

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 917**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2010 E 10724717 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2443153**

54 Título: **Proteínas de unión a antígenos, tetravalentes y biespecíficas**

30 Prioridad:

18.06.2009 EP 09007966

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

14.02.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**IMHOF-JUNG, SABINE;
KLEIN, CHRISTIAN;
REGULA, JÖRG THOMAS;
SCHAEFER, WOLFGANG y
SCHANZER, JÜRGEN MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 442 917 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

Proteínas de unión a antígenos, tetravalentes y biespecíficas

5 La presente invención hace referencia a proteínas de unión a antígenos, tetravalentes y biespecíficas, a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que incluyen dichos anticuerpos, y a las utilidades de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas diseñadas, tales como los anticuerpos bi- o multiespecíficos capaces de unir dos o más antígenos son conocidas en la materia. Tales proteínas de unión multiespecífica pueden generarse mediante la utilización de la fusión celular, la conjugación química o las técnicas de DNA recombinante.

15 En los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de formatos de anticuerpos multiespecíficos recombinantes, como por ejemplo los anticuerpos biespecíficos tetravalentes mediante la fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena simple (véase, por ejemplo, Coloma, M.J., et. al., Nature Biotech. 15 (1997) 159-163; la patente WO 2001/077342; y Morrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234).

20 También se han desarrollado varios formatos diferentes en los que no se mantiene la estructura nuclear del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), tales como dia-, tria- o tetracuerpos, minicuerpos y varios formatos de cadena simple (scFv, bis-scFv) capaces de unir dos o más antígenos (Holliger, P., et. al., Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., y Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et. al., J. Immunol. Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297).

25 Todos estos formatos utilizan enlazantes para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a una proteína de unión adicional (por ejemplo, scFv) o para fusionar, por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv (Fischer, N., y Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). Aunque sea obvio que los enlazantes son ventajosos en el diseño de anticuerpos biespecíficos, también pueden ocasionar problemas en los ajustes terapéuticos. Además, estos péptidos extraños pueden provocar una respuesta inmunológica frente al mismo enlazante o frente al enlace entre la proteína y el enlazante. Adicionalmente, la naturaleza flexible de estos péptidos los hace más propensos a la escisión proteolítica, conduciendo potencialmente a una pobre estabilidad del anticuerpo, a la agregación y a una inmunogenicidad incrementada. Además, puede ser deseable mantener las funciones efectoras, tales como por ejemplo la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), que se median a través de la porción Fc, mediante el mantenimiento de un alto grado de similitud con los anticuerpos naturales.

30 Por consiguiente, y de forma ideal, cuando se desarrollan anticuerpos biespecíficos se debe intentar que estos sean muy similares a los anticuerpos naturales (como IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) en cuanto a su estructura general, con una mínima desviación de las secuencias humanas.

35 En un enfoque, se han producido anticuerpos biespecíficos muy similares a los anticuerpos naturales mediante la utilización de la tecnología de cuadromas (véase Milstein, C., y Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540) basada en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes que expresa anticuerpos murinos monoclonales con las especificidades deseadas del anticuerpo biespecífico. A causa del emparejamiento aleatorio de dos cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo en la línea celular del hibridohibridoma resultante (o cuadroma), se generan hasta diez especies de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una es el anticuerpo biespecífico funcional deseado. Debido a la presencia de subproductos emparejados erróneamente y a unos rendimientos de producción significativamente reducidos se requieren procedimientos de purificación sofisticados (véase, por ejemplo Morrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234). En general, si se utilizan técnicas de expresión recombinante se mantiene el mismo problema con los subproductos emparejados erróneamente.

40 Un enfoque para solventar el problema de los subproductos emparejados erróneamente, conocido como "botón en ojal", tiene como objetivo forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpo diferentes mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfaz de contacto. En una cadena se reemplazan los aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "ojal". Por contra, los aminoácidos con cadenas laterales grandes se introducen en el otro dominio CH3 para crear un "botón". Mediante la coexpresión de estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que deben ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se observó un mayor rendimiento en la formación de heterodímeros ("botón-ojal") frente a la formación de homodímeros ("ojal-ojal" o "botón-botón") (Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y la patente WO 96/027011). El porcentaje de heterodímeros pudo aumentarse de forma adicional mediante el remodelado de las superficies de interacción de los dos dominios CH3, utilizando un enfoque de presentación de fagos y la introducción de un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant, A.M, et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35). Se describen nuevos enfoques para la tecnología "botón en ojal", por ejemplo en la patente PE 1 870 459 A1. Pese a que este formato parece muy atractivo, no se dispone de datos que describan una progresión hacia su utilización clínica. Una restricción

importante de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos parientes deben ser idénticas para prevenir el emparejamiento erróneo y la formación de moléculas inactivas. Por consiguiente, esta técnica no es apropiada para el desarrollo sencillo de anticuerpos biespecíficos recombinantes frente a dos antígenos a partir de dos anticuerpos frente al primer y al segundo antígeno, dado que se deben optimizar las cadenas pesadas de estos anticuerpos y/o las cadenas ligeras idénticas. Este mismo problema de emparejamiento erróneo permanece cuando se expresan anticuerpos biespecíficos tetravalentes en vez de anticuerpos biespecíficos bivalentes mediante, por ejemplo, la fusión de fragmentos Fab adicionales (cada uno idéntico al fragmento Fab del anticuerpo respectivo que se une al primer o segundo antígeno) a cada extremo C-terminal de la cadena pesada del heterodímero (véase la figura 2).

La patente WO 2006/093794 hace referencia a compuestos de unión a proteínas. La patente WO 99/37791 describe derivados de anticuerpos con múltiples propósitos. Morrison, S.L., et al en J. Immunol, 160 (1998) 2802-2808 hacen referencia a la influencia del intercambio del dominio de la región variable sobre las propiedades funciones de la IgG.

Resumen de la invención

La invención incluye una proteína de unión a antígenos tetravalente y biespecífica, que incluye:

- a) una cadena pesada modificada de un primer anticuerpo, que se une de manera específica a un primer antígeno, y sobre cuyo extremo C-terminal de dicha cadena pesada se fusionan de manera adicional los dominios VH-CH1 de dicho primer anticuerpo mediante sus extremos N-terminal;
- b) dos cadenas ligeras de dicho primer anticuerpo de a);
- c) una cadena pesada modificada de un segundo anticuerpo, que se une de manera específica a un segundo antígeno, en el que el dominio CH1 se reemplaza por el dominio CL de dicho segundo anticuerpo y sobre cuyo extremo C-terminal de dicha cadena pesada se fusionan de manera adicional los dominios VH-CL de dicho segundo anticuerpo mediante sus extremos N-terminal; y
- d) dos cadenas ligeras modificadas de dicho segundo anticuerpo de c), en las que el dominio CL se reemplaza por el dominio CH1 de dicho segundo anticuerpo.

Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención

que incluye los pasos de

- a) transformar una célula huésped con
 - vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican por una proteína biespecífica de unión a antígenos de acuerdo con la invención
- b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
- c) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

Una realización adicional de la invención es una célula huésped que incluye

- vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican por una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención.

Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que incluye una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención y, al menos, un excipiente farmacológicamente aceptable.

Una realización adicional de la invención es un método para el tratamiento de un paciente que necesita terapia, que se caracteriza por la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la invención, se puede mejorar la proporción entre la proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente deseada y los productos secundarios no deseados mediante la sustitución del dominio CH1 por el dominio CL en la cadena pesada modificada bajo c) y las dos cadenas ligeras correspondientes modificadas bajo d). De esto modo se puede reducir el emparejamiento erróneo no deseado de las cadenas ligeras del anticuerpo que se une de manera específica a un primer antígeno (de b) con los dominios VH-CH1 erróneos de las cadenas pesadas

del anticuerpo modificadas (de c) del anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno. Y de forma análoga se puede reducir el emparejamiento erróneo de las cadenas ligeras modificadas de d) con las cadenas pesadas de a) (véase la figura 2 sin estas modificaciones y con emparejamientos erróneos, y la figura 3 con estas sustituciones (o intercambios) CH1-CL y sin emparejamientos erróneos).

5

Descripción detallada de la invención

La invención incluye una proteína de unión a antígenos tetravalente y biespecífica, que incluye:

10 a) una cadena pesada modificada de un primer anticuerpo, que se une de manera específica a un primer antígeno, y sobre cuyo extremo C-terminal de dicha cadena pesada se fusionan de manera adicional los dominios VH-CH1 de dicho primer anticuerpo a sus extremos N-terminal mediante un conector peptídico;

15 b) dos cadenas ligeras de dicho primer anticuerpo de a);

c) una cadena pesada modificada de un segundo anticuerpo, que se une de manera específica a un segundo antígeno, en el que el dominio CH1 se reemplaza por el dominio CL de dicho segundo anticuerpo y sobre cuyo extremo C-terminal de dicha cadena pesada se fusionan de manera adicional los dominios VH-CL de dicho segundo anticuerpo a sus extremos N-terminal mediante un conector peptídico; y

20 d) dos cadenas ligeras modificadas de dicho segundo anticuerpo de c), en las que el dominio CL se reemplaza por el dominio CH1 de dicho segundo anticuerpo.

25

De acuerdo con la invención, la proporción entre una proteína de unión a antígenos, deseada, biespecífica y tetravalente y los productos secundarios no deseados (debidos al emparejamiento erróneo de las cadenas ligeras del anticuerpo con las cadenas pesadas de anticuerpo erróneas) puede mejorarse mediante la sustitución del dominio CH1 por el dominio CL en la cadena pesada modificada bajo c) y las dos cadenas ligeras modificadas correspondientes bajo d). El emparejamiento erróneo en esta conexión hace referencia a la asociación de i) las cadenas ligeras de un anticuerpo que se une de manera específica a un primer antígeno b) con la cadena pesada modificada de un anticuerpo que se une de manera específica a un segundo antígeno); o ii) las cadenas ligeras de un anticuerpo que se une de manera específica a un segundo antígeno b) con la cadena pesada modificada de un anticuerpo que se une de manera específica a un primer antígeno (véase la figura 2), lo cual conduce a la formación de subproductos inactivos no deseados o que no son completamente funcionales.

35

En un aspecto adicional de la invención, tal proporción mejorada entre un anticuerpo biespecífico, tetravalente y deseado y los productos secundarios no deseados puede mejorarse adicionalmente mediante la introducción de modificaciones en los dominios CH3 de dichos anticuerpos que se unen de manera específica a un primer y un

40

Por consiguiente, en una realización preferible de la invención, los dominios CH3 de dicha proteína de unión a antígenos, biespecífica y tetravalente (en las cadenas pesadas modificadas de a y c) de acuerdo con la invención se pueden alterar mediante la tecnología "botón en ojal", que se describe en detalle con varios ejemplos en, por ejemplo, la patente WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617-621; y Merchant, A.M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681. En este método, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que incluyen esos 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 "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza de forma adicional los heterodímeros (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al. J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) y aumenta el rendimiento.

50

Por consiguiente, en un aspecto de la invención, dicha proteína de unión a antígenos, biespecífica y tetravalente también se caracteriza por que

55 tanto el dominio CH3 de la cadena pesada modificada del anticuerpo de a) como el dominio CH3 de la cadena pesada modificada del anticuerpo de b) se encuentran en la interfaz, que incluye una interfaz original entre los dominios CH3 del anticuerpo;

60 - en el que dicha interfaz se altera para promover la formación de la proteína de unión a antígenos, tetravalente y biespecífica, en la que la alteración se caracteriza por que:

i) el dominio CH3 de una cadena pesada se altera, para que en la interfaz original, el dominio CH3 de una cadena pesada que se encuentra con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada en la proteína de unión a antígenos tetravalente y

65

biespecífica,

se sustituya un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido con una cadena lateral de mayor volumen para generar así una protuberancia en la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada, que se puede colocar en una cavidad de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada

5 y
 ii) el dominio CH3 de la otra cadena pesada se altera, para que en la interfaz original del segundo dominio CH3 que se encuentra con la interfaz original del primer dominio CH3 de la proteína de unión a antígenos tetravalente y biespecífica, se sustituya un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido con una cadena lateral de menor volumen para generar así una cavidad en la interfaz del segundo dominio CH3, en la que se puede colocar una protuberancia de la interfaz del primer dominio CH3.

10 Preferiblemente, tal residuo de aminoácido con una cadena lateral más voluminosa se selecciona a partir del grupo que incluye arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

15 Preferiblemente, tal residuo de aminoácido con una cadena lateral menos voluminosa se selecciona a partir del grupo que incluye alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

20 En un aspecto de la invención, ambos dominios CH3 se alteran de manera adicional mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3 para formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

25 En una realización preferible, dicha proteína de unión a antígenos, biespecífica y tetravalente incluye una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal". También puede utilizarse un puente disulfuro intercatenario adicional entre los dominios CH3 (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681), por ejemplo mediante la introducción de una mutación Y349C en el dominio CH3 de la cadena de "botones" o del "ojal", y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la otra cadena. Por consiguiente, en otra realización preferible, dicha proteína de unión a antígenos, biespecífica y tetravalente incluye las mutaciones S354C y T366W en uno de los dos dominios CH3, y las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o dicha proteína de unión a antígenos, biespecífica y tetravalente incluye las mutaciones E356C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones Y349C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o dicha proteína de unión a antígenos, biespecífica y tetravalente incluye 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 dicha proteína de unión a antígenos, biespecífica y tetravalente incluye 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; (la mutación adicional Y349C en un dominio CH3 y la mutación adicional E356C o S354C en el otro dominio CH3 forman un puente disulfuro intercatenario) (la numeración siempre se corresponde con el índice EU de Kabat). Pero, adicionalmente o de forma alternativa, también se pueden utilizar otras tecnologías "botón en ojal", tal y como se describe en la patente EP 1 870 459 A1. Un ejemplo preferible de dicho anticuerpo trispecífico o tetraespecífico son las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal" (la numeración siempre se corresponde con el índice EU de Kabat).

40 En otra realización preferible, dicho anticuerpo trispecífico o tetraespecífico incluye una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena del ojal" y, de manera adicional, las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

45 En otra realización preferible, dicho anticuerpo trispecífico o tetraespecífico incluye las mutaciones Y349C, T366W mutaciones 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 trispecífico o tetraespecífico incluye 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 de manera adicional las mutaciones R409D; K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K; E357K en el dominio CH3 de la "cadena del ojal".

50 Tal y como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" hace referencia a un anticuerpo de longitud completa que incluye dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo (véase la figura 1). Una cadena pesada de anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que incluye la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante de una cadena pesada de anticuerpo 1 (CH1), una región bisagra del anticuerpo (HR), un dominio constante de una cadena pesada de anticuerpo 2 (CH2), y un dominio constante de una cadena pesada de anticuerpo 3 (CH3), que se abrevia como VH-CH1-HR-CH2-CH3; y de manera opcional, un dominio constante de una cadena pesada de anticuerpo 4 (CH4) en el caso de la subclase de anticuerpo IgE. Preferiblemente, la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que incluye 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 incluye la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo (VL), y un dominio constante de una cadena ligera de anticuerpo (CL), abreviado como

5 VL-CL. El dominio constante de una cadena ligera de anticuerpo (CL) puede ser κ (kappa) o λ (lambda). Las cadenas del anticuerpo se enlazan mediante puentes disulfuro interpolipéptido 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. Algunos ejemplos de anticuerpos de longitud completa típicos son los anticuerpos naturales como la IgG (por ejemplo la IgG1 y la IgG2), la IgM, la IgA, la IgD y la IgE. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser de una única especie, como por ejemplo la humana, o pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados. Los anticuerpos de longitud completa de acuerdo con la invención incluyen dos lugares de unión al antígeno y cada uno está formado por un par de VH y VL, que se unen específicamente al mismo (primer) antígeno. El extremo C-terminal de la cadena pesada o la cadena ligera de dicho anticuerpo de longitud completa incluye el último aminoácido en el extremo C-terminal de dicha cadena pesada o cadena ligera. Dicho anticuerpo incluye dos fragmentos Fab idénticos que incluyen los dominios VH y CH1 de la cadena pesada y los dominios VL y CL de la cadena ligera (véase la figura 1).

15 En una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención, los dominios CH1 y CL del segundo anticuerpo que se une de manera específica a un segundo antígeno se sustituyen entre sí conduciendo a las cadenas ligeras modificadas bajo d) y a la cadena pesada de anticuerpo modificada bajo c) a cuyo extremo C-terminal de dicha cadena pesada se fusionan de manera adicional los dominios VH-CL de dicho anticuerpo (que se une de manera específica a un segundo antígeno) a su extremo N-terminal mediante un conector peptídico.

20 Los "dominios VH-CH1" de dicho anticuerpo (que se une de manera específica a un primer antígeno) hacen referencia a los dominios VH y CH1 de dicho anticuerpo en la dirección N-terminal a C-terminal. Y los "dominios VH-CCL" de dicho anticuerpo (que se une de manera específica a un segundo antígeno) hacen referencia a los dominios VH y CH1 de dicho anticuerpo en dirección N-terminal a C-terminal.

25 El término "conector peptídico", tal y como se utiliza en la invención, hace referencia a un péptido con secuencias de aminoácido de origen preferiblemente sintético. Estos conectores peptídicos de acuerdo con la invención se utilizan para fusionar los péptidos de unión a antígenos con el extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas de un anticuerpo de longitud completa y/o anticuerpo de longitud completa modificado para formar una proteína de unión a antígenos biespecífica de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dichos conectores peptídicos bajo c) son péptidos con una secuencia de aminoácidos de una longitud de, al menos, 5 aminoácidos, preferiblemente con una longitud de entre 5 y 100, más preferiblemente de entre 10 y 50 aminoácidos. En una realización, dicho conector peptídico es $(GxS)_n$ o $(GxS)_nG_m$, siendo G = glicina, S = serina, y $(x = 3, n=3, 4, 5 \text{ o } 6, \text{ y } m= 0, 1, 2 \text{ o } 3)$ o $(x = 4, n= 2, 3, 4 \text{ o } 5 \text{ y } m= 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, preferiblemente $x = 4$ y $n= 2 \text{ o } 3$, más preferiblemente con $x = 4, n= 2$. En una realización dicho conector peptídico es $(G_4S)_2$.

35 Tal y como se utilizan aquí, los términos "lugar de unión" o "lugar de unión al antígeno" hacen referencia a la(s) región(es) de una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención en la(s) cual(es) de hecho se une un ligando (por ejemplo el antígeno o el fragmento del antígeno) y la(s) cual(es) deriva(n) de una molécula de anticuerpo o un fragmento de la misma (por ejemplo un fragmento Fab). El lugar de unión al antígeno de acuerdo con la invención incluye un dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo (VH) y un dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo (VL) de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une de manera específica al antígeno deseado.

40 Los lugares de unión al antígeno (es decir, los pares VH/VL) que se unen específicamente al antígeno deseado pueden derivar de a) anticuerpos conocidos frente al antígeno o de b) nuevos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo obtenidos mediante métodos de inmunización *de novo* utilizando, entre otros, proteínas antigénicas, ácidos nucleicos o fragmentos de los mismos, o mediante la utilización de presentación de fagos.

45 Un lugar de unión al antígeno de una proteína de unión a antígenos de la invención contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en la variación del grado de afinidad del lugar de unión por el antígeno. Hay tres CDR en el dominio variable de la cadena pesada variable (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR en el dominio variable de la cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La longitud del CDR y las regiones marco (FR) se determina mediante la comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en los que se han definido estas regiones de acuerdo con la variabilidad entre las secuencias.

50 La especificidad del anticuerpo hace referencia al reconocimiento selectivo del anticuerpo o de la proteína de unión a antígenos por un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen dos especificidades de unión al antígeno diferentes. Cuando un anticuerpo posee más de una especificidad, los epítopos reconocidos pueden asociarse con un único antígeno o con más de un antígeno.

55 El término anticuerpo "mono específico" o proteína de unión a antígenos, tal y como se utiliza aquí, hace referencia a un anticuerpo o proteína de unión a antígenos que posee uno o más lugares de unión y cada uno de ellos se une al mismo epítipo del mismo antígeno.

65

- 5 El término "valente", tal y como se utiliza en la solicitud actual, hace referencia a la presencia de un número específico de lugares de unión en un molécula de anticuerpo. Un anticuerpo natural, por ejemplo, o un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la invención tiene dos lugares de unión y es bivalente. El término "tetravalente", hace referencia a la presencia de cuatro lugares de unión en una proteína de unión a antígenos. El término "biespecífico, tetravalente", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención que tiene cuatro lugares de unión a antígenos de los cuales dos se unen a un primer antígeno y dos a un segundo antígeno (u otro epítipo del antígeno). Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención tienen cuatro lugares de unión y son tetravalentes.
- 10 Los anticuerpos de longitud completa de la invención incluyen regiones constantes de inmunoglobulina de una o más clases de inmunoglobulina. Las clases de inmunoglobulina incluyen los isotipos IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE y, en el caso de IgG e IgA, sus subtipos. En una realización preferible, un anticuerpo de longitud completa de la invención presenta una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG.
- 15 Los términos "anticuerpo monoclonal" o "compuesto de anticuerpo monoclonal", tal y como se utilizan aquí, hacen referencia a la preparación de moléculas de anticuerpo o proteínas de unión a antígenos de un compuesto de aminoácidos único.
- 20 El término "anticuerpo quimérico" hace referencia a un anticuerpo que incluye una región variable, es decir una región de unión, de una fuente o especie y, al menos, una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que habitualmente se prepara mediante técnicas de DNA recombinante. Se prefieren los anticuerpos quiméricos que incluyen una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferibles de "anticuerpo quiméricos" incluidos en la presente invención son aquellos cuya región constante se ha modificado o cambiado respecto al anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación a la unión con C1q y/o la unión al receptor de la Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de clase cambiada". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que incluyen segmentos de DNA que codifican por regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de DNA que codifican por regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpo quiméricos incluyen técnicas convencionales de DNA recombinante y de transfección, que se conocen en la materia, Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81 (1984) 6851-6855; US 5.202.238 y US 5.204.244.
- 25 El término "anticuerpo humanizado" hace referencia a anticuerpos en los que se han modificado las regiones marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) para incluir las CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la inmunoglobulina pariente. En una realización preferible, se injerta una CDR murina en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado." Véase, por ejemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferibles se corresponden con aquellas que representan secuencias que reconocen los antígenos descritos con anterioridad para los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" incluidos en la presente invención son aquellos en los que se ha modificado o cambiado adicionalmente la región constante respecto al anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación a la unión con C1q y/o la unión al receptor de la Fc (FcR).
- 30 El término "anticuerpo humano", tal y como se utiliza aquí, pretende incluir los anticuerpos que poseen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos se conocen en la materia (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógena. La transferencia del array del gen de la inmunoglobulina de línea germinal humana en tal línea germinal de ratón mutante resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la presentación del antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en librerías de presentación de fagos (Hoogenboom, H.R., y Winter, G.J., Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). También están disponibles las técnicas de Cole, S.P.C., et al. y Boerner et al. para la preparación de anticuerpos humanos monoclonales (Cole, S.P.C., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985); y Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Tal y como se ha comentado para los anticuerpos quiméricos y humanizados, de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano" tal y como se utiliza aquí también incluye tales anticuerpos modificados en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación a la unión con C1q y/o la unión al FcR, por ejemplo mediante el "cambio de clase", es decir el cambio o la mutación de las partes Fc (por ejemplo, a partir de la IgG1 a la IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).
- 35 El término "anticuerpo humano recombinante", tal y como se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos preparados, expresados, creados o aislados mediante técnicas recombinantes tales como los anticuerpos aislados a partir de una célula huésped tal como una célula NSO o CHO, o a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de la inmunoglobulina humana, o anticuerpos expresados mediante la
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

utilización de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes presentan las regiones variables y constantes de modo reorganizado. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención han sido sometidos a hipermutación somática *in vivo*. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan y se relacionan con las secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de la línea germinal humana de anticuerpos *in vivo*.

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)), tal y como se utiliza aquí, hace referencia a cada una del par de cadenas ligeras y pesadas que están involucradas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas ligeras y pesadas humanas variables presentan la misma estructura general y cada dominio incluye cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se conservan completamente, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones 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 se sustentan en sus estructuras tridimensionales mediante las regiones marco y, junto a las CDR de la otra cadena, forman el lugar de unión al antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo juegan un papel importante en la especificidad de unión/afinidad de los anticuerpos de acuerdo con la invención y, por consiguiente, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión al antígeno de un anticuerpo", cuando se utilizan aquí, hacen referencia a los residuos de aminoácido de un anticuerpo responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable incluye residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes a los residuos de la región hipervariable tal y como se definen aquí. Por consiguiente, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo incluyen, del extremo N-terminal al C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las CDR de cada cadena se separan mediante tales aminoácidos marco. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión con el antígeno. Las CDR y las regiones FR se determinan de acuerdo con 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 y como se utilizan aquí, los términos "unir", "unirse de manera específica", o "que se une específicamente a" hacen referencia a la unión del anticuerpo/proteína de unión a antígenos con un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferiblemente en un ensayo de resonancia de plasmones (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) con el antígeno purificado natural. La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de proporción para la asociación del anticuerpo (o anticuerpo o una proteína de unión a antígenos) del complejo anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación), y K_D (k_D/k_a). Unión o unión específica hace referencia a la afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} mol/l o menor, preferiblemente de entre 10^{-9} M y 10^{-13} mol/l. Por consiguiente, una proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente de acuerdo con la invención se une específicamente a cada antígeno para la cual es específica con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} mol/l o menor, preferiblemente de entre 10^{-9} M y 10^{-13} mol/l.

La unión del anticuerpo al $Fc\gamma RIII$ puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de proporción para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación), y K_D (k_D/k_a).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el determinante del epítipo incluye agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, fosforilo o sulfonilo, y en ciertas realizaciones, puede presentar características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo.

En ciertas realizaciones se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando éste reconoce preferiblemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

En una realización adicional, la proteína de unión a antígenos biespecífica de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase humana IgG1, de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A y L235A.

En una realización adicional, la proteína de unión a antígenos biespecífica de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase humana IgG2.

En una realización adicional la proteína de unión a antígenos biespecífica de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase humana IgG3.

En una realización adicional la proteína de unión a antígenos biespecífica de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase humana IgG4 o, de la subclase humana IgG4 con la mutación adicional S228P.

5 Preferiblemente la proteína de unión a antígenos biespecífica de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase humana IgG1, de la subclase humana IgG4 con la mutación adicional S228P.

10 Se ha observado que las proteínas de unión a antígenos biespecíficas de acuerdo con la invención han mejorado sus características, tales como la actividad biológica o farmacológica, las propiedades farmacocinéticas o la toxicidad. Éstas pueden utilizarse, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

15 El término "región constante", tal y como se utiliza en las solicitudes presentes, hace referencia a la suma de dominios de un anticuerpo diferentes a la región variable. La región constante no está involucrada directamente en la unión de un antígeno, pero presenta varias funciones efectoras. En relación a la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y la mayoría de estos se pueden dividir adicionalmente en subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las regiones constantes de la cadena ligera (CL) que pueden hallarse en las cinco clases de anticuerpo se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

20 El término "región constante de origen humano", tal y como se utiliza en la presente solicitud, hace referencia a una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 y/o a la región constante de la cadena ligera kappa o lambda. Tales regiones constantes se conocen en el estado de la materia y se describen, por ejemplo, en Kabat, E.A., (véase, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 72 (1975) 2785-2788).

30 Mientras que los anticuerpos de la subclase IgG4 presentan una unión disminuida al receptor de la Fc (Fc γ RIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG presentan una fuerte unión. No obstante, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidratos de la Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435 son residuos que, si se alteran, también proporcionan una unión disminuida al receptor de la Fc (Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; patente PE 0 307 434).

35 En una realización, una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención presenta una unión reducida al FcR en comparación con un anticuerpo IgG1, y el anticuerpo parental de longitud completa es en lo que se refiere a la unión del FcR de la subclase IgG4 o de las subclases IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene una 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 S228P en la IgG4, y L234A y L235A en la IgG1.

40 La región constante de un anticuerpo está directamente involucrada en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia mediante la unión del factor del complemento C1q con la región constante de la mayoría de las subclases del anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está causada por interacciones definidas de tipo proteína-proteína en el lugar de unión. Tales lugares de unión de la región constante se conocen en el estado de la materia y se describen, por ejemplo, en Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. y Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thomason, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; y la patente EP 0 307 434. Tales lugares de unión de la región constante se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

45 El término "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)" hace referencia a la lisis de células diana humanas mediante una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención, en presencia de células efectoras. Preferiblemente, la ADCC se mide mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan el antígeno con una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención, en presencia de células efectoras tales como células mononucleares del sistema periférico aisladas en fresco o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, como monocitos o células NK o una línea celular NK en crecimiento permanente.

50 El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" hace referencia a un proceso iniciado mediante la unión del factor del complemento C1q con la parte Fc de la mayoría de subclases del anticuerpo IgG. La unión de C1q con un anticuerpo está causada por las interacciones definidas de tipo proteína-proteína en el lugar de unión. Tales lugares de unión de la parte Fc se conocen en el estado de la materia (véase arriba). Tales lugares de unión de la parte Fc se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Habitualmente, los anticuerpos de las subclases IgG1,

IgG2 e IgG3 presentan activación del complemento, incluyendo la unión con C1q y C3, pero la IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q y/o C3.

5 Las funciones efectoras de los anticuerpos monoclonales mediadas por células pueden potenciarse mediante el diseño de su componente oligosacárido, tal y como se describe en Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180, y en la patente US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos terapéuticos más utilizados, son glicoproteínas que presentan un lugar de glicosilación conservado y enlazado a N en Asn297, en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos antenarios complejos enlazados a Asn297 se entierran entre los dominios CH2, lo cual forma muchos contactos con la estructura polipeptídica, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie las funciones efectoras tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M., R., et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A., y Morrison, S., L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). Umana, P., et al. Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y la patente WO 99/54342 mostraron que la sobreexpresión en las células de ovario de hámster chino (CHO) de la β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, aumenta significativamente la actividad *in vitro* de la ADCC de los anticuerpos. Las alteraciones en el compuesto del carbohidrato de la Asn297 o su eliminación también afecta a la unión al Fc γ R y a C1q (Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; Davies, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294; Mimura, Y., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547; Radaev, S., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483; Shields, R., L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Shields, R., L., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L., C., et al., J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147).

Los métodos para potenciar las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se describen, por ejemplo, en las patentes WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2004/065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739.

En una realización preferible de la invención, la proteína de unión a antígenos biespecífica se glicosila (si ésta incluye una parte Fc de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferiblemente de la subclase IgG1 o IgG3) con una cadena glucídica en la Asn297, donde la cantidad de fucosa en dicha cadena glucídica es del 65% o menor (numeración de acuerdo con Kabat). En otra realización, la cantidad de fucosa en dicha cadena glucídica es de entre el 5% y el 65%, preferiblemente de entre el 20% y el 40%. "Asn297" de acuerdo con la invención hace referencia al aminoácido asparagina localizado en la posición 297 en la región Fc. En base a variaciones menores de la secuencia de anticuerpos, la Asn297 también puede localizarse algunos aminoácidos (habitualmente no más de ± 3 aminoácidos) hacia arriba o hacia debajo de la posición 297, es decir entre las posiciones 294 y 300. En una realización, la proteína glicosilada de unión a antígenos de acuerdo con la invención, la subclase de IgG es la subclase humana IgG1, la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A y L235A o la subclase IgG3. En una realización adicional, la cantidad de ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) es del 1% o menor y/o la cantidad de la alfa-1,3-galactosa N-terminal es del 1% o menor en dicha cadena glucídica. Preferiblemente, la cadena glucídica muestra las características de los glicanos enlazados a N y unidos a la Asn297 de un anticuerpo que se expresa de manera recombinante en una célula CHO.

El término "la cadena glucídica muestra las características de los glicanos enlazados a N y unidos a la Asn297 de un anticuerpo que se expresa de manera recombinante en una célula CHO" hace referencia a que la cadena glucídica en la Asn297 del anticuerpo parental de longitud completa de acuerdo con la invención presenta la misma estructura y secuencia de residuos glucídicos, excepto por el residuo de fucosa, que aquellas del mismo anticuerpo expresado en células CHO no modificadas, por ejemplo, como las que se describen en la patente WO 2006/103100.

El término "NGNA", tal y como se utiliza en esta solicitud hace referencia al residuo glucídico ácido N-glicolilneuramínico.

La glicosilación de la IgG1 o IgG3 humana ocurre en la Asn297 como la glicosilación del oligosacárido complejo biantenarico con el núcleo fucosilado termina con hasta dos residuos de Gal. Las regiones constantes de la cadena pesada humana de las subclases IgG1 o IgG3 se describen con más detalle en Kabat, E., A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición de Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y en Brüggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Estas estructuras están diseñadas en forma de residuos de glicano G0, G1 (α -1,6- o α -1,3-) o G2 en relación a la cantidad de residuos Gal terminales (Raju, T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53). La glicosilación de tipo CHO de las partes Fc del anticuerpo se describe, por ejemplo, en Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207. Habitualmente, los anticuerpos que se expresan de modo recombinante en células huésped CHO glicomodificadas están fucosilados en la Asn297 en una cantidad de, al menos, el 85%. Los oligosacáridos modificados del anticuerpo parental de longitud completa pueden ser híbridos o complejos. Preferiblemente, los oligosacáridos reducidos/no fucosilados bisectados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos reducidos/no fucosilados bisectados son complejos.

De acuerdo con la invención, "cantidad de fucosa" hace referencia a la cantidad de dicho glúcido en la cadena glucídica de Asn297, en relación con la suma de todas las glicoestructuras enlazadas a Asn297 (por ejemplo,

estructuras complejas, híbridas y de alta manosa) medida mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF y calculada como valor promedio. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que incluyen fucosa en relación a todas las glicoestructuras identificadas en una muestra tratada con N-glucosidasa F (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alta manosa, respectivamente) mediante MALDI-TOF.

La proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención se produce mediante técnicas recombinantes. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico que codifica por la proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención, y un aspecto adicional es una célula que incluye dicho ácido nucleico que codifica por una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención. Los métodos para la producción recombinante se conocen en el estado de la materia e incluyen la expresión proteica en células procariontas y eucariotas con el subsiguiente aislamiento de la proteína de unión a antígenos y, habitualmente, la purificación hasta una pureza farmacológicamente aceptable. Para la expresión en una célula huésped de anticuerpos tales como los mencionados con anterioridad, se insertan ácidos nucleicos que codifican por las cadenas pesadas y ligeras modificadas y respectivas en vectores de expresión mediante métodos estándar. La expresión se lleva a cabo en células huésped apropiadas, procariontas o eucariotas, tales como las células CHO, las células NSO, las células SP2/0, las células HEK293, las células COS, las células PER.C6, levaduras o células de *E. coli*, y la proteína de unión a antígenos se recupera a partir de las células (sobrenadante o células después de la lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos se conocen en el estado de la materia y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Las proteínas de unión a antígenos biespecíficas de acuerdo con la invención se separan de modo adecuado a partir del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, la proteína sefarosa A, la cromatografía de hidroxilapatita, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad. El DNA o RNA que codifica por los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencian con facilidad mediante procedimientos convencionales. Las células del hibridoma pueden servir como fuente de tal DNA y RNA. Una vez se ha aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión que luego se transfectan en células huésped tales como las células HEK 293, las células CHO o las células de mieloma que no producen la proteína de inmunoglobulina de ningún otro modo, para obtener así la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes de la secuencia de aminoácido (o mutantes) de la proteína de unión a antígenos biespecífica se preparan mediante la introducción de cambios de nucleótido apropiados en el DNA de la proteína de unión a antígenos, o mediante la síntesis de nucleótidos. No obstante, tales modificaciones sólo se pueden llevar a cabo en un espectro muy limitado, por ejemplo tal y como se describe con anterioridad. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características del anticuerpo mencionadas con anterioridad, tales como el isotipo de IgG y la unión al antígeno, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilidad de la purificación.

El término "célula huésped", tal y como se utiliza en la presente solicitud, hace referencia a cualquier tipo de sistema celular que puede diseñarse para generar los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En una realización, se utilizan células HEK293 y células CHO como células huésped. Tal y como se utiliza aquí, las expresiones "células", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan de modo intercambiable y todas estas designaciones incluyen la progenie. Por consiguiente, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeta primaria y los cultivos que de ella se derivan sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que puede ser que toda la progenie no sea idéntica de forma precisa en cuanto al contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen variantes de progenie que tienen la misma función o actividad biológica que la observada en las células transformadas originalmente.

La expresión en las células NSO se describe, por ejemplo, en Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, en Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de los dominios variables se describe en Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferible (HEK 293) se describe por Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 y en Schlaeger, E.-J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

Las secuencias de control adecuadas para procariontas incluyen, por ejemplo, un promotor, una secuencia operadora opcional y un lugar de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, DNA para una pre-secuencia o un líder secretor está operativamente unido al DNA para un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si éste afecta a la transcripción de la

secuencia; o un lugar de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si éste se coloca para facilitar la traducción. En general, "enlazado operativamente" hace referencia a que las secuencias de DNA enlazadas son contiguas y, en el caso del líder secretor, contiguas y en el marco de lectura. No obstante, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. El enlace se logra mediante la ligadura en lugares de restricción convenientes. Si estos lugares no existen, se utilizan los adaptadores de oligonucleótido sintéticos o enlazantes de acuerdo con la práctica convencional.

La purificación de anticuerpos se lleva a cabo para eliminar componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar que incluyen el tratamiento alcalino/SDS, las bandas de CsCl, la cromatografía en columna, la electroforesis en gel de agarosa y otros métodos conocidos en la materia. Véase Ausubel, F., et al., editor, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987). Existen diferentes métodos establecidos y generalizados para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad con la proteína A o proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo el intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), el intercambio aniónico (resinas de aminetilo) y el intercambio de tipo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y otros ligandos de SH), cromatografía de interacciones hidrofóbicas o adsorción aromática (por ejemplo con fenilsefarsosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad de Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y los métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102).

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que incluye una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención. Otro aspecto de la invención es la utilización de una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención para la elaboración de un compuesto farmacológico. Un aspecto adicional de la invención es un método para la elaboración de una composición farmacéutica que incluye una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto, por ejemplo un compuesto farmacológico, que contiene una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la presente invención, formulado junto a un transportador farmacológico.

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

Otro aspecto de la invención es la proteína de unión a antígenos biespecífica de acuerdo con la invención para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es la utilización de una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de un paciente con cáncer mediante la administración de una proteína de unión a antígenos de acuerdo con la invención a dicho paciente que necesita tal tratamiento.

Tal y como se utiliza aquí, un "transportador farmacológico" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasen la absorción, y similares que sean compatibles fisiológicamente. Preferiblemente, el transportador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

Un compuesto de la presente invención puede administrarse mediante varios métodos conocidos en la materia. Como los expertos en la materia apreciarán, la vía y/o modo de administración variará en relación a los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material que prevenga su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un transportador adecuado, por ejemplo, liposomas o un disolvente. Los disolventes farmacológicamente aceptables incluyen suero salino y soluciones tampón acuosas. Los transportadores farmacológicos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacológicamente activas se conoce en la materia.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal y como se utilizan aquí, hacen referencia a vías de administración diferentes a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

El término cáncer, tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una enfermedad proliferativa, tal como los linfomas, las leucemias linfocíticas, el cáncer de pulmón, el cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), el cáncer de pulmón de célula bronquioalveolar, el cáncer de hueso, el cáncer de páncreas, el cáncer de piel, el cáncer de cabeza y cuello, el melanoma cutáneo o intraocular, el cáncer de útero, el cáncer de ovario, el cáncer de recto, el cáncer de la región anal, el cáncer de estómago, el cáncer de colon, el cáncer de mama, el cáncer de útero, el

5 cáncer de útero, el cáncer de trompa de falopio, el carcinoma de endometrio, el carcinoma de cérvix, el carcinoma de vagina, el carcinoma de vulva, la enfermedad de Hodgkin, el cáncer de esófago, el cáncer de intestino delgado, el cáncer del sistema endocrino, el cáncer de la glándula tiroideas, el cáncer de la glándula paratiroides, el cáncer de glándula adrenal, el sarcoma de tejidos blandos, el cáncer de uretras, el cáncer de pene, el cáncer de próstata, el
 10 cáncer de vejiga, el cáncer de riñón o uréter, el carcinoma de célula renal, el carcinoma de la pelvis renal, el mesotelioma, el cáncer hepatocelular, el cáncer biliar, la neoplasia del sistema nervioso central (SNC), los tumores del eje espinal, los gliomas del tronco encefálico, el glioblastoma multiforme, los astrocitomas, los schwannomas, los ependimomas, los meduloblastomas, los meningiomas, los carcinomas de célula escamosa, el adenoma hipofisario y el sarcoma de Ewing, que incluyen versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

15 Estos compuestos también pueden incluir adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersores. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse mediante procedimientos de esterilización, visto anteriormente, o mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos como, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como glúcidos, cloruro sódico y similares en los compuestos. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como el monoesterato de aluminio y la gelatina.

20 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o los compuestos farmacológicos de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacológicamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

25 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos de los compuestos farmacológicos de la presente invención pueden modificarse para obtener un cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada en un paciente, compuesto y vía de administración particulares, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de los compuestos particulares de la presente invención utilizados, la vía de administración, el tiempo de
 30 administración, la tasa de excreción del compuesto particular utilizado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con los compuestos particulares utilizados, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica previa del paciente tratado y factores similares conocidos en la materia médica.

35 El compuesto debe ser estéril y fluido para que el compuesto pueda administrarse mediante una jeringuilla. Además del agua, preferiblemente el transportador es una solución salina tamponada isotónica.

40 La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante la utilización de recubrimientos tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño particular requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos se prefiere incluir agentes isotónicos, por ejemplo, glúcidos, polialcoholes tales como el manitol o el sorbitol, y cloruro sódico en el compuesto.

45 Tal y como se utiliza aquí, las expresiones "célula," "línea celular," y "cultivo celular" se utilizan de modo intercambiable y todas estas designaciones incluyen la progenie. Por consiguiente, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos que de ella se derivan sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que puede ser que toda la progenie no sea idéntica de forma precisa en cuanto al contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen variantes de progenie que tienen la misma función o actividad biológica que la observada en las células transformadas originalmente. Si se utilizasen designaciones diferentes, quedaría claro en el contexto.

50 El término "transformación", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a un proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico en una célula huésped. Si se utilizan células huésped sin paredes celulares que hagan de barrera formidable, la transfección se lleva a cabo, por ejemplo, mediante el método de precipitación de fosfato cálcico, tal y como se describe en Graham y Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546 y las siguientes páginas. No obstante, también pueden utilizarse otros métodos para la introducción de DNA en las células, tales como la inyección nuclear o la fusión de protoplastos. Si se utilizan células procariotas o células que contienen construcciones parietales celulares importantes, un ejemplo de método para la transfección es el tratamiento con calcio que utiliza el cloruro cálcico, tal y como se describe en Cohen, S.N, et al., *PNAS* 69 (1972) 2110-2114.

60 Tal y como se utiliza aquí, "expresión" hace referencia al proceso mediante el que se transcribe un ácido nucleico en mRNA y/o al proceso mediante el cual se transcribe el mRNA (también denominado transcrito) y se traduce subsiguientemente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y polipéptidos codificados se denominan en colectivo producto génico. Si el polinucleótido deriva de DNA genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el corte y empalme del mRNA. Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular autorreplicativa,
 65 que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan principalmente mediante inserción de DNA o RNA en una célula (por ejemplo, integración

cromosómica), replicación de vectores que funcionan principalmente mediante la replicación de DNA o RNA y vectores de expresión que funcionan mediante la transcripción y/o traducción del DNA o RNA. También se incluyen los vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

5 Un "vector de expresión" es un polinucleótido que puede transcribirse y traducirse en un polipéptido cuando se introduce en una célula huésped apropiada. Habitualmente, un "sistema de expresión" hace referencia a una célula huésped adecuada que incluye un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

10 Los siguientes ejemplos, listados de secuencias y figuras se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente invención, el verdadero ámbito de la cual se describe en las reivindicaciones anejas.

Descripción del listado de secuencias

15 Id. de Sec. Nº 1 Cadena pesada modificada del anticuerpo <Ang-2> con los dominios VH-CH1 del anticuerpo <Ang-2> fusionados en el extremo C-terminal

Id. de Sec. Nº 2 Cadena ligera no modificada del anticuerpo <Ang-2>

20 Id. de Sec. Nº 3 Cadena pesada modificada del anticuerpo <VEGF> con el intercambio CH1-CL y con los dominios VH-CL del anticuerpo <VEGF> fusionados en el extremo C-terminal

Id. de Sec. Nº 4 Cadena ligera modificada del anticuerpo <VEGF> con el intercambio CH1-CL (dominios VL-CH1 del anticuerpo <VEGF>)

25

Descripción de las figuras

30 Figura 1 Estructura esquemática de un anticuerpo de longitud completa sin el dominio CH4 unido específicamente a un primer antígeno 1 con dos pares de cadenas pesadas y ligeras que incluyen dominios variables y constantes en un orden típico.

35 Figura 2 Estructura esquemática de dos posibilidades de emparejamiento erróneo (de entre cuatro) que conducen a subproductos no deseados ejemplares que reducen el rendimiento de la producción del anticuerpo tetravalente y biespecífico que se une a un primer antígeno 1 y a un segundo antígeno 2, y en el que no se han intercambiado dominios.

40 Figura 3 Estructura esquemática de una proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente de acuerdo con la invención – el emparejamiento erróneo se ve afectado por la sustitución de los dominios CH1 y CL en las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo que se une de manera específica al segundo antígeno.

45 Figura 4 Estructura esquemática de una proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente ejemplar de acuerdo con la invención con botones y ojales.

Ejemplos

45

Materiales y métodos generales

50 La información general relacionada con las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas humanas se proporciona 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 anticuerpos se numeran y se referencian de acuerdo con la numeración EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

Técnicas de DNA recombinante

60 Se utilizan métodos estándar para manipular el DNA, tal y como se describe en Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis génica

65 Los segmentos génicos deseados se preparan a partir de oligonucleótidos elaborados mediante síntesis química. Los segmentos génicos, que se flanquean mediante lugares de escisión de endonucleasas de restricción singular, se ensamblan mediante hibridación y ligación de oligonucleótidos, lo cual incluye la amplificación mediante PCR y la clonación subsiguiente mediante los lugares de restricción indicados, por ejemplo KpnI/SacI o AscI/PacI en un

pPCRScripT (Stratagene) basado en un vector de clonación pGA4. Las secuencias de DNA de los fragmentos del gen subclonado se confirman mediante secuenciación de DNA. Los fragmentos de síntesis génica se ordenan de acuerdo con las especificaciones proporcionadas por Geneart (Regensburg, Alemania).

5 Determinación de la secuencia de DNA

Las secuencias de DNA se determinan mediante la secuenciación de doble cadena llevada a cabo en un MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o un Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).

10 Análisis de la secuencia del DNA y la proteína y manejo de los datos de la secuencia

Se utilizan el paquete de programas informáticos GCG's (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versión 10.2 y el Infomax's Vector NT1 Advance Suite versión 8.0 para la creación, el mapeo, el análisis, la anotación y la ilustración de las secuencias.

15 Vectores de expresión

20 Para la expresión de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos descritos se aplican variantes de plásmidos de expresión para células con expresión transitoria (por ejemplo HEK293 EBNA o HEK293-F) en base a la organización de un cDNA con o sin un promotor CMV-Intron A, o en base a la organización genómica con un promotor CMV.

Al lado del módulo de expresión del anticuerpo, los vectores incluyen:

- 25
- un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en E. coli, y
 - un gen β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en E. coli.

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

- 30
- lugar(es) de restricción único(s) en el extremo 5'
 - el potenciador y promotor precoz inmediato del citomegalovirus humano,
 - 35 - seguido de la secuencia del intrón A en el caso de la organización del cDNA,
 - una región 5' no traducida de un gen de un anticuerpo humano,
 - una secuencia señal de una cadena pesada de una inmunoglobulina,
 - 40 - la cadena del anticuerpo humano, tetravalente y biespecífico (natural o con intercambio de dominios) en forma de organización de cDNA o de organización genómica con una organización exón-intrón de inmunoglobulina
 - una región 3' no traducida con una secuencia señal de poliadenilación, y
 - 45 - lugar(es) de restricción único(s) en el extremo 3'

50 Los genes de fusión que incluyen las cadenas del anticuerpo, tal y como se describe más adelante, se generan mediante PCR y/o síntesis génica, y se ensamblan mediante métodos y técnicas recombinantes conectando los segmentos de ácido nucleico, por ejemplo utilizando lugares de restricción únicos en los vectores respectivos. Las secuencias de ácido nucleico subclonadas se verifican mediante la secuenciación de DNA. Para las transfecciones transitorias se preparan cantidades mayores de plásmidos mediante la preparación de plásmidos a partir de cultivos de E. coli transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

55 Técnicas de cultivo celular

Las técnicas de cultivo celular estándar se utilizan tal y como se describe en Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino, J.S., Daso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (editores), John Wiley & Sons, Inc. (2000).

60 Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se expresan mediante la cotransfección transitoria de los tres plásmidos de expresión respectivos en células HEK293-EBNA o HEK293-F en crecimiento de manera adherente y en suspensión, tal y como se describe más adelante.

65 Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-EBNA

Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se expresan mediante la cotransfección transitoria de los tres plásmidos de expresión respectivos (por ejemplo, que codifican por la cadena pesada modificada, así como la cadena ligera correspondiente y la cadena ligera modificada) en células HEK293-EBNA en crecimiento de forma adherente (línea celular de riñón embrionario humano 293 que expresa el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr; número de depósito de la colección de cultivos de tipo americano ATCC # CRL-10852, Lote 959 218) cultivadas en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado con Ultra Low IgG FCS (suero de ternero fetal, Gibco) al 10%, 2 mM de L-glutamina (Gibco), y 250 µg/ml de geneticina (Gibco). Para la transfección se utiliza el reactivo de transfección FuGENE™ (Roche Molecular Biochemicals) en una proporción entre el reactivo FuGENE™ (µl) y el DNA (µg) de 4:1 (que incluye el rango de entre 3:1 y 6:1). Las proteínas se expresan a partir de los plásmidos respectivos mediante la utilización de una proporción molar entre las cadenas ligeras (modificada y natural) y la cadena pesada modificada que codifica por plásmidos de 1:1:1 (equimolar), que abarca el rango de entre 1:1:2 y 2:2:1, respectivamente. Las células se alimentan el tercer día con L-glutamina a 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. Los sobrenadantes de los cultivos celulares que contienen el anticuerpo tetravalente biespecífico se recogen, desde el día 5 al 11 tras la transfección, mediante centrifugación y se almacenan a -20°C. La información general relacionada con la expresión recombinante de las inmunoglobulinas humanas, por ejemplo en las células HEK293, se proporciona en: Meissner, P., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

De modo alternativo, los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se generan mediante la transfección transitoria de los plásmidos respectivos (por ejemplo, que codifican por la cadena pesada modificada, así como las cadenas correspondientes ligera y modificada) utilizando el sistema HEK293-F (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células HEK293-F (Invitrogen) que crecen en suspensión en un frasco de agitación o en un fermentador agitador en el medio de expresión sin suero FreeStyle 293 (Invitrogen) se transfectan con una mezcla de los tres plásmidos de expresión, tal y como se describe con anterioridad, y fectina 293 o fectina (Invitrogen). Para un frasco de 2 l (Coming) se siembran las células HEK293-F con una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/ml en 600 ml y se incuban a 120 rpm, CO₂ al 8%. El día posterior las células se transfectan a una densidad celular de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con aproximadamente 42 ml de la mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 µg de DNA plasmídico total (1 µg/ml) que codifica por la cadena pesada modificada, la cadena ligera correspondiente y la cadena ligera modificada correspondiente en una proporción equimolar y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml de fectina 293 o fectina (2 µl/ml). De acuerdo con el consumo de glucosa, se añade una solución de glucosa durante el curso de la fermentación. Se recupera el sobrenadante que contiene el anticuerpo secretado después de 5-10 días y los anticuerpos se purifican directamente a partir del sobrenadante o el sobrenadante se congela y se almacena.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos purificados y sus derivados se determina mediante la determinación de la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar que se calcula en base a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, C.N., et al., *Protein Science*, 1995, 4, 2411-1423.

Determinación de la concentración del anticuerpo en sobrenadantes

La concentración de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos en los sobrenadantes de los cultivos celulares se estima mediante inmunoprecipitación con cuentas de proteína A-agarosa (Roche). Se lavaron 60 µl de las cuentas de Proteína A-agarosa tres veces en TBS-NP40 (50 mM de Tris, pH de 7,5, 150 mM de NaCl, Nonidet-P40 al 1%). Subsiguientemente, se aplicaron 1-15 ml del sobrenadante del cultivo celular a las cuentas de proteína A-agarosa equilibradas previamente en TBS-NP40. Tras la incubación durante 1 h. a temperatura ambiente, las cuentas 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 suero salino tamponado con fosfato (2xPBS, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de 100 mM de citrato de Na a pH de 5,0. El anticuerpo unido se eluye mediante la adición de 35 µl del tampón de la muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen). La mitad de la muestra se combina con el agente reductor de la muestra NuPAGE® o no se reduce, respectivamente, y se calienta durante 10 min. a 70°C. Consecuentemente, se aplican 5-30 µl a una SDS-PAGE Bis-Tris con NuPAGE® al 4-12% (Invitrogen) (con el tampón MOPS para la SDS-PAGE no reducida y el tampón MES con el aditivo de tampón de migración antioxidante NuPAGE® (Invitrogen) para la SDS-PAGE reducida) y se tiñeron con azul de Coomassie.

La concentración de anticuerpos tetravalentes biespecíficos en los sobrenadantes de cultivo celular se mide cuantitativamente mediante una cromatografía de afinidad HPLC. En resumen, los sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpos y derivados que se unen a la proteína A se aplican a una columna Applied Biosystems Poros A/20 en 200 mM de KH₂PO₄, 100 mM de citrato de sodio, pH de 7,4, y se eluye a partir de la matriz con 200 mM de NaCl, 100 mM de ácido cítrico, pH de 2,5 en un sistema Agilent HPLC 1100. La proteína eluida se cuantifica mediante la absorbancia UV y la integración de las áreas de pico. Como estándar se utilizó un anticuerpo IgG1 estándar.

De modo alternativo, la concentración de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos en sobrenadantes de cultivo celular se mide mediante un ELISA en sándwich con IgG. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche) con 100 µl/pocillo de la molécula de captura IgG anti-humana biotinizada F(ab')₂-hFcγ BI (Dianova) a 0,1 µg/ml durante 1 h. a temperatura ambiente o, de forma alternativa, durante la noche a 4°C, y subsiguientemente se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBS, Tween al 0,05% (PBST, Sigma). Se añaden a los pocillos 100 µl/pocillo de una serie de diluciones en PBS (Sigma) de los sobrenadantes de cultivo celular que contienen el anticuerpo respectivo y se incuban durante 1-2 h. en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo unido se detecta con 100 µl de F(ab')₂-hFcγ-POD (Dianova) a 0,1 µg/ml como anticuerpo de detección durante 1-2 h. en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se lava tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detecta mediante la adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se lleva a cabo en un espectrómetro de flúor Tecan a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia de 492 nm).

Purificación de proteínas

Las proteínas se purifican a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados en relación a protocolos estándar. En resumen, los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se aplican en una columna de proteína A-seferosa (GE healthcare) y se lavan con PBS. La elución de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se logra a un pH de 2,8 seguido de la neutralización inmediata de la muestra. Las proteínas agregadas se separan de los anticuerpos monoméricos mediante la cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en PBS o en 20 mM de histidina, 150 mM de NaCl a pH de 6,0. Las fracciones monoméricas se aúnan, se concentran si es necesario mediante la utilización de un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), se congelan y se almacenan a -20°C o -80°C. Parte de las muestras se proporcionan para el análisis proteico y la caracterización analítica, por ejemplo mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño o espectrometría de masas.

SDS-PAGE

El sistema en gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se utilizan geles de NuPAGE® al 10% o al 4-12% Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH de 6,4) y un tampón de migración NuPAGE® MES (geles reducidos, con el aditivo de tampón de migración antioxidante NuPAGE®) o MOPS (geles no reducidos).

Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

La cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación de la agregación y el estado oligomérico de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se lleva a cabo mediante una cromatografía HPLC. En resumen, se aplican anticuerpos purificados frente a la proteína A en una columna Tosoh TSKgel G3000SW en 300 mM de NaCl, 50 mM de KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH de 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema Dionex HPLC. Las proteínas eluidas se cuantifican mediante la absorbancia UV y la integración de las áreas de pico. El gel de filtración estándar BioRad 151-1901 sirvió como control estándar.

Espectrometría de masas

La masa total desglucosilada de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se determina y se confirma mediante la espectrometría de masas de ionización por pulverización (ESI-MS). En resumen, se desglucosilaron 100 µg de anticuerpos purificados con 50 mU de N-glicosidasa F (PNGaseF, ProZyme) en 100 mM de KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH de 7 a 37°C durante 12-24 h. a una concentración de proteínas de hasta 2 mg/ml, y subsiguientemente se desalinizaron mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). Las masas de la cadena pesada modificada respectiva, la cadena ligera y la cadena ligera modificada se determinaron mediante ESI-MS tras la desglucosilación y la reducción. En resumen, se incubaron 50 µg del anticuerpo tetravalente biespecífico en 115 µl con 60 µl de 1M TCEP y 50 µl de 8 M clorhidrato de guanidina, subsiguientemente desalinizados. La masa total y la masa de las cadenas ligera y pesada reducidas se determinó mediante ESI-MS en un sistema Q-Star Elite MS equipado con una fuente NanoMate.

ELISA de unión al VEGF

Las propiedades de unión de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se evaluaron en un ensayo ELISA con la proteína VEGF165-His de longitud completa (R&D Systems). Con este fin, se recubrieron placas Falcon de poliestireno claro de microtitulación potenciadas con 100 µl de VEGF165 recombinante humano a 2 µg/ml (R&D Systems) en PBS durante 2 h. a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (Tween 20 al 0,2%) y se bloquearon con 200 µl de BSA al 2% y Tween 20 al 0,1% durante 30 min. a temperatura ambiente y, subsiguientemente, se lavaron tres veces con 300 µl de PBST. Se añadieron a los pocillos 100 µl/pocillo de una serie de diluciones de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos purificados en PBS

- (Sigma) y se incubaron durante 1 h. en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST (Tween 20 al 0,2%) y el anticuerpo unido se detectó con 100 μ l/pocillo de F(ab')₂-hFc γ POD (Immuno research) a 0,1 μ g/ml en BSA al 2% y Tween 20 al 0,1% como anticuerpo de detección durante 1 h. en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se lavó tres veces con 300 μ l/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 μ l de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se lleva a cabo en un espectrómetro de flúor Tecan a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia de 492 nm).
- 5
- 10 Unión al VEGF: caracterización cinética de la unión del VEGF a 37°C mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore)
- Para corroborar adicionalmente los hallazgos del ELISA, se analizó cuantitativamente la unión de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos al VEGF mediante la utilización de la tecnología de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore T100 de acuerdo con el siguiente protocolo y se analizó mediante la utilización del paquete de programas informáticos T100: en resumen, los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se capturaron en un chip CM5 mediante la unión a una IgG antihumana de cabra (JIR 109-005-098). El anticuerpo de captura se inmoviliza mediante el enlace amino utilizando el enlace amino estándar tal y como se describe a continuación: el tampón HBS-N hizo las veces de tampón de migración, la activación se logra mediante la mezcla de EDC/NHS con el objetivo de una densidad de ligando de 700 RU. El anticuerpo de captura se diluye en el tampón de enlace NaAc, pH de 5,0, c = 2 μ g/ml y, finalmente, los grupos carboxilo que permanecen activados se bloquean mediante la inyección de 1 M de etanolamina. La captura de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <VEGF> se lleva a cabo con un flujo de 5 μ l/min. y una c = 10 nM, diluidos con tampón de migración + 1 mg/ml de BSA; se debería lograr un nivel de captura de aproximadamente 30 RU. Se utiliza rhVEGF como analito (rhVEGF, R&D-Systems N° de Cat., 293-VE). La caracterización cinética de la unión del VEGF al anticuerpo tetravalente biespecífico <VEGF> se lleva a cabo a 25°C o 37°C en PBS + Tween20 al 0,005 % (v/v) como tampón de migración. La muestra se inyecta con un flujo de 50 μ l/min., un tiempo de asociación de 80 s. y un tiempo de disociación de 1200 s. con una serie de concentraciones del rhVEGF que van de 300 a 0,29 nM. La regeneración de la superficie del anticuerpo de captura libre se lleva a cabo con 10 mM de Glicina a pH de 1,5 y un tiempo de contacto de 60 s. después de cada ciclo analítico. Las constantes cinéticas se calculan mediante la utilización del método de referencia doble habitual (referencia control: unión del rhVEGF a la molécula de captura IgG antihumana de cabra, controles en la célula de medición de flujo, concentración del rhVEGF "0", modelo: unión Langmuir 1:1, (R_{máx.} ajustada localmente debido a la unión de moléculas de captura).
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35 ELISA de unión a la Ang-2
- Las propiedades de unión de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se evaluaron en un ensayo ELISA con la proteína Ang-2-His de longitud completa (R&D Systems). Con este fin, se recubrieron placas de microtitulación potenciadas con poliestireno Falcon claro con 100 μ l de Ang-2-His recombinante humana a 2 μ g/ml (R&D Systems, sin transportador) en PBS durante 2 h. a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST (Tween 20 al 0,2%) y se bloquearon con 200 μ l de BSA al 2% y Tween 20 al 0,1% durante 30 min. a temperatura ambiente y, subsiguientemente, se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST. Se añadieron a los pocillos 100 μ l/pocillo de una serie de diluciones de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos purificados en PBS (Sigma) y se incubaron durante 1 h. en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBST (Tween 20 al 0,2%) y el anticuerpo unido se detectó con 100 μ l/pocillo de F(ab')₂-hkPOD (Biozol, N° de Cat. 206005) a 0,1 μ g/ml en BSA al 2% y Tween 20 al 0,1% como anticuerpo de detección durante 1 h. en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se lavó tres veces con 300 μ l/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 μ l de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se lleva a cabo en un espectrómetro de flúor Tecan a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia de 492 nm).
- 40
- 45
- 50
- BIACORE de unión a la Ang-2
- 55 La unión de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos a la Ang-2 humana se investiga mediante la resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). En resumen, para las mediciones de afinidad se inmovilizan anticuerpos policlonales de cabra <hIgG-Fc γ > en un chip CM5 mediante el enlace amino para la presentación de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos frente a la Ang-2 humana. La unión se mide en el tampón HBS (HBS-P (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, Tween 20 al 0,005%, pH de 7,4), 25°C. Se añade Ang-2-His purificada (R&D systems o purificada en el laboratorio) en varias concentraciones y en solución. La asociación se mide mediante una inyección de Ang-2 de 3 minutos; la disociación se mide mediante el lavado de la superficie del chip con el tampón HBS durante 3 minutos y se estima un valor de KD mediante la utilización de un modelo de unión Langmuir 1:1. Debido a la heterogeneidad de la preparación de Ang-2, no se pudo observar una unión 1:1; por consiguiente los valores de KD sólo son estimaciones relativas. Los datos de los controles negativos (por ejemplo, las curvas de los valores) se sustraen a partir de curvas de muestra
- 60
- 65

para la corrección de la desviación basal intrínseca del sistema y para la reducción de la señal del ruido. Se utiliza el programa informático de evaluación Biacore T100 versión 1.1.1 para el análisis de los sensogramas y para el cálculo de los datos de afinidad. De modo alternativo, la Ang-2 podría capturarse con un nivel de captura de 2000-1700 RU mediante un PentaHisAnticuerpo (PentaHis-Ab sin BSA, Qiagen N° 34660) que se inmoviliza en un chip CM5 mediante enlaces amino (sin BSA) (véase más adelante).

ELISA en puente de Ang-2-VEGF

Las propiedades de unión de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se evaluaron en un ensayo ELISA con la proteína VEGF165-His de longitud completa inmovilizada (R&D Systems) y la proteína Ang-2 humana (R&D Systems) para la detección del anticuerpo biespecífico unido. Sólo un anticuerpo tetravalente biespecífico <VEGF-Ang-2> puede unirse simultáneamente a VEGF y a Ang-2 y, por consiguiente, formar puentes entre los dos antígenos, mientras que los anticuerpos mono-específicos "estándar" IgG1 no son capaces de unirse simultáneamente a VEGF y a Ang-2 (figura 7).

Con este fin, se recubrieron placas de microtitulación potenciadas con poliestireno Falcon claro con 100 µl de VEGF165 recombinante humano a 2 µg/ml (R&D Systems) en PBS durante 2 h. a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (Tween 20 al 0,2%) y se bloquearon con 200 µl de BSA al 2% y Tween 20 al 0,1% durante 30 min. a temperatura ambiente y, subsiguientemente, se lavaron tres veces con 300 µl de PBST. Se añadieron a los pocillos 100 µl/pocillo de una serie de diluciones de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos purificados en PBS (Sigma) y se incubaron durante 1 h. en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (Tween 20 al 0,2%) y el anticuerpo unido se detectó mediante la adición de 100 µl de Ang-2-His humano (R&D Systems) al 0,5 µg/ml en PBS. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (Tween 20 al 0,2%) y se detectó el Ang-2 unido con 100 µl del anticuerpo mlgG1<Ang-2>-biotina (BAM0981, R&D Systems) a 0,5 µg/ml durante 1 h. a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se lavó tres veces con 300 µl/pocillo de PBST (Tween 20 al 0,2%) y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 µl del conjugado estreptavidina-POD 1:2000 (Roche Diagnostics GmbH, N° de Cat. 11089153) diluido en proporción 1:4 con tampón de bloqueo durante 1 h. a temperatura ambiente. El conjugado estreptavidina-POD no unido se lava de tres a seis veces con 300 µl de PBST (Tween 20 al 0,2%) y el conjugado estreptavidina-POD unido se detecta mediante la adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se lleva a cabo en un espectrómetro de flúor Tecan a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia de 492 nm).

Demostración de la unión simultánea del anticuerpo tetravalente biespecífico <VEGF-Ang-2> al VEGF-A y a la Ang-2 mediante Biacore

Para corroborar de modo adicional los datos del ELISA en puente se estableció un ensayo adicional para confirmar la unión simultánea al VEGF y a la Ang-2 mediante la utilización de la tecnología de plasmón superficial en un instrumento Biacore T100 de acuerdo con el siguiente protocolo, y se analizó mediante la utilización del paquete de programas informáticos T100 (T100 Control, Versión 2.01, T100 Evaluation, Versión 2.01, T100 Kinetics Summary, Versión 1.01): la Ang-2 se captura con un nivel de captura de 2000-1700 RU en PBS, tampón de migración Tween20 al 0,005 % (v/v) mediante un PentaHisAnticuerpo (PentaHis-Ab sin BSA, Qiagen N° 34660) que se inmoviliza en un chip CM5 mediante el enlace amino (sin BSA). El tampón HBS-N sirvió como tampón de migración durante la unión y la activación tiene lugar mediante la mezcla EDC/NHS. El anticuerpo de captura PentaHis-Ab sin BSA se diluye en el tampón de unión NaAc, pH de 4,5, c = 30 µg/ml y, finalmente, se bloquean los grupos carboxilo que permanecen activados mediante la inyección de 1 M de etanolamina; se evalúan densidades de ligando de entre 5000 y 17000 RU. Se captura la Ang-2 con una concentración de 500 nM mediante el Penta-His-Ab a un flujo de 5 µl/min. diluido con el tampón de migración + 1 mg/ml de BSA. Subsiguientemente, se demuestra el anticuerpo tetravalente biespecífico <Ang-2, VEGF> que se une a la Ang-2 y al VEGF mediante la incubación con el rhVEGF y la formación de un complejo en sándwich. Con este fin, el anticuerpo biespecífico tetravalente <VEGF-Ang-2> se une a la Ang-2 a un flujo de 50 µl/min. y a una concentración de 100 nM, se diluye con el tampón de migración + 1 mg/ml de BSA y se detecta la unión simultánea mediante la incubación con el VEGF (rhVEGF, R&D-Systems N° de Cat., 293-VE) en PBS + tampón de migración Tween20 al 0,005 % (v/v) a un flujo de 50 µl/min y a una concentración del VEGF de 150 nM. El tiempo de asociación fue de 120 s. y el tiempo de disociación fue de 1200 s. La regeneración se lleva a cabo después de cada ciclo a un flujo de 50 µl/min. con 2 x 10 mM de glicina con un pH de 2,0 y un tiempo de contacto de 60 s. Los sensogramas se corrigen mediante la utilización de la referencia doble habitual (referencia de control: unión del anticuerpo biespecífico y del rhVEGF a la molécula de captura PentaHisAb). Los controles para cada Ab se miden con una concentración del rhVEGF de "0".

Generación de la línea celular HEK293-Tie2

Se generó una línea celular HEK293-Tie2 recombinante para determinar la interferencia de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <Ang-2, VEGF> con la fosforilación de Tie-2 estimulada por Ang-2 y la unión de la Ang-2 a Tie2 en las células. En resumen, un plásmido basado en pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) que codifica por el Tie2 humano de longitud completa bajo el control de un promotor de CMV y un marcador de resistencia a neomicina

mediante la utilización de Fugene (Roche Applied Science) se transfectó en las células HEK293 (ATCC) como reactivo de transfección y se seleccionaron las células resistentes en DMEM FCS al 10 %, 500 µg/ml de G418. Se aislaron los clones individuales mediante un cilindro de clonación y se analizaron subsiguientemente en cuanto a la expresión de Tie2 mediante FACS. Se identificó el clon 22 como el clon con una expresión alta y estable de Tie2, incluso en ausencia de G418 (clon 22 HEK293-Tie2). El clon 22 HEK293-Tie2 se utilizó subsiguientemente en los ensayos celulares: ensayo de fosforilación de Tie2 inducida por la Ang-2 y ensayo de unión al ligando celular Ang-2.

Ensayo de fosforilación de Tie2 inducida por la Ang-2

La inhibición de la fosforilación de Tie2 inducida por la Ang-2 mediante los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <Ang-2, VEGF> se midió de acuerdo con el siguiente principio de ensayo. El clon 22 HEK293-Tie2 se estimuló con Ang-2 durante 5 minutos en ausencia o presencia del anticuerpo frente a Ang-2 y se cuantificó el P-Tie2 mediante un ELISA en sándwich. En resumen, se hacen crecer durante la noche 2x10⁵ células del clon 22 HEK293-Tie2 por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina en 100 µl de DMEM, FCS al 10%, 500 µg/ml de geneticina. Al día siguiente se prepara una fila de titulación de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <Ang-2, VEGF> en una placa de microtitulación (concentrada cuatro veces, 75 µl de volumen final/pocillo, por duplicado) y se mezcla con 75 µl de una dilución de Ang-2 (R&D systems # 623-AN) (3,2 µg/ml como solución concentrada cuatro veces). Los anticuerpos y la Ang-2 se incubaron previamente durante 15 min. a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de la mezcla a las células del clon 22 HEK293-Tie2 (incubadas previamente durante 5 min. con 1 mM de NaV3O4, Sigma #S6508) y se incubaron durante 5 min. a 37°C. Subsiguientemente, las células se lavaron con 200 µl de PBS helado + 1mM de NaV3O4 por pocillo y se lisaron mediante la adición de 120 µl del tampón de lisis (20 mM de Tris, pH de 8,0, 137 mM de NaCl, NP-40 al 1%, glicerol al 10%, 2mM de EDTA, 1 mM de NaV3O4, 1 mM de PMSF y 10 µg/ml de aprotinina) por pocillo en hielo. Las células se lisaron durante 30 min. a 4°C en un agitador de placas de microtitulación y se transfectaron directamente 100 µl del lisado en una placa de microtitulación de ELISA de p-Tie2 (R&D Systems, R&D #DY990) sin llevar a cabo la centrifugación previa y sin determinar las proteínas totales. Las cantidades de P-Tie2 se cuantifican de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los valores CI50 para la inhibición se determinan mediante la utilización del complemento de análisis XLfit4 para Excel (Dosis-respuesta de un sitio, modelo 205). Los valores CI50 pueden compararse en un experimento pero pueden variar entre los experimentos.

Ensayo de proliferación de HUVEC inducida por el VEGF

Se escoge la proliferación de HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana, Promocell #C-12200) inducida por el VEGF para medir la función celular de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos <Ang-2, VEGF>. En resumen, se incuban 5000 células HUVEC (número bajo de pases, ≤5 pases) por 96 pocillos en 100 µl de medio de inaniación (medio basal endotelial 2 (EBM-2), Promocell # C-22211, FCS al 0,5%, penicilina/estreptomycin) en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con colágeno I BD Biocoat Collagen I (BD #354407 / 35640 durante la noche). Se mezclaron concentraciones variables del anticuerpo tetravalente biespecífico <Ang-2, VEGF> con el rhVEGF (concentración final de 30 ng/ml, BD # 354107) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Subsiguientemente, la mezcla se añade a las células HUVEC y éstas se incuban durante 72 h. a 37°C, CO2 al 5%. El día de los análisis, la placa se equilibra a temperatura ambiente durante 30 min. y se determina la viabilidad celular/proliferación mediante la utilización del kit CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, de acuerdo con el manual (Promega, # G7571/2/3). Se determina la luminiscencia en un espectrofotómetro.

Ejemplo 1

Producción, expresión, purificación y caracterización de una proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente que reconoce la Ang-2 y el VEGF-A

En un primer ejemplo, se crea una proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente que reconoce la Ang-2 y el VEGF-A mediante la fusión con un conector (G4S)₄ del dominio de fusión VH-CH1 de un anticuerpo que reconoce la Ang-2 al extremo C-terminal de la cadena pesada de dicho anticuerpo que reconoce la Ang-2 (SEC. 1); y mediante la fusión con un conector (G4S)₄ del dominio de fusión VH-CL de un anticuerpo que reconoce el VEGF-A al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que reconoce el VEGF con intercambio CH1-CL (SEC. 3). Par inducir la heterodimerización de las dos cadenas pesadas respectivas la SEC. 1 contiene, por ejemplo, la secuencia botón (T366W) y la SEC. 2 contiene, por ejemplo, las secuencias ojal T366S, L368A y Y407V, así como dos residuos de cisteína introducidos S354C/Y349C para formar un puente disulfuro estabilizante tras la heterodimerización. Para obtener la proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente de acuerdo con la invención estos constructos de la cadena pesada se coexpresan con plásmidos que codifican por la cadena ligera respectiva del anticuerpo frente a Ang-2 (SEC. 2) y un dominio de fusión VL-CH1 que reconoce el VEGF-A (SEC. 4). En la figura 4 se proporciona un esquema general de la proteína respectiva de unión a antígenos biespecífica y tetravalente con la modificación "botón en ojal".

La proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente se generó tal y como se describe en la sección de los métodos generales mediante las técnicas de biología molecular y se expresó transitoriamente en las células

HEK293F, tal y como se describe con anterioridad. Subsiguientemente, se purificó a partir del sobrenadante mediante la combinación de una cromatografía de afinidad a la proteína A y la cromatografía de exclusión por tamaño. Se caracterizaron la identidad del producto obtenido, mediante la espectrometría de masa, y sus propiedades analíticas, tales como la pureza mediante SDS-PAGE, el contenido de monómero y la estabilidad.

- 5 Estos datos muestran que la proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente puede producirse con un buen rendimiento y que es estable.

Expresión	Purificación	
Titulación [$\mu\text{g/ml}$]	Producto final producido	Homogeneidad (producto final)
9,8	16,7 mg/l	29%

- 10 Posteriormente, la unión a Ang-2 y a VEGF-A, así como la unión simultánea, se estudiaron mediante los ensayos ELISA y Biacore descritos con anterioridad, y las propiedades funcionales, tales como la inhibición de la fosforilación de Tie2 y la inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF, se analizaron y mostraron que el anticuerpo tetravalente biespecífico generado es capaz de unirse a Ang-2 y a VEGF-A, y bloquear su actividad simultáneamente.

Listado de secuencias

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Proteínas de unión a antígenos, tetravalentes y biespecíficas
- <130> 26168 WO
- 10 <150> EP09007966,6
- <151> 06/18/2009
- <160> 4
- 15 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 711
- <212> PRT
- 20 <213> Artificial
- <220>
- <223> Cadena pesada modificada del anticuerpo <Ang-2> con el extremo C-terminal fusionado con los dominios VH-CH1 del anticuerpo <Ang-2>
- 25 <400> 1

```

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

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

ES 2 442 917 T3

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

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

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 515 520 525

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

Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met

ES 2 442 917 T3

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

<210> 2
<211> 215
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Cadena ligera no modificada del anticuerpo <Ang-2>

10

<400> 2

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

ES 2 442 917 T3

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

<210> 3

<211> 707

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada modificada del anticuerpo <VEGF> con el intercambio CH1-CL y con los dominios VH-CL del anticuerpo <VEGF> fusionados en el extremo C-terminal

<400> 3

5

10

ES 2 442 917 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
 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

ES 2 442 917 T3

			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						
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			

ES 2 442 917 T3

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 Glu Val Gln
 465 470 475 480
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 485 490 495
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
 500 505 510
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile
 515 520 525
 Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg
 530 535 540
 Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met
 545 550 555 560
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr
 565 570 575
 Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 580 585 590
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 595 600 605
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 610 615 620

ES 2 442 917 T3

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
625 630 635 640

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
645 650 655

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
660 665 670

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
675 680 685

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
690 695 700

Gly Glu Cys
705

<210> 4
<211> 212
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Cadena ligera modificada del anticuerpo <VEGF> con el intercambio CH1-CL (dominios VL-CH1 del anticuerpo <VEGF>)

10

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 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

ES 2 442 917 T3

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
 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

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a antígenos tetravalente y biespecífica, que incluye:

- 5 a) una cadena pesada modificada de un primer anticuerpo, que se une de manera específica a un primer antígeno, y sobre cuyo extremo C-terminal de dicha cadena pesada se fusionan de manera adicional los dominios VH-CH1 de dicho primer anticuerpo mediante sus extremos N-terminal;
- 10 b) dos cadenas ligeras de dicho primer anticuerpo de a);
- c) una cadena pesada modificada de un segundo anticuerpo, que se une de manera específica a un segundo antígeno, en el que el dominio CH1 se reemplaza por el dominio CL de dicho segundo anticuerpo y sobre cuyo extremo C-terminal de dicha cadena pesada se fusionan de manera adicional los dominios VH-CL de dicho segundo anticuerpo mediante sus extremos N-terminal; y
- 15 d) dos cadenas ligeras modificadas de dicho segundo anticuerpo de c), en las que el dominio CL se reemplaza por el dominio CH1 de dicho segundo anticuerpo.

2. La proteína de unión a antígenos de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza por que tanto el dominio CH3 de la cadena pesada modificada del anticuerpo de a) como el dominio CH3 de la cadena pesada modificada del anticuerpo de b) se encuentran en la interfaz, que incluye una interfaz original entre los dominios CH3 del anticuerpo;

25 en el que dicha interfaz se altera para promover la formación de la proteína de unión a antígenos, tetravalente y biespecífica, en la que la alteración se caracteriza por que:

- i) el dominio CH3 de una cadena pesada se altera, para que en la interfaz original, el dominio CH3 de una cadena pesada que se encuentra con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada en la proteína de unión a antígenos tetravalente y biespecífica,
- 30 se sustituya un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido con una cadena lateral de mayor volumen para generar así una protuberancia en la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada, que se puede colocar en una cavidad de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada
- 35 y
- ii) el dominio CH3 de la otra cadena pesada se altera, para que en la interfaz original del segundo dominio CH3 que se encuentra con la interfaz original del primer dominio CH3 de la proteína de unión a antígenos tetravalente y biespecífica,
- 40 se sustituya un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido con una cadena lateral de menor volumen para generar así una cavidad en la interfaz del segundo dominio CH3, en la que se puede colocar una protuberancia de la interfaz del primer dominio CH3.

3. La proteína de unión a antígenos de acuerdo con la reivindicación 2, que se caracteriza por que tal residuo de aminoácido con un volumen mayor de cadena lateral se selecciona a partir del grupo que incluye arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), y tal residuo de aminoácido con un volumen menor de cadena lateral se selecciona a partir del grupo que incluye alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

4. La proteína de unión a antígenos de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, que se caracteriza por que ambos dominios CH3 se alteran de forma adicional mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes a cada dominio CH3 para que se forme un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

5. Un método para la preparación de una proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, que incluye los pasos de

- 55 a) transformar una célula huésped con vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican por una proteína biespecífica de unión a antígenos de acuerdo con las reivindicaciones 1 to 4
- b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de proteína de unión a antígenos; y
- 60 c) recuperar dicha molécula de proteína de unión a antígenos de dicho cultivo.

6. Una célula huésped que incluye los vectores de acuerdo con la reivindicación 5.

65

7. Un composición farmacéutica que incluye la proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 y, al menos, un excipiente farmacológicamente aceptable.
- 5 8. La proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 para el tratamiento del cáncer.
9. La utilización de la proteína de unión a antígenos biespecífica y tetravalente de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Fig. 1

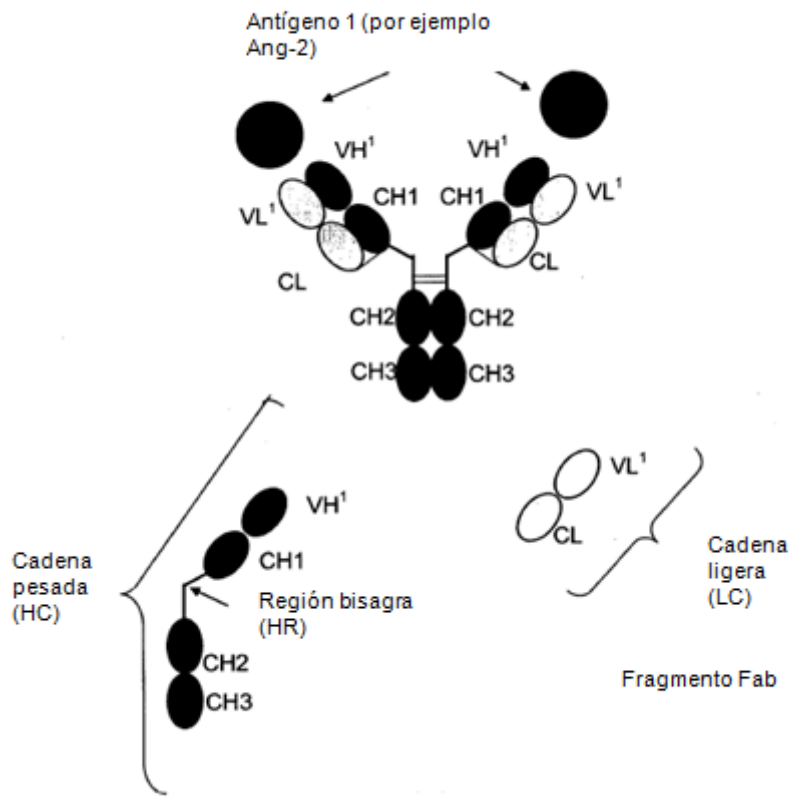


Fig. 2

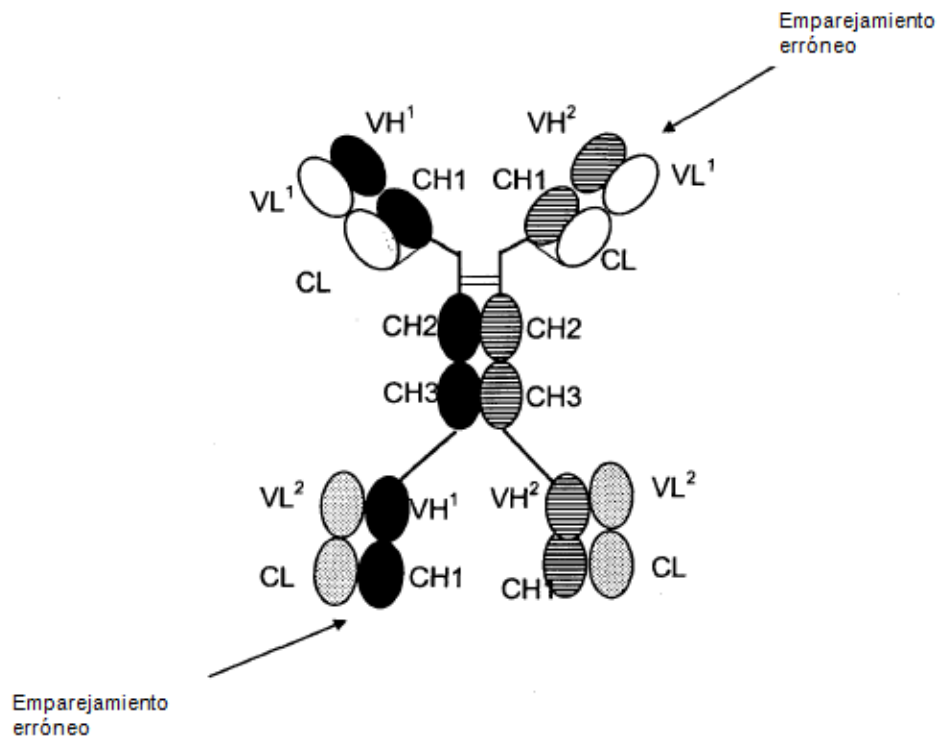


Fig. 3

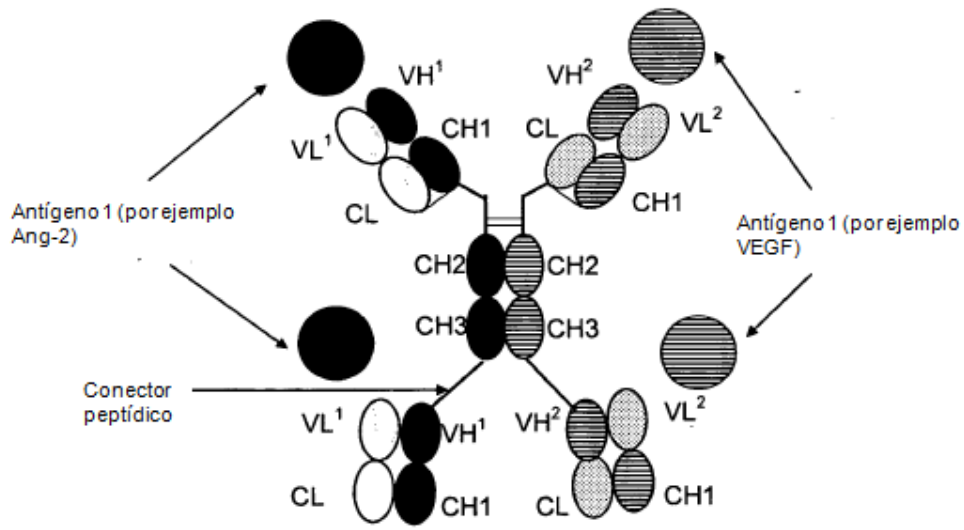


Fig. 4

