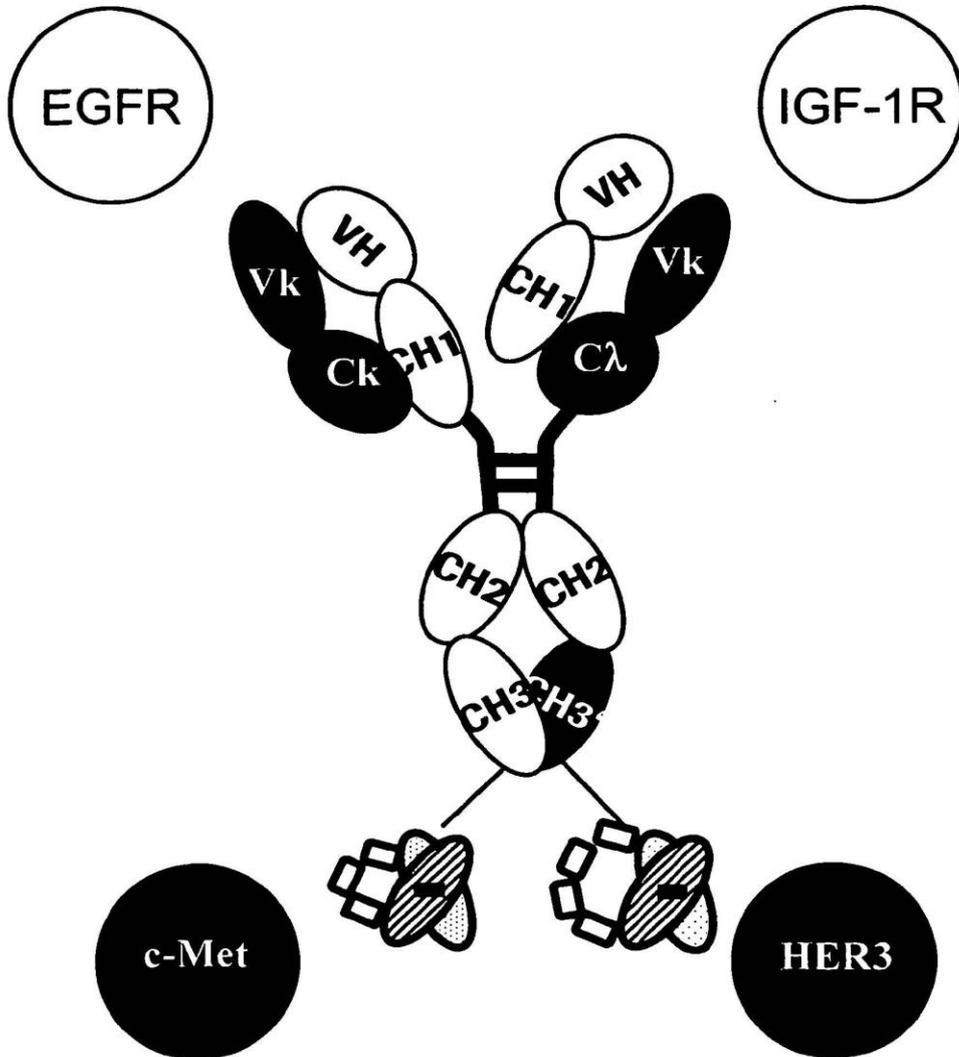


Fig. 8

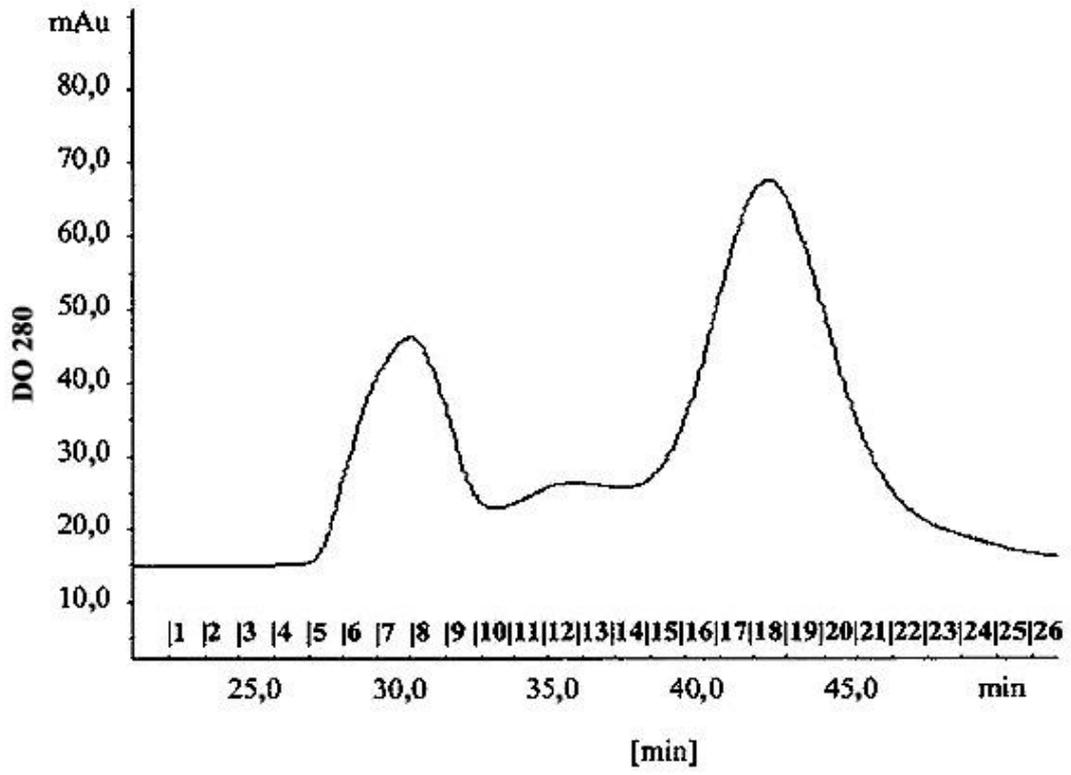


Fig. 9

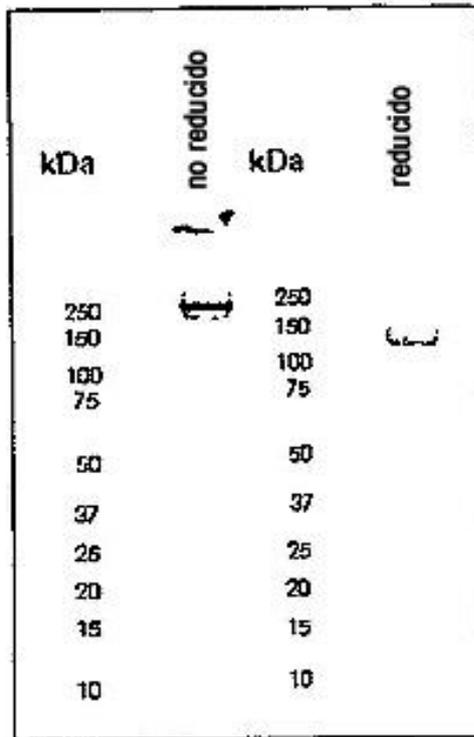


Fig. 10

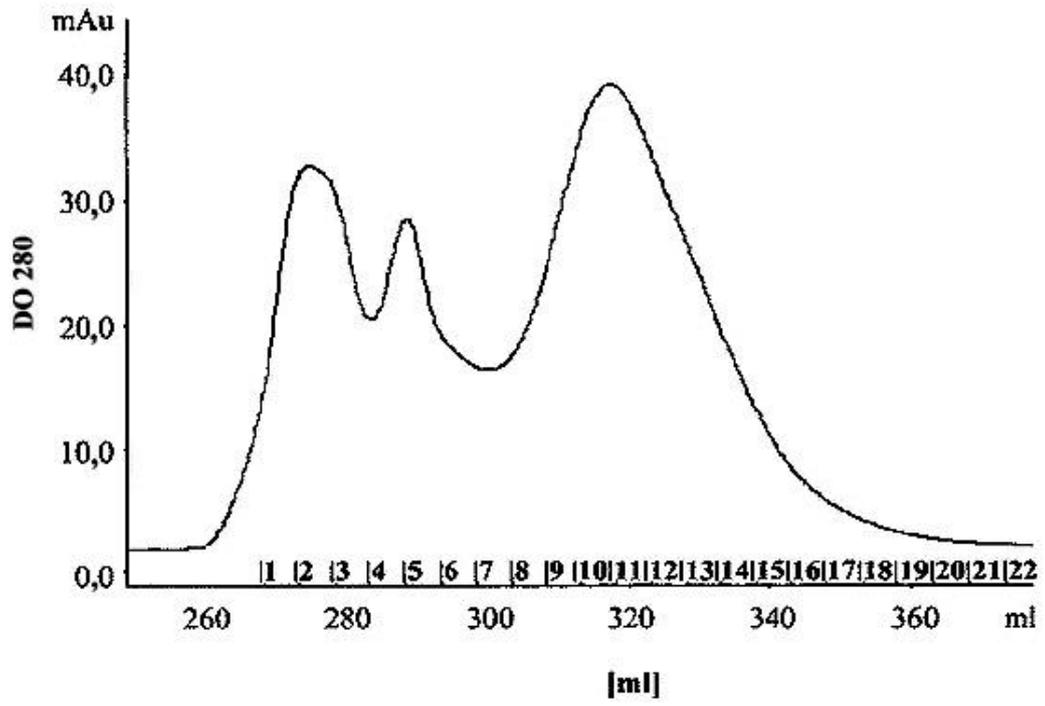


Fig. 11

