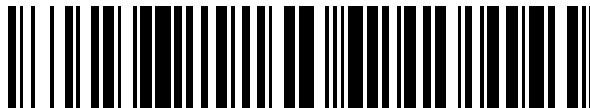


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 623**

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 10725615 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2443154**

54 Título: **Proteínas biespecíficas de unión a antígeno**

30 Prioridad:

16.06.2009 EP 09007857

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

20.03.2014

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 2 449 623 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 biespecíficas de unión a antígeno

- 5 La presente invención se refiere a proteínas biespecíficas de unión a antígeno, a métodos para la producción de las mismas, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

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

- 15 Recientemente se ha desarrollado una amplia diversidad de formatos de anticuerpo multiespecífico recombinante, por ejemplo anticuerpos biespecíficos tetravalentes mediante fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (ver, por ejemplo, Coloma M.J. et al., *Nature Biotech.* 15:159-163, 1997; documento WO n° 2001/077342, y Morrison S.L., *Nature Biotech.* 25 (2007) 1233-1234.

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

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

- 40 De esta manera, idealmente el objetivo debe ser el desarrollo de anticuerpos biespecíficos que sean muy similares en la estructura general a los anticuerpos naturales (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), con diferencias mínimas respecto a las secuencias humanas.

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

- 50 Un enfoque para evitar el problema de los productos secundarios mal apareados, que se conoce como "botón en ojal", pretende forzar el apareamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfaz de contacto. En una cadena se sustituyen aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas, para crear un "ojal". A la inversa, se introducen aminoácidos con cadenas laterales grandes en el otro dominio CH3, para crear un "botón". Mediante la coexpresión de estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que deben ser las apropiadas para ambas cadenas pesadas), se han observado altos rendimientos de formación de heterodímeros ("botón-ojal") frente a la formación de homodímeros ("ojal-ojal" o "botón-botón") (Ridgway J.B., *Protein Eng.* 9:617-621, 1996, y documento WO n° 96/027011). El porcentaje de heterodímeros podría incrementarse adicionalmente mediante el remodelaje de las superficies de interacción de los dominios CH3 utilizando un enfoque de expresión fágica y la introducción de un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant A.M. et al., *Nature Biotech.* 16:677-681, 1998; Atwell S. et al., *J. Mol. Biol.* 270:26-35, 1997). Se describen nuevos enfoques para la tecnología de

5 botón-en-oyal en, por ejemplo, el documento EP nº 1870459A1. Aunque este formato aparentemente resulta muy atractivo, en la actualidad no se dispone de datos que describan la progresión hacia el uso clínico. Una importante limitación de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos parentales deben ser idénticas para evitar el apareamiento incorrecto y la formación de moléculas inactivas. De esta manera, esta técnica no resulta apropiada para el desarrollo sencillo de anticuerpos biespecíficos recombinantes contra dos antígenos partiendo de dos anticuerpos contra el primer y segundo antígenos, debido a que las cadenas pesadas de estos anticuerpos y/o las cadenas ligeras idénticas deben optimizarse.

10 Otro modo de evitar el problema de la aparición de productos secundarios incorrectamente apareados durante la preparación de anticuerpos biespecíficos es la utilización de heterodímeros en lugar de homodímeros, mediante la utilización de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y al que se ha fusionado, en los extremos N-terminales de sus cadenas pesadas, dos fragmentos Fab fusionados que se unen específicamente a un segundo antígeno, tal como se describe en, por ejemplo, el documento WO nº 2001/077342. Una importante desventaja de esta estrategia es la formación de productos secundarios inactivos no deseados por el apareamiento incorrecto de las cadenas ligeras del anticuerpo de longitud completa con los dominios CH1-VH de los fragmentos Fab y por el apareamiento incorrecto de las cadenas ligeras del fragmento Fab con los dominios CH1-VH del anticuerpo de longitud completa.

20 El documento WO nº 2006/093794 se refiere a composiciones de unión a proteína heterodimérica. El documento WO nº 99/37791 describe derivados de anticuerpos con múltiples fines. Morrison S.L. et al., J. Immunol. 160:2802-2808, 1998, se refieren a la influencia del intercambio de dominios de la región variable sobre las propiedades funcionales de la IgG.

25 Descripción resumida de la invención

La invención comprende una proteína biespecífica de unión a antígeno, que comprende:

- a) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de un anticuerpo, que se unen específicamente a un primer antígeno y que comprenden dos fragmentos Fab,
- 30 b) dos fragmentos Fab adicionales de un anticuerpo, que se unen específicamente a un segundo antígeno, en donde dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan, ambos mediante un péptido conector, a los extremos C-terminales o N-terminales de las cadenas pesadas o de las cadenas ligeras en a), y en donde, en los fragmentos Fab se llevan a cabo las modificaciones siguientes:
 - 35 i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/o los dominios constantes C_L y CH1 se sustituyen uno por otro,
 - 40 ii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro
 - 45 iii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,
 - iv) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, o
 - 50 v) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro.

Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de una proteína de unión a antígeno según la invención, que comprende las etapas de:

- 55 a) transformar una célula huésped con
 - vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de una proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención
- 60 b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo, y
- c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

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

- 5 - vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de una proteína de unión a antígeno según la invención.

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

- 10 Una realización adicional de la invención es un método destinado al tratamiento de un paciente que necesita de terapia, caracterizado por la administración en el paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a antígeno según la invención.

- 15 Según la invención, puede mejorarse la proporción entre una proteína biespecífica de unión a antígeno deseada y productos secundarios no deseados, mediante la sustitución de determinados dominios a) en el fragmento Fab del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y/o b) en los dos fragmentos Fab fusionados adicionales. De esta manera, puede reducirse el apareamiento incorrecto no deseado de las cadenas ligeras con los dominios CH1-VH incorrectos.

- 20 Descripción detallada de la invención

La invención comprende una proteína biespecífica de unión a antígeno, que comprende:

- 25 a) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de un anticuerpo, que se unen específicamente a un primer antígeno y que comprende dos fragmentos Fab,

- 30 b) dos fragmentos Fab adicionales de un anticuerpo, que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan, ambos mediante un péptido conector, con los extremos C-terminales o N-terminales de las cadenas pesadas en a), y en los que en los fragmentos Fab se llevaron a cabo las modificaciones siguientes:

- 35 i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,

- ii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,

- 40 iii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,

- 45 iv) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, o

- v) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro.

- 50 En una realización de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan, ambos mediante un péptido conector, a los extremos C-terminales de las cadenas pesadas en a), o a los extremos N-terminales de las cadenas pesadas en a).

- 55 En una realización de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan, ambos mediante un péptido conector, a los extremos C-terminales de las cadenas pesadas en a).

- 60 En una realización de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan, ambos mediante un péptido conector, a los extremos N-terminales de las cadenas pesadas en a).

En una realización de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque en los fragmentos Fab se llevaron a cabo las modificaciones siguientes:

i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente.

5 En una realización de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque en los fragmentos Fab se llevaron a cabo las modificaciones siguientes:

10 i) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.

En una realización de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque en los fragmentos Fab se llevaron a cabo las modificaciones siguientes:

15 i) en ambos fragmentos Fab en a) los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente.

En una realización de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque en los fragmentos Fab se llevaron a cabo las modificaciones siguientes:

20 i) en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.

25 En una realización de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque en los fragmentos Fab se llevaron a cabo las modificaciones siguientes:

i) en ambos fragmentos Fab en b) los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente.

30 Según la invención, la proporción entre la proteína biespecífica de unión a antígeno y los productos secundarios no deseados (debido al apareamiento incorrecto de las cadenas ligeras con los dominios CH1-VH incorrectos) pueden reducirse mediante la sustitución de determinados dominios a) en el fragmento Fab del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente al primer antígeno y/o b) en los dos fragmentos Fab fusionados adicionales. El apareamiento incorrecto en el presente contexto se refiere a la asociación de: i) la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa en a) con los dominios CH1-VH de los fragmentos Fab en b), o ii) la cadena ligera de los fragmentos Fab en b) con los dominios CH1-VH del anticuerpo de longitud completa en a) (ver la fig. 3), conduciendo a productos secundarios inactivos o no totalmente funcionales no deseados.

40 El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo de longitud completa que consiste de dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo (ver la fig. 1). Una cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste en la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 de cadena pesada (CH1) de anticuerpo, una región bisagra (HR) de anticuerpo, un dominio constante 2 de cadena pesada (CH2) de anticuerpo, y un dominio constante 3 de cadena pesada (CH3) de anticuerpo, abreviadamente: VH-CH1-HR-CH2-CH3, y
 45 opcionalmente un dominio constante 4 de cadena pesada (CH4) de anticuerpo en el caso de un anticuerpo de la subclase IgE. Preferentemente, la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste, en la dirección N-terminal a C-terminal, de VH, CH1, HR, CH2 y CH3. La cadena ligera del anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, abreviadamente: VL-CL. El dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo puede ser κ (kappa) o λ (lambda). Las cadenas de anticuerpo se encuentran unidas entre sí mediante enlaces disulfuro entre polipéptidos, entre el dominio C_L y el dominio CH1 (es decir, entre la cadena ligera y la pesada y entre las regiones de bisagra de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa. Son ejemplos de anticuerpos de longitud completa típicos anticuerpos naturales tales como IgG (por ejemplo IgG1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos según la invención pueden ser de una única especie, por ejemplo humanos, o pueden ser anticuerpos quimerizados o humanizados. Los anticuerpos de longitud completa según la invención comprenden dos sitios de unión a antígeno, cada uno formado por una pareja de V_H y V_L , uniéndose ambos específicamente al mismo (primer) antígeno. El extremo C-terminal de las cadenas pesada y ligera de dicho anticuerpo de longitud completa indica el último aminoácido en el extremo C-terminal de dicha cadena pesada o ligera. Dicho anticuerpo comprende dos fragmentos Fab idénticos que consisten
 50 de los dominios V_H y CH1 de la cadena pesada y los dominios V_L y C_L de la cadena ligera (ver las figs. 1 y 2).
 60

- 5 Un "fragmento Fab adicional" (ver la fig. 2) de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno se refiere a un fragmento Fab adicional que consiste de los dominios VH y CH1 de la cadena pesada y los dominios VL y CL de la cadena ligera de dicho segundo anticuerpo. Los fragmentos Fab adicionales se fusionan en su forma no modificada (ver la fig. 3) mediante la parte de cadena pesada (el dominio CH1 o V_H) a los extremos C-terminales o N-terminales de las cadenas ligeras o pesadas del anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno.
- 10 La expresión "péptido conector" tal como se utiliza en la invención se refiere a un péptido con secuencias de aminoácidos que preferentemente es de origen sintético. Estos péptidos conectores según la invención se utilizan para fusionar los péptidos de unión a antígeno al extremo C-terminal o N-terminal de las cadenas del anticuerpo de longitud completa y/o de longitud completa modificado, para formar una proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención. Preferentemente, dichos péptidos conectores bajo c) son péptidos con una secuencia de aminoácidos que presenta una longitud de por lo menos 5 aminoácidos, preferentemente con una longitud de entre 5 y 100, más preferentemente de entre 10 y 50 aminoácidos. En una realización, dicho péptido conector es (G_xS)_n o (G_xS)_nG_m, con G=glicina, S=serina y (x=3, n=3, 4, 5 ó 6, y m=0, 1, 2 ó 3) o (x=4, n=2, 3, 4 ó 5, y m=0, 1, 2 ó 3), preferentemente x=4 y n=2 ó 3, más preferentemente con x=4 y n=2. En una realización, dicho péptido conector es (G₄S)₂.
- 15 Las expresiones "sitio de unión" o "sitio de unión a antígeno" tal como se utilizan en la presente memoria se refiere a una o más regiones de una proteína de unión a antígeno según la invención a las que se une un ligando (por ejemplo el antígeno o un fragmento del mismo) y que se deriva de una molécula de anticuerpo o de un fragmento del mismo (por ejemplo un fragmento Fab). El sitio de unión a antígeno según la invención comprende dominios variables de cadena pesada (VH) de anticuerpo y dominios variables de cadena ligera (VL) de anticuerpo.
- 20 Los sitios de unión a antígeno (es decir, las parejas VH/VL) que se unen específicamente al antígeno deseado pueden derivarse a) de anticuerpos conocidos del antígeno, o b) de nuevos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo obtenidos mediante los métodos de inmunización de novo utilizando, entre otros, la proteína o ácido nucleico de antígeno, o fragmentos de los mismos, o mediante expresión fágica.
- 25 Un sitio de unión a antígeno de una proteína de unión a antígeno de la invención contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuye en grados variables a la afinidad del sitio de unión de antígeno. Existen tres CDRs de dominio variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDRs de dominio variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las regiones CDR y de marco (FRs) se determina mediante comparación con una base de datos compilada a partir de secuencias de aminoácidos en las que dichas regiones se han definido según la variabilidad entre secuencias.
- 30 La especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo o proteína de unión a antígeno para un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que presentan dos especificidades de unión a antígeno diferentes. En el caso de que un anticuerpo presente más de una especificidad, los epítipos reconocidos pueden asociarse a un único antígeno o a más de un antígeno.
- 35 El término "monoespecífico" referido a un anticuerpo o proteína de unión a antígeno tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo o proteína de unión a antígeno que presenta uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítipo del mismo antígeno.
- 40 El término "valente" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Un anticuerpo natural, por ejemplo, o un anticuerpo de longitud completa según la invención, presenta dos sitios de unión y es bivalente. El término "tetraivalente" se refiere a la presencia de cuatro sitios de unión en una proteína de unión a antígeno. La expresión "biespecífico tetraivalente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína de unión a antígeno según la invención que presenta cuatro sitios de unión a antígeno de entre los que dos se unen a otro antígeno (o a otro epítipo del antígeno). Las proteínas de unión a antígeno de la presente invención presentan cuatro sitios de unión y son tetraivalentes.
- 45 Los anticuerpos de longitud completa de la invención comprenden regiones constantes de inmunoglobulina de una o más clases de inmunoglobulina. Entre las clases de inmunoglobulina se incluyen los isotipos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y, en el caso de IgA e IgA, los subtipos de las mismas. En una realización preferente, un anticuerpo de longitud completa de la invención presenta una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG.
- 50 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de anticuerpo o anticuerpos o moléculas de proteína de unión a antígeno de una única composición de aminoácidos.
- 55
- 60

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir la región de unión, procedente de una fuente o especie, y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana resultan preferentes. Otras formas preferentes de "anticuerpos quiméricos" comprendidas en la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión de receptor Fc (FcR). Este tipo de anticuerpos quiméricos también se denomina "anticuerpos de clase intercambiada". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN codificantes de regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN codificantes de regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica que son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Morrison S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984; patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244).

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) han sido modificadas para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente de la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, se injerta una CDR murina en la región marco de un anticuerpo humano para preparar un "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann, L. et al., Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger, M.S. et al., Nature 314:268-270, 1985. Las CDRs particularmente preferentes corresponden a aquéllas que representan secuencias que reconocen los anteriormente indicados antígenos de los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" comprendidas dentro de la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la del receptor de Fc (FcR).

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos del estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5:368-374, 2001). También pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el reto de antígeno (ver, por ejemplo, Jakobovits A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555, 1993; Jakobovits A. et al., Nature 362:255-258, 1993; Brueggemann M. et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de expresión fágica (Hoogenboom, H.R. y Winter, G., J. Mol. Biol. 227:381-388, 1992; Marks, J.D. et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991). Las técnicas de Cole et al. y de Boerner et al. también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole S.P.C. et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, páginas 77 a 96, 1985, y Boerner P. et al., J. Immunol. 147:86-95, 1991). Tal como se ha indicado para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, la expresión "anticuerpo humano" tal como se utiliza en la presente memoria también comprende anticuerpos modificados en la región constante para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión de FcR, por ejemplo mediante "intercambio de clase", es decir, el cambio o la mutación de partes de Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).

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

La expresión "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (V_L), región variable de una cadena pesada (V_H)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada cadena de la pareja de cadenas ligera y pesada que participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas variables ligeras y pesadas humanas presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas y conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDRs). Las regiones de marco adoptan una conformación de hoja β y las CDR pueden formar bucles que conecten la estructura de hojas β . Las CDRs en cada cadena son mantenidas

en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDRs de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y, por lo tanto, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

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

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "de unión" o "de unión específica" se refieren a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno en un ensayo in vitro, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare, Uppsala, Suecia) con antígeno de tipo salvaje purificado. La afinidad de unión está definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo (o anticuerpo o proteína de unión a antígeno) del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). La unión o la unión específica se refieren a una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o menos, preferentemente de entre 10^{-9} M y 10^{-13} moles/l. De esta manera, una proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se une específicamente a cada antígeno para el que es específico con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o menos, preferentemente de entre 10^{-9} y 10^{-13} moles/l.

25 La unión del anticuerpo a FcγRIII puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define con los términos k_a (constante de tasa para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a).

30 El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el determinante epítipo incluye grupos superficiales químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales sacáridas, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas realizaciones, puede presentar características estructurales tridimensionales específicas, o presentar características de carga específica. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo.

35 En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno en el caso de que reconozca preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

40 En una realización adicional, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG1 humana, o de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A.

45 En una realización adicional, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG2 humana.

En una realización adicional, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG3 humana.

50 En una realización adicional, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG4 humana o de la subclase IgG4 humana con la mutación adicional S228P.

55 Preferentemente, la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo de longitud completa es de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG4 humana con la mutación adicional S228P.

60 Ahora se ha encontrado que las proteínas biespecíficas de unión a antígeno según la invención presentan características mejoradas, tales como actividad biológica o farmacológica, propiedades farmacocinéticas o toxicidad. Pueden utilizarse, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

La expresión "región constante" tal como se utiliza en las presentes solicitudes se refiere a la suma de los dominios de un anticuerpo que no son la región variable. La región constante no se encuentra directamente implicada en la

unión de un antígeno, aunque muestra diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de cadena ligera (CL) que pueden encontrarse en la totalidad de las cinco clases de anticuerpo se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

La expresión "región constante derivada de un origen humano" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una región constante de cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4 y/o una región constante de cadena ligera kappa o lambda. Dichas regiones constantes son bien conocidas del estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, Kabat, E.A. (ver, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28:214-218, 2000; Kabat, E.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2785-2788, 1975).

Mientras que los anticuerpos de la subclase IgG4 muestran un nivel reducido de unión del receptor de Fc (FcγRIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 son residuos que, en caso de alterarse, también proporcionan un nivel reducido de unión de Fc (Shields, R.L. et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, 2001; Lund, J. et al., *FASEB J.* 9:115-119, 1995; Morgan, A. et al., *Immunology* 86:319-324, 1995; patente EP nº 0 307 434).

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

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

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

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

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales pueden potenciarse mediante la manipulación de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umana P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180, 1999, y la patente US nº 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos terapéuticos utilizados más habitualmente, son glucoproteínas que presentan un sitio N-ligado de glucosilación conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia resulta esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely M. R. et al., *Glycobiology* 5:813-822, 1995; Jefferis R. et al., *Immunol. Rev.* 163:59-76, 1998; Wright

A. y Morrison S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). Umana, P. et al. Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y el documento WO n° 99/54342 mostraron que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, incrementaba significativamente la actividad de ADCC in vitro de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición del carbohidrato de Asn297 ó su eliminación también afecta a la unión a Fc γ R y a C1q (Umana P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999; Davies J. et al., Biotechnol. Bioeng. 74:288-294, 2001; Mimura Y. et al., J. Biol. Chem. 276:45539-45547, 2001; Radaev S. et al., J. Biol. Chem. 276:16478-16483, 2001; Shields R.L. et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001; Shields R.L. et al., J. Biol. Chem. 277:26733-26740, 2002; Simmons L.C. et al., J. Immunol. Methods 263:133-147, 2002).

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

En una realización preferente de la invención, la proteína biespecífica de unión a antígeno se encuentra glucosilada (en el caso de que comprenda una parte Fc de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4, preferentemente de la subclase IgG1 ó IgG3) con una cadena sacárida en Asn297, de manera que la proporción de fucosa en dicha cadena sacárida es 65% o inferior (numeración según Kabat). En otra realización, la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena sacárida se encuentra comprendida entre 5% y 65%, preferentemente entre 20% y 40%. El término "Asn297" según la invención se refiere al aminoácido asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región de Fc. Basándose en variaciones menores de la secuencia de los anticuerpos, Asn297 también puede localizarse a algunos aminoácidos (habitualmente a no más de 63 aminoácidos) cadena arriba o abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300. En una realización, la proteína de unión a antígeno glucosilada según la invención es de una subclase de IgG, es de la subclase IgG1 humana, de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A o de la subclase IgG3. En una realización adicional, la cantidad de ácido N-glucolilneuramínico (NGNA) es de 1% o menos, y/o la cantidad de alfa-1,3-galactosa N-terminal es de 1% o menos dentro de dicha cadena sacárida. La cadena sacárida muestra preferentemente las características de los glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula CHO.

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

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

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

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

La proteína de unión a antígeno según la invención se produce por medios recombinantes. De esta manera, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico codificante de la proteína de unión a antígeno según la invención, y un aspecto adicional es una célula que comprende dicho ácido nucleico codificante de una proteína de

unión a antígeno según la invención. Los métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el posterior aislamiento de la proteína de unión a antígeno y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos tal como se ha indicado anteriormente en una célula huésped, se insertan ácidos nucleicos codificantes de las cadenas ligeras y pesadas modificadas respectivas en los vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, por ejemplo células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, células de levadura o de *E. coli*, y la proteína de unión a antígeno se recupera a partir de las células (del sobrenadante o de las células tras la lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos del estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17:183-202, 1999; Geisse, S. et al., *Protein Expr. Purif.* 8:271-282, 1996; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16:151-160, 2000; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

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

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

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

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

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

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

de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o linker según la práctica convencional.

5 La purificación de los anticuerpos se lleva a cabo con el fin de eliminar los componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/de SDS, la formación de bandas en CsCl, la cromatografía de columna, la electroforesis en gel de agarosa, y otras técnicas bien conocidas de la técnica. Ver Ausubel, F. et al., editor, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987. Una serie de diferentes métodos se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados para la purificación de proteínas, tales como la 10 cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75:93-102, 1998).

20 Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígeno según la invención. Otro aspecto de la invención es la utilización de una proteína de unión a antígeno según la invención para la preparación de una composición farmacéutica. Un aspecto adicional de la invención es un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígeno según la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene una proteína de unión a antígeno según la presente invención, formulada conjuntamente con un portador farmacéutico.

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

30 Otro aspecto de la invención es la proteína biespecífica de unión a antígeno según la invención destinada al tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es la utilización de una proteína de unión a antígeno según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer. Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de un paciente que sufre de cáncer, mediante la administración de una proteína de unión a antígeno según la invención en dicho paciente que necesita de dicho tratamiento.

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

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

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

60 El término "cáncer" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de células pulmonares no pequeñas (NSCL), cáncer pulmonar de células bronquioloalveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal,

5 cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependinomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewings, incluyendo las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriormente indicados, o
10 de una combinación de uno o más de los cánceres anteriormente indicados.

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

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

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

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

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

45 Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada. En donde se pretendan utilizar denominaciones diferentes, éstas resultarán evidentes a
50 partir del contexto.

El término "transformación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento de transferencia de un vector/ácido nucleico al interior de una célula huésped. En el caso de que se utilicen células sin barreras de pared celular fuertes como células huésped, la transfección se lleva a cabo, por ejemplo, mediante el método de precipitación con fosfato de calcio, tal como describen Graham F.L. y Van der Eb A.J., Virology 52:456-467, 1973. Sin embargo, también pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como la inyección nuclear o mediante fusión de protoplastos. En el caso de que se utilicen células procarióticas o células que contienen construcciones sustanciales de pared celular, un método de transfección es, por ejemplo, el tratamiento con calcio utilizando cloruro de calcio tal como se describe en Cohen S.N. et al., PNAS 69 (1972) 2110-2114.
55

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "expresión" se refiere al procedimiento por el que se transcribe un ácido nucleico en ARNm y/o al procedimiento por el que el ARNm transcrito (también denominado transcrito) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos

- codificados se denominan colectivamente “producto génico”. En el caso de que se derive el polinucleótido de ADN genómico, la expresión en una célula eucariótica puede incluir el procesamiento del ARNm. Un “vector” es una molécula de ácidos nucleicos, en particular autorreplicativa, que transfiere una molécula de ácidos nucleicos insertada al interior de células huésped o entre las mismas. El término incluye vectores que funcionan principalmente insertando ADN o ARN en una célula (por ejemplo la integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan principalmente replicando ADN o ARN, y los vectores de expresión que funcionan transcribiendo y/o traduciendo ADN o ARN. También se encuentran incluidos los vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriormente descritas.
- 5
- 10 Un “vector de expresión” es un polinucleótido que, al introducirlo en una célula huésped apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un “sistema de expresión” habitualmente se refiere a una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar rindiendo un producto de expresión deseado.
- 15 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción del listado de secuencias

- 20 SEC ID nº 1 <Ang-2> de cadena pesada no modificada con dominios VH-CL de <VEGF> fusionados C-terminalmente de fragmento Fab modificado (intercambio CH1-CL)
- SEC ID nº 2 dominios VL-CH1 de <VEGF> de fragmento Fab modificado (intercambio CH1-CL)
- SEC ID nº 3 <Ang-2> de cadena ligera no modificado
- SEC ID nº 4 <Ang-2> de cadena pesada no modificado con dominios VH-CL de <VEGF> fusionados N-terminalmente de fragmento Fab modificado (intercambio CH1-CL)
- 25 SEC ID nº 5 <VEGF> de cadena pesada modificada (intercambio CH1-CL) con dominios VH-CH1 de <Ang-2> fusionados C-terminalmente de fragmento Fab no modificado

Descripción de las figuras

- Figura 1 Estructura esquemática de un anticuerpo de longitud completa sin unión específica del dominio CH4 a un primer antígeno 1 con dos parejas de cadena pesada y cadena ligera que comprenden dominios variables y constantes en un orden típico.
- Figuras 2a y 2b Estructura esquemática de fragmentos Fab no modificados típicos que se unen específicamente a un segundo antígeno 2 con el péptido conector en el extremo C-terminal (figura 2a) o en el extremo N-terminal (figura 2b) de la cadena CH1-VH.
- Figura 3 Estructura esquemática de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno 1 al que se ha fusionado en el extremo N-terminal de su cadena pesada dos fragmentos Fab no modificados que se unen específicamente a un segundo antígeno 2 (fig. 3a) y los productos secundarios no deseados debido al apareamiento incorrecto (figs. 3b y fig. 3c).
- Figuras 4a, 4b y 4c Estructura esquemática de unas proteínas biespecíficas de unión a antígeno según la invención en las que el apareamiento incorrecto se ha reducido mediante la sustitución de determinados dominios a) en el fragmento Fab del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno 1 y/o b) en los dos fragmentos Fab fusionados adicionales que se unen específicamente a un segundo antígeno 2. La figura 4a muestra proteínas biespecíficas de unión a antígeno. Las figuras 4b y 4c muestran todas las combinaciones de intercambios de dominios VH/VL y/o CH1/CL dentro de los fragmentos Fab de longitud completa y los fragmentos Fab de longitud completa que conducen a proteínas biespecíficas de unión a antígeno según la invención que presentan un nivel reducido de apareamiento incorrecto.
- Figura 5 Estructura esquemática de proteínas biespecíficas de unión a antígeno según la invención que reconocen Ang-2 y VEGF (Ejemplo 1).
- Figura 6 Estructura esquemática de proteínas biespecíficas de unión a antígeno según la invención que reconocen Ang-2 y VEGF (Ejemplo 2).
- Figura 7 Estructura esquemática de proteínas biespecíficas de unión a antígeno según la invención que reconocen Ang-2 y VEGF (Ejemplo 3).

Ejemplos

Materiales y métodos generales

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

Técnicas de ADN recombinante

- 15 Se utilizan métodos estándares para manipular el ADN, tal como se describe en Sambrook J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Síntesis génica

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

Determinación de la secuencia de ADN

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

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

- 35 El paquete informático del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), versión 10.2, y el programa informático Vector NT1 Advance suite versión 8.0 de Infomax, se utilizaron para la creación de secuencias, mapeado, análisis, anotación e ilustración.

Vectores de expresión

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

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

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

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

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

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

Técnicas de cultivo celular

Se utilizaron técnicas estándares de cultivo celular tales como las descritas en *Current Protocols in Cell Biology*, Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. y Yamada K.M. (editores), John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Se expresaron anticuerpos biespecíficos tetravalentes mediante cotransfección transitoria de los tres plásmidos de expresión respectivos en células HEK293-EBNA en crecimiento adherente o en células HEK29-F que crecían en suspensión, tal como se describe posteriormente.

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-EBNA

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

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

Alternativamente, se generaron anticuerpos biespecíficos tetravalentes mediante transfección transitoria de los plásmidos respectivos (por ejemplo codificantes de la cadena pesada modificada, así como las cadenas ligera y ligera modificada correspondientes) utilizando el sistema HEK293F (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se transfectaron células HEK293-F (Invitrogen) cultivadas en suspensión en un matraz de agitación o en un fermentador bajo agitación en medio de expresión FreeStyle 293 libre de suero (Invitrogen) se transfectaron con una mezcla de los tres plásmidos de expresión tal como se ha indicado anteriormente y 293fectina o 293fectina (Invitrogen). Para un matraz oscilante de 2 litros (Corning) se sembraron células HEK293-F a una densidad de 10^6 células/ml en 600 ml y se incubaron a 120 rpm, en 8% de CO₂. El día después de transfectar las células a una densidad celular de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con aproximadamente 42 ml de mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 μg de ADN total de plásmido (1 μg/ml) codificante de cadena pesada modificada, de la cadena ligera correspondiente y de la cadena ligera modificada correspondiente, en proporción equimolar, y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml de 293fectina o 293fectina (2 μl/ml). Según el consumo de glucosa, se añadió solución de glucosa durante el curso de la fermentación. Tras 5 a 10 días se recolectó el sobrenadante que contenía el anticuerpo secretado, y los anticuerpos se purificaron directamente del sobrenadante o el sobrenadante se congeló y se almacenó.

Determinación de proteínas

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

Determinación de la concentración de anticuerpos en sobrenadantes

Se estimó la concentración de anticuerpos biespecíficos tetravalentes en sobrenadantes de cultivo celular mediante inmunoprecipitación con perlas de proteína A-agarosa (Roche). Se lavaron 60 μl de perlas de agarosa-proteína A

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

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

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

Purificación de proteínas

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

SDS-PAGE

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

Cromatografía analítica de exclusión por tamaño

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

Espectrometría de masas

Se determinó y se confirmó la masa desglucosilada total de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (EM-IEP). Brevemente, se desglucosilaron 100 mg de anticuerpos purificados con N-glucosidasa F (PNGasaF, ProZyme) 50 mM en $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM, pH 7, a 37°C durante 12 a 24 horas a una concentración de proteínas de hasta 2 mg/ml y posteriormente se desalaron mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). Se determinó la masa de las cadenas pesada modificada, ligera y ligera modificada respectivas mediante ESI-MS tras la desglucosilación y reducción. Brevemente, se incubaron 50 µg de anticuerpo biespecífico tetravalente en 115 µl, con 60 µl de TCEP 1 M y 50 µl de hidrocloreuro de guanidina 8 M posteriormente desalado. Se determinó la masa total y la masa de las cadenas pesada y ligera reducidas mediante ESI-MS en un sistema Q-Star Elite MS dotado de una fuente NanoMate.

ELISA de unión a VEGF

Se evaluaron las propiedades de unión de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes en un ensayo ELISA con proteína VEGF165-His de longitud completa (R&D Systems). Para ello, se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno transparente mejoradas Falcon, con 100 µl de VEGF165 humana recombinante 2 µg/ml (R&D Systems) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y se bloquearon con 200 µl de BSA al 2%-Tween-20 al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con 300 µl de PBST. Se añadieron 100 µl/pocillo de una serie de dilución de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes purificados en PBS (Sigma) a los pocillos y se incubaron durante 1 hora en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y se detectó el anticuerpo unido con 100 µl/pocillo de F(ab') 0,1 mg/ml <Fc-gamma_h>POD (Immunoresearch) en BSA al 2%-Tween-20 al 0,1% como anticuerpo de detección durante 1 hora en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Se lavó el anticuerpo de detección no unido, tres veces con 300 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia: 492 nm).

Unión de VEGF: Caracterización cinética de la unión de VEGF a 37°C mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore)

Con el fin de corroborar adicionalmente los resultados del ELISA, se analizó cuantitativamente la unión de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes a VEGF utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore T100 según el protocolo siguiente y utilizando el paquete de software del T100. Brevemente, se capturaron anticuerpos biespecíficos tetravalentes en un chip CM5 mediante la unión a IgG de cabra antihumana (JIR 109-005-098). El anticuerpo de captura se inmovilizó mediante acoplamiento de grupos amino utilizando acoplamiento estándar de aminos, de la manera siguiente: El tampón HBS-N sirvió como tampón de corrido, la activación se llevó a cabo con la mezcla EDC/NHS con el objetivo de una densidad de ligando de 700 RU. Se diluyó el anticuerpo de captura en tampón de acoplamiento NaAc, pH 5,0, c=2 µg/ml, finalmente se bloquearon los grupos carboxilo todavía activados mediante inyección de etanolamina 1 M. La captura de los anticuerpos de <VEGF> biespecíficos tetravalentes se realizó a un caudal de 5 µl/minuto y c=10 nM, se diluyó con tampón de migración + BSA 1 mg/ml; debería alcanzarse un nivel de captura de aproximadamente 30 RU. Se utilizó VEGFrh (VEGFrh, R&D Systems nº de cat. 293-VE) como analito. La caracterización cinética de la unión de VEGF a los anticuerpos de <VEGF> biespecíficos tetravalentes se llevó a cabo a 25°C o a 37°C en PBS + Tween-20 al 0,005% (v/v) como tampón de corrido. Se inyectó la muestra a un caudal de 50 µl/minuto y un tiempo de asociación de 80 segundos y un tiempo de disociación de 1.200 segundos, con una serie de concentraciones de VEGFrh de 300 a 0,29 nM. La regeneración de la superficie de anticuerpo de captura libre se llevó a cabo con glicina 10 mM, pH 1,5, y un tiempo de contacto de 60 segundos tras cada ciclo de analito. Se calcularon las constantes cinéticas mediante la utilización del método habitual de doble referenciado (referencia de control: unión de VEGFrh a molécula de captura de anticuerpo de cabra anti-IgG humana, blancos en la celda de flujo de medición, concentración de VEGFrh "0", modelo: de Langmuir unión 1:1 (se fijó la Rmax a local debido a la unión de moléculas de captura).

ELISA de unión de Ang-2

Se evaluaron las propiedades de unión de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes en un ensayo ELISA con proteína Ang-2-His de longitud completa (R&D Systems). Para ello, se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno transparente mejoradas Falcon con 100 µl de Ang-2 humana recombinante 1 µg/ml (R&D Systems, sin portador) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y se bloquearon con 200 µl de BSA al 2%-Tween-20 al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con 300 µl de PBST. Se añadieron 100 µl/pocillo de una serie de dilución de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes purificados en PBS (Sigma) a los pocillos y se incubaron durante 1 hora en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y el anticuerpo unido se detectó con 100 µl/pocillo de F(ab') de <h>POD (Biozol nº de cat. 206005) 0,1 mg/ml en BSA al 2%-Tween-20 al 0,1% como

anticuerpo de detección, durante 1 hora en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Se lavó el anticuerpo de detección no unido, tres veces con 300 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia: 492 nm).

5

BIACORE de unión de Ang-2

Se investigó la unión de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes a Ang-2 humana mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para las mediciones de afinidad, se inmovilizaron anticuerpos policlonales de cabra <hlgG-Fcγ> en un chip CM5 mediante acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes contra Ang-2 humano. La unión se midió en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,005%, pH 7,4), 25°C. Se añadió Ang-2-His purificado (R&S Systems o purificado en el propio laboratorio) en diversas concentraciones en solución. Se midió la asociación mediante una inyección de Ang-2 de 3 minutos; se midió la disociación mediante lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 minutos y se estimó un valor de K_D utilizando un modelo de unión de Lagmuir 1:1. Debido a la heterogeneidad de la preparación de Ang-2, no pudo observarse unión 1:1; de esta manera, los valores de K_D sólo son estimaciones relativas. Se restaron los datos de control negativo (por ejemplo las curvas de tampón) de las curvas de muestras para la corrección de la deriva intrínseca de la línea base del sistema y para la reducción de la señal de ruido. Se utilizó el programa Biacore T100 Evaluation versión 1.1.1, para el análisis de los sensorgramas y para el cálculo de los datos de afinidad. Alternativamente, pudo capturarse Ang-2 a un nivel de captura de entre 2.000 y 1.700 UR mediante un anticuerpo pentaHis (PentaHis-Ab sin BSA, Qiagen nº 34660) inmovilizado sobre un chip CM5 mediante acoplamiento de aminas (sin BSA) (ver posteriormente).

10

15

20

25

ELISA de formación de puentes de Ang-2-VEGF

Se evaluaron las propiedades de unión de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes en un ensayo ELISA con proteína VEGF165-His de longitud completa inmovilizada (R&D Systems) y proteína Ang-2-His humana (R&D Systems) para la detección de anticuerpo biespecífico unido. Únicamente un anticuerpo biespecífico tetravalente de <VEGF-Ang-2> era capaz de unirse simultáneamente a VEGF y a Ang-2, y de esta manera establecer un puente entre los dos antígenos, mientras que los anticuerpos IgG1 mono-específicos “estándares” no eran capaces de unirse simultáneamente a VEGF y a Ang-2 (figura 7).

30

35

40

45

50

Para ello, se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno transparente mejoradas Falcon, con 100 µl de VEGF165 humana recombinante 2 µg/ml (R&D Systems) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y se bloquearon con 200 µl de BSA al 2%-Tween-20 al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con 300 µl de PBST. Se añadieron 100 µl/pocillo de una serie de dilución de anticuerpos biespecíficos tetravalentes purificados en PBS (Sigma) a los pocillos y se incubaron durante 1 hora en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y los anticuerpos unidos se detectaron mediante la adición de 100 µl de Ang-2-His humana 0,5 µg/ml (R&D Systems) en PBS. Se lavaron los pocillos tres veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y el Ang-2 unido se detectó con 100 µl de anticuerpo de <Ang-2>mIgG1-biotina 0,5 µg/ml (BAM0981, R&D Systems) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se lavó tres veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y los anticuerpos unidos se detectaron mediante la adición de 100 µl de conjugado de estreptavidina-POD 1:2.000 (Roche Diagnostics GmbH, nº de cat. 11089153) diluido 1:4 en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. El conjugado de estreptavidina-POD no unido se lavó tres-seis veces con 300 µl de PBST (Tween-20 al 0,2%) y el conjugado de estreptavidina-POD unido se detectó mediante la adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia: 492 nm).

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

55

60

Con el fin de corroborar adicionalmente los datos de la ELISA de formación de puentes, se estableció un ensayo adicional para confirmar la unión simultánea a VEGF y a Ang-2 utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore T100 siguiendo el protocolo siguiente, y realizando el análisis con el paquete de software del T100 (T100 Control, versión 2.01, T100 Evaluation, versión 2.01, T100 Kinetics Summary, versión 1.01): Se capturó Ang-2 con un nivel de captura de entre 2.000 y 1.700 RU en PBS, tampón de corrido Tween-20 al 0,005% (v/v), utilizando un anticuerpo PentaHis (PentaHis-Ab sin BSA, Qiagen nº 34660) inmovilizado sobre un chip CM5 mediante acoplamiento de grupos amina (sin BSA). El tampón HBS-N sirvió como tampón de corrido durante el acoplamiento; la activación se llevó a cabo con una mezcla de EDC/NHS. El anticuerpo de captura PentaHis-Ab sin BSA se diluyó en tampón de acoplamiento NaAc, pH 4,5, c=30 µg/ml, finalmente los grupos carboxilo todavía

activados se bloquearon mediante la inyección de etanolamina 1 M; se sometieron a ensayo densidades de ligando de entre 5.000 y 17.000 UR. Se capturó Ang-2 a una concentración de 500 nM con el anticuerpo PentaHis-Ab a un caudal de 5 µl/minuto diluido con tampón de migración + BSA 1 mg/ml. A continuación, se demostró la unión a Ang-2 y a VEGF del anticuerpo biespecífico tetravalente <Ang-2, VEGF> mediante incubación con VEGFrh y la formación de un complejo sándwich. Para ello, se unió el anticuerpo biespecífico tetravalente <VEGF-Ang-2> a Ang-2 a un caudal de 50 µl/minuto y a una concentración de 100 nM, se diluyó con tampón de migración + BSA 1 mg/ml y se detectó la unión simultánea mediante incubación con VEGF (VEGFrh, R&D-Systems, nº de cat. 293-VE) en PBS + tampón de migración Tween-20 al 0,005% (v/v) a un caudal de 50 µl/minuto y una concentración de VEGF de 150 nM. Tiempo de asociación: 120 s; tiempo de disociación: 1.200 s. La regeneración se llevó a cabo tras cada ciclo a un caudal de 50 µl/minuto con 2x10 mM de glicina, pH 2,0, y un tiempo de contacto de 60 s. Se corrigieron los sensorgramas utilizando el método habitual de doble referenciado (referencia de control: unión de anticuerpo biespecífico y VEGFrh a la molécula de captura PentaHisAb). Se midieron los blancos para cada Ab con VEGFrh concentración "0".

15 Generación de la línea celular HEK293-Tie2

Con el fin de determinar la interferencia de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes <Ang-2, VEGF> con la fosforilación de Tie2 estimulada por Ang-2 y la unión de Ang-2 a Tie2 sobre las células, se generó una línea celular recombinante HEK293-Tie. Brevemente, se transfectó un plásmido basado en pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) codificante de Tie2 humano de longitud completa bajo el control de un promotor de CMV y un marcador de resistencia a la neomicina, utilizando Eugene (Roche Applied Science) como reactivo de transfección en células HEK293 (ATCC) y las células resistentes se seleccionaron en DMEM+FCS al 10%, G418 500 µg/ml. Se aislaron clones individuales mediante un aro de clonación, y se analizaron posteriormente para la expresión de Tie2 mediante FACS. Se identificó el clon 22 como clon con elevada expresión estable de Tie2, incluso en ausencia de G418 (HEK293-Tie2 clon 22). Seguidamente se utilizó HEK293-Tie2 clon 22 para los ensayos celulares siguientes: ensayo de fosforilación de Tie2 inducida por Ang-2 y ensayo de unión de ligando celular Ang-2.

Ensayo de fosforilación de Tie2 inducida por Ang-2

Se midió la inhibición de la fosforilación de Tie2 inducida por Ang-2 por parte de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes <Ang-2, VEGF> según el principio de ensayo siguiente. Se estimuló HEK293-Tie2 clon 22 con Ang-2 durante 5 minutos en ausencia o en presencia de anticuerpo de Ang-2 y se cuantificó P-Tie2 mediante un ELISA de tipo sándwich. Brevemente, se cultivaron 2x10⁵ células de HEK293-Tie2 clon 22 por pocillo durante la noche en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubiertos con poli-D-lisina en 100 µl de DMEM, FCS al 10%, geneticina 500 mg/ml. Al día siguiente, se preparó una fila de titulación de anticuerpos biespecíficos tetravalentes <Ang-2, VEGF> en una placa de microtitulación (concentrada 4 veces, volumen final de 75 µl/pocillo, por duplicado) y se mezcló con 75 µl de una dilución de Ang-2 (R&D Systems, nº 623-AN) (3,2 mg/ml en forma de solución concentrada 4 veces). Se preincubaron anticuerpos y Ang-2 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de la mezcla a las células HEK293-Tie2 clon 22 (preincubadas durante 5 minutos con NaV₃O₄ 1 mM, Sigma nº S6508) y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. A continuación, las células se lavaron con 200 µl de PBS helado + NaV₃O₄ 1 mM por pocillo y se lisaron mediante la adición de 120 µl de tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, NP-40 al 1%, glicerol al 10%, EDTA 2 mM, NaV₃O₄ 1 mM, PMSF 1 mM y aprotinina 10 mg/ml) por pocillo sobre hielo. Se lisaron las células durante 30 minutos a 4°C en un agitador de placas de microtitulación y se transfirieron directamente 100 µl de lisado a una placa de microtitulación ELISA de p-Tie2 (R&D Systems, R&D nº DY990) sin centrifugación previa y sin determinación de las proteínas totales. Se cuantificaron las cantidades de P-Tie2 siguiendo las instrucciones del fabricante y se determinaron los valores de IC₅₀ para la inhibición utilizando el plug-in de análisis XLfit4 para Excel (respuesta de dosis de un sitio, modelo 205). Los valores de IC₅₀ pueden compararse dentro de un experimento dado, pero pueden variar entre experimentos.

50 Ensayo de proliferación de HUVEC inducida por VEGF

La proliferación de HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana, Promocell nº C-12200) inducida por VEGF se seleccionó para medir la función celular de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes <Ang-2, VEGF>. Brevemente, se incubaron 5.000 células HUVEC (número de pases reducido, ≤5 pases) por cada pocillo de placa de 96 pocillos, en 100 µl de medio de ayuno (EMB-2, medio endotelial basal 2, Promocell nº C-22211, FCS al 0,5%, penicilina/estreptomicina) en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con colágeno I BD Biocoat Collagen I (BD nº 354407/35640) durante la noche. Se mezclaron diversas concentraciones de anticuerpo biespecífico tetravalente <Ang-2, VEGF> con VEGFrh (concentración final: 30 ng/ml, BD nº 354107) y se preincubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la mezcla a las células HUVEC y se incubaron durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. El día del análisis, la placa se equilibró a la temperatura ambiente durante 30 minutos y se determinó la viabilidad/proliferación celular utilizando el kit de ensayo luminiscente de viabilidad celular CellTiter-Glo™ según el manual (Promega, nº G7571/2/3). Se determinó la luminiscencia con un espectrofotómetro.

Ejemplo 1

5 Producción, expresión, purificación y caracterización de un anticuerpo biespecífico y tetravalente que reconoce Ang-2 y VEGF-A

10 En un primer ejemplo, se preparó un anticuerpo biespecífico tetravalente sin un conector entre las cadenas respectivas de anticuerpo que reconocían Ang-2 y VEGF-A, mediante la fusión mediante un conector (G4S)₄ de una fusión de dominios VH-CL contra VEGF-A con el extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que reconoce Ang-2 (SEC1 o un alotipo de IgG1 correspondiente). Con el fin de obtener el anticuerpo biespecífico tetravalente, dicho constructo de cadena pesada se coexpresó con plásmidos codificantes de la cadena ligera respectiva del anticuerpo Ang-2 (SEC3) y una fusión de dominios VL-CH1 que reconocía VEGF-A (SEC2). El esquema del anticuerpo respectivo se proporciona en la fig. 5.

15 El anticuerpo biespecífico tetravalente se generó tal como se describe en la sección de métodos generales, mediante técnicas clásicas de biología molecular, y se expresó transitoriamente en células HEK293F tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, se purificó a partir del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaños. El producto obtenido se caracterizó para la identidad mediante espectrometría de masas y propiedades analíticas, tales como la pureza, 20 mediante SDS-PAGE, contenido de monómeros y estabilidad.

Expresión	Purificación	
Título [µg/ml]	rendimiento de producto final	homogeneidad (producto final)
21	19,2 mg/L	95%

25 Estos datos demuestran que el anticuerpo biespecífico tetravalente puede producirse con un buen rendimiento y que es estable.

30 A continuación, se estudió la unión a Ang-2 y a VEGF-A, así como la unión simultánea, mediante los ensayos ELISA y Biacore indicados anteriormente, y se analizaron propiedades funcionales, tales como la inhibición de la fosforilación de Tie2 y la inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF, mostrando que el anticuerpo biespecífico tetravalente generado era capaz de unirse a Ang-2 y a VEGF-A y de bloquear sus actividades simultáneamente.

Ejemplo 2

35 Producción, expresión, purificación y caracterización de un anticuerpo biespecífico y tetravalente que reconoce Ang-2 y VEGF-A

40 En un segundo ejemplo, se preparó un anticuerpo biespecífico tetravalente sin conector entre las cadenas de anticuerpo respectivas que reconocía Ang-2 y VEGF-A, mediante la fusión con un conector (G4S)₄ de una fusión de dominios VH-CL contra VEGF-A con el extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que reconocía Ang-2 (SEC4 ó un alotipo de IgG1 correspondiente). Con el fin de obtener el anticuerpo biespecífico tetravalente, dicho constructo de cadena pesada se coexpresó con plásmidos codificantes de la cadena ligera respectiva del anticuerpo Ang-2 (SEC3) y una fusión de dominios VL-CH1 que reconocía VEGF-A (SEC2). El esquema del anticuerpo respectivo se proporciona en la fig. 6.

45 El anticuerpo biespecífico tetravalente se generó tal como se describe en la sección de métodos generales mediante técnicas clásicas de biología molecular, y se expresó transitoriamente en células HEK293F tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, se purificó a partir del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaños. El producto obtenido se caracterizó para la identidad mediante espectrometría de masas y propiedades analíticas, tales como la pureza, 50 mediante SDS-PAGE, contenido de monómeros y estabilidad.

Expresión	Purificación	
Título [µg/ml]	rendimiento de producto final	homogeneidad (producto final)
18	12,4 mg/L	95%

55 Estos datos demuestran que el anticuerpo biespecífico tetravalente puede producirse con un buen rendimiento y que es estable.

A continuación, se estudió la unión a Ang-2 y a VEGF-A, así como la unión simultánea, mediante los ensayos ELISA y Biacore indicados anteriormente, y se analizaron propiedades funcionales, tales como la inhibición de la

fosforilación de Tie2 y la inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF, mostrando que el anticuerpo biespecífico tetravalente generado era capaz de unirse a Ang-2 y a VEGF-A y de bloquear sus actividades simultáneamente.

5 Ejemplo 3

Producción, expresión, purificación y caracterización de un anticuerpo biespecífico y tetravalente que reconoce Ang-2 y VEGF-A

10 En un tercer ejemplo, se preparó un anticuerpo biespecífico tetravalente sin un linker entre las cadenas de anticuerpo respectivas que reconoce Ang-2 y VEGF-A, mediante la fusión mediante un conector (G₄S)₄ de un dominio Fab VH-CH1 contra Ang-2 con el extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo de intercambio CH1-CL que reconoce VEGF (SEC 5 o un alotipo de IgG1 correspondiente). Con el fin de obtener el anticuerpo biespecífico tetravalente, dicho constructo de cadena pesada se coexpresó con plásmidos codificantes de la cadena ligera respectiva del anticuerpo Ang-2 (SEC3) y una fusión de dominios VL-CH1 que reconocía VEGF-A (SEC2). El esquema del anticuerpo respectivo se proporciona en la fig. 7.

20 El anticuerpo biespecífico tetravalente se generó tal como se describe en la sección de métodos generales mediante técnicas clásicas de biología molecular, y se expresó transitoriamente en células HEK293F tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, se purificó a partir del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaños. El producto obtenido se caracterizó para la identidad mediante espectrometría de masas y propiedades analíticas, tales como la pureza, mediante SDS-PAGE, contenido de monómeros y estabilidad.

Expresión	Purificación	
Título [µg/ml]	rendimiento de producto final	homogeneidad (producto final)
8,5-9	1,8 a 4,1 mg/l	100 %

25 Estos datos demuestran que el anticuerpo biespecífico tetravalente puede producirse con un buen rendimiento y que es estable.

30 A continuación, se estudió la unión a Ang-2 y a VEGF-A, así como la unión simultánea, mediante los ensayos ELISA y Biacore indicados anteriormente, y se analizaron propiedades funcionales, tales como la inhibición de la fosforilación de Tie2 y la inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF, mostrando que el anticuerpo biespecífico tetravalente generado era capaz de unirse a Ang-2 y a VEGF-A y de bloquear sus actividades simultáneamente.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

40 <120> Proteínas biespecíficas de unión a antígeno

<130> 26145 WO

<150> EP09007857.7

45 <151> 2009-06-16

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

50 <210> 1

<211> 709

<212> PRT

<213> Artificial

55 <220>

<223> <Ang-2> de cadena pesada no modificada con dominios VH-CL de <VEGF> fusionados C-terminalmente de fragmento Fab modificado (intercambio CH1-CL)

60 <400> 1

ES 2 449 623 T3

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 449 623 T3

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 2 449 623 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 Ser Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 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 Glu
 465 470 475 480

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 500 505 510

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

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
 530 535 540

Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu

ES 2 449 623 T3

545 550 555 560

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

Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp
580 585 590

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro
595 600 605

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
610 615 620

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

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

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

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
690 695 700

Asn Arg Gly Glu Cys
705

5 <210> 2
<211> 212
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> dominios VL-CH1 de <VEGF> de fragmento Fab modificado (intercambio CH1-CL)

<400> 2

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

ES 2 449 623 T3

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

ES 2 449 623 T3

<220>

<223> <Ang-2> de cadena ligera no modificada

<400> 3

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 449 623 T3

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> 4

<211> 709

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> <Ang-2> de cadena pesada no modificada con dominios VH-CL de <VEGF> fusionados N-terminalmente de fragmento Fab modificado (intercambio CH1-CL)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 449 623 T3

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
245 250 255

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
260 265 270

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg
275 280 285

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn
290 295 300

Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
305 310 315 320

Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro
340 345 350

Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile

ES 2 449 623 T3

	355						360									365
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
	370					375					380					
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	
385					390					395					400	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
				405					410					415		
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
			420					425					430			
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
		435					440						445			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	
	450					455					460					
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	
465					470					475					480	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
				485					490					495		
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
			500					505					510			
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
	515						520						525			
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
530						535					540					
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
545					550					555					560	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
				565					570					575		

ES 2 449 623 T3

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
580 585 590

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
595 600 605

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
610 615 620

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
625 630 635 640

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
645 650 655

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
660 665 670

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
675 680 685

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
690 695 700

Leu Ser Pro Gly Lys
705

<210> 5
<211> 709
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> <VEGF> de cadena pesada modificada (intercambio CH1-CL) con dominios VH-CH1 de <Ang-2> fusionados C-terminalmente de fragmento Fab no modificado

<400> 5

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

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

ES 2 449 623 T3

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
 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

ES 2 449 623 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 449 623 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala
 580 585 590

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 595 600 605

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 610 615 620

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 625 630 635 640

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 645 650 655

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

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 675 680 685

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

690

695

700

Glu Pro Lys Ser Cys
705

REIVINDICACIONES

1. Proteína biespecífica de unión a antígeno, que comprende:

- 5 a) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de un anticuerpo, que se unen específicamente a un primer antígeno y que comprende dos fragmentos Fab,
- b) dos fragmentos Fab adicionales de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan, ambos mediante un péptido conector, con las cadenas pesadas en a),
 10 en donde, en los fragmentos Fab se llevan a cabo las modificaciones siguientes:
- i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/o
 15 los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,
- ii) en ambos fragmentos Fab en a), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente, y
 20 en ambos fragmentos Fab en b), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,
- iii) en ambos fragmentos Fab en a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente, y
 25 en ambos fragmentos Fab en b), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,
- iv) en ambos fragmentos Fab en a), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en ambos fragmentos Fab en b), los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente, o
 30
- v) en ambos fragmentos Fab en a), los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente, y en ambos fragmentos Fab en b), los dominios variables VL y VH se sustituyen mutuamente.
 35
 40

2. Proteína biespecífica de unión a antígeno según la reivindicación 1, en la que dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan mediante un péptido conector con los extremos C-terminales de las cadenas pesadas en a) o con los extremos N-terminales de las cadenas pesadas en a).

45 3. Proteína biespecífica de unión a antígeno según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque en los fragmentos Fab se llevan a cabo las modificaciones siguientes:

- i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/o
 50 los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente.

4. Proteína biespecífica de unión a antígeno según la reivindicación 3, caracterizada porque en los fragmentos Fab se llevan a cabo las modificaciones siguientes:

- i) en ambos fragmentos Fab en a) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/olos dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.
 55

5. Proteína biespecífica de unión a antígeno según la reivindicación 4, caracterizada porque en los fragmentos Fab se llevan a cabo las modificaciones siguientes:
 60

- i) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.
- 5 6. Proteína biespecífica de unión a antígeno según la reivindicación 3, caracterizada porque en los fragmentos Fab se llevan a cabo las modificaciones siguientes:
- 10 i) en ambos fragmentos Fab en b) los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y/o los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente.
7. Proteína biespecífica de unión a antígeno según la reivindicación 6, caracterizada porque en los fragmentos Fab se llevan a cabo las modificaciones siguientes:
- 15 i) en ambos fragmentos Fab en b) los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen mutuamente.
8. Método para la preparación de una proteína biespecífica de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas siguientes:
- 20 a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de una proteína biespecífica de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 7,
- 25 b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de proteína de unión a antígeno, y
- c) recuperar dicha molécula de proteína de unión a antígeno a partir de dicho cultivo.
9. Célula huésped que comprende los vectores según la reivindicación 8.
- 30 10. Composición farmacéutica que comprende la proteína biespecífica de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 7 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Proteína biespecífica de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 7, destinada al tratamiento del cáncer.
- 35 12. Utilización de la proteína biespecífica de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

Fig. 1

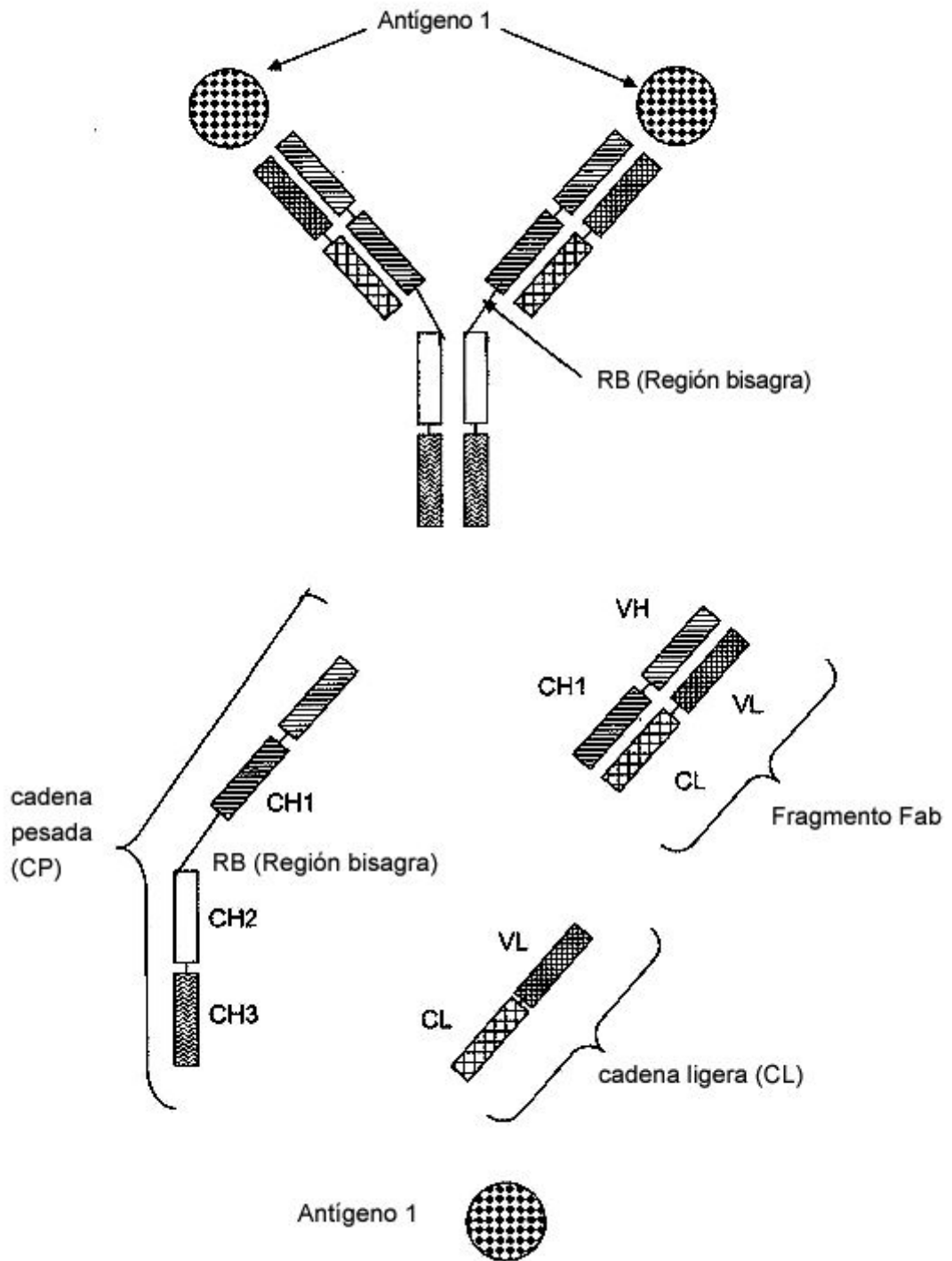


Fig. 2a

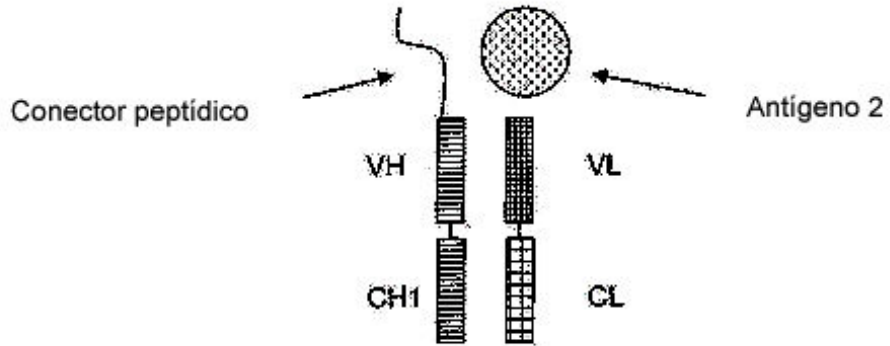


Fig. 2b

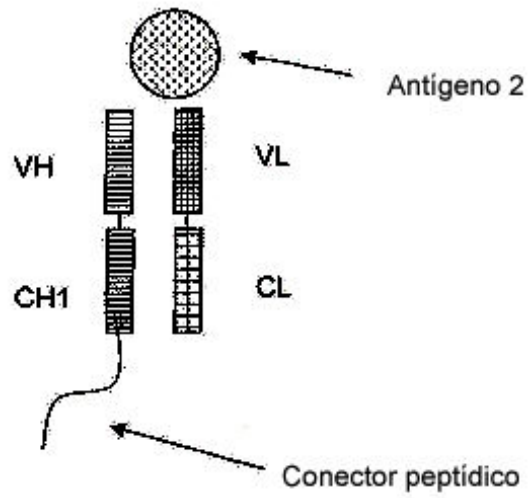


Fig. 3a

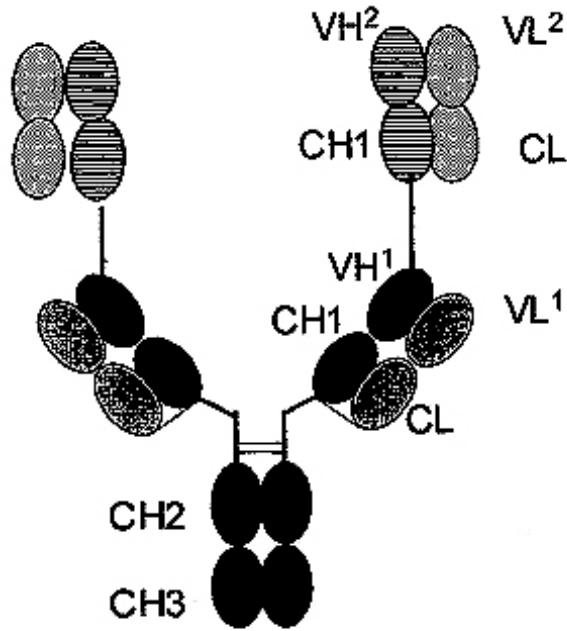


Fig. 3b

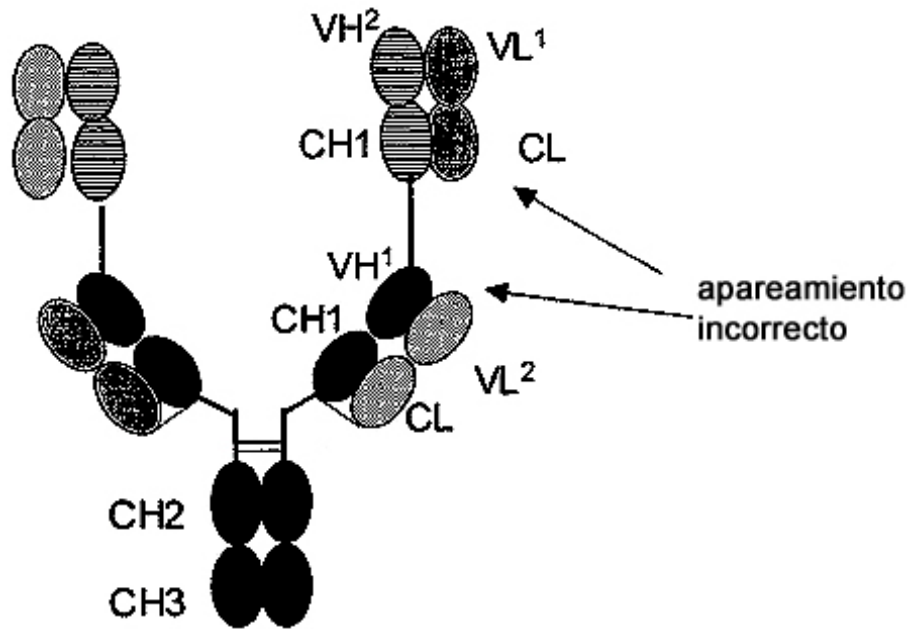


Fig. 3c

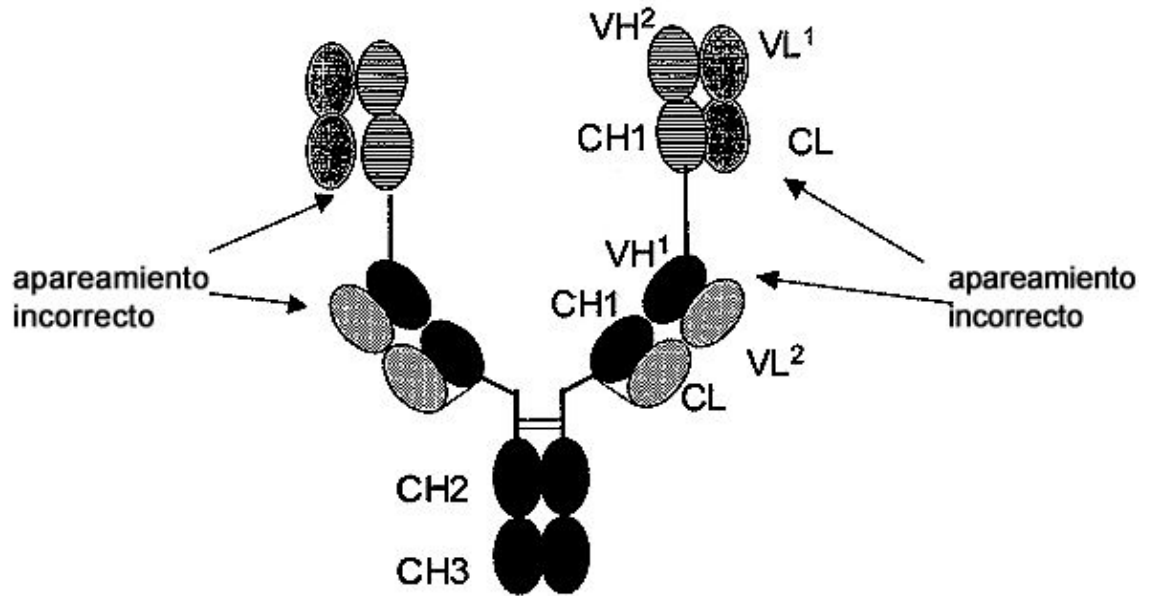


Fig. 4a

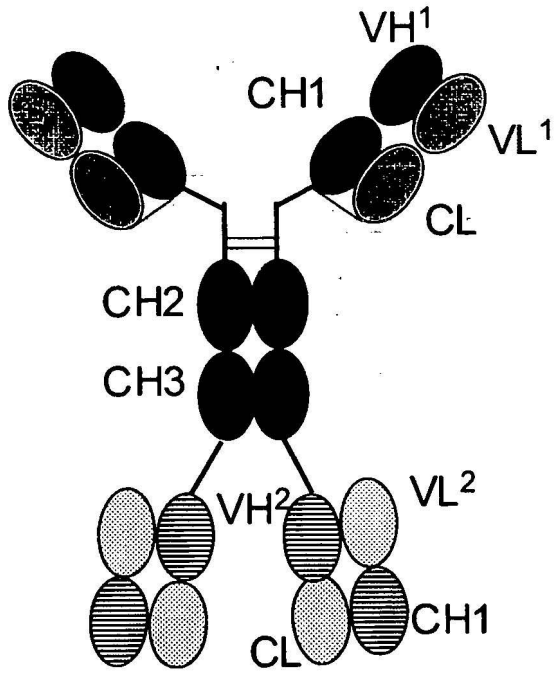


Fig. 4b

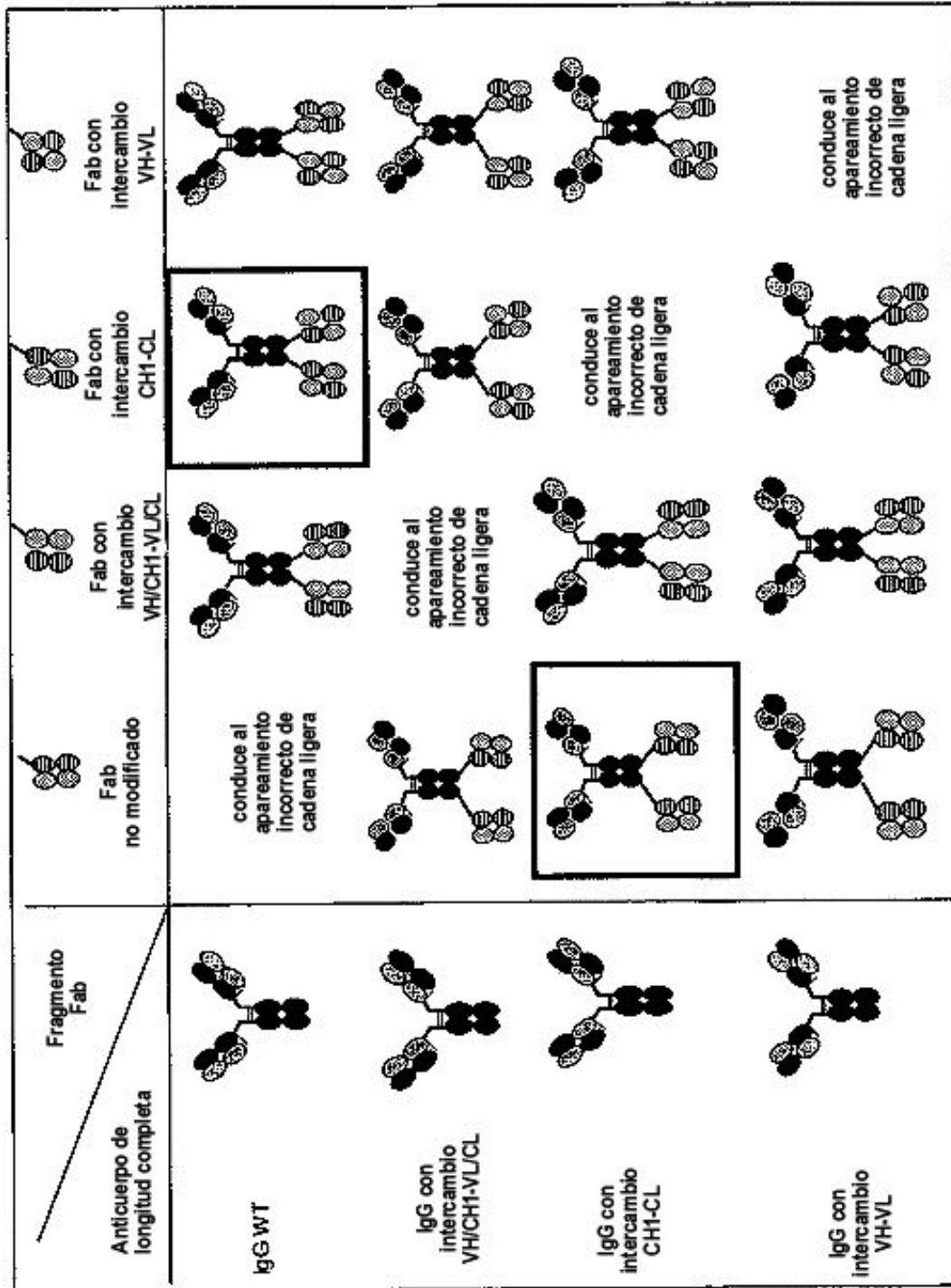


Fig. 4c

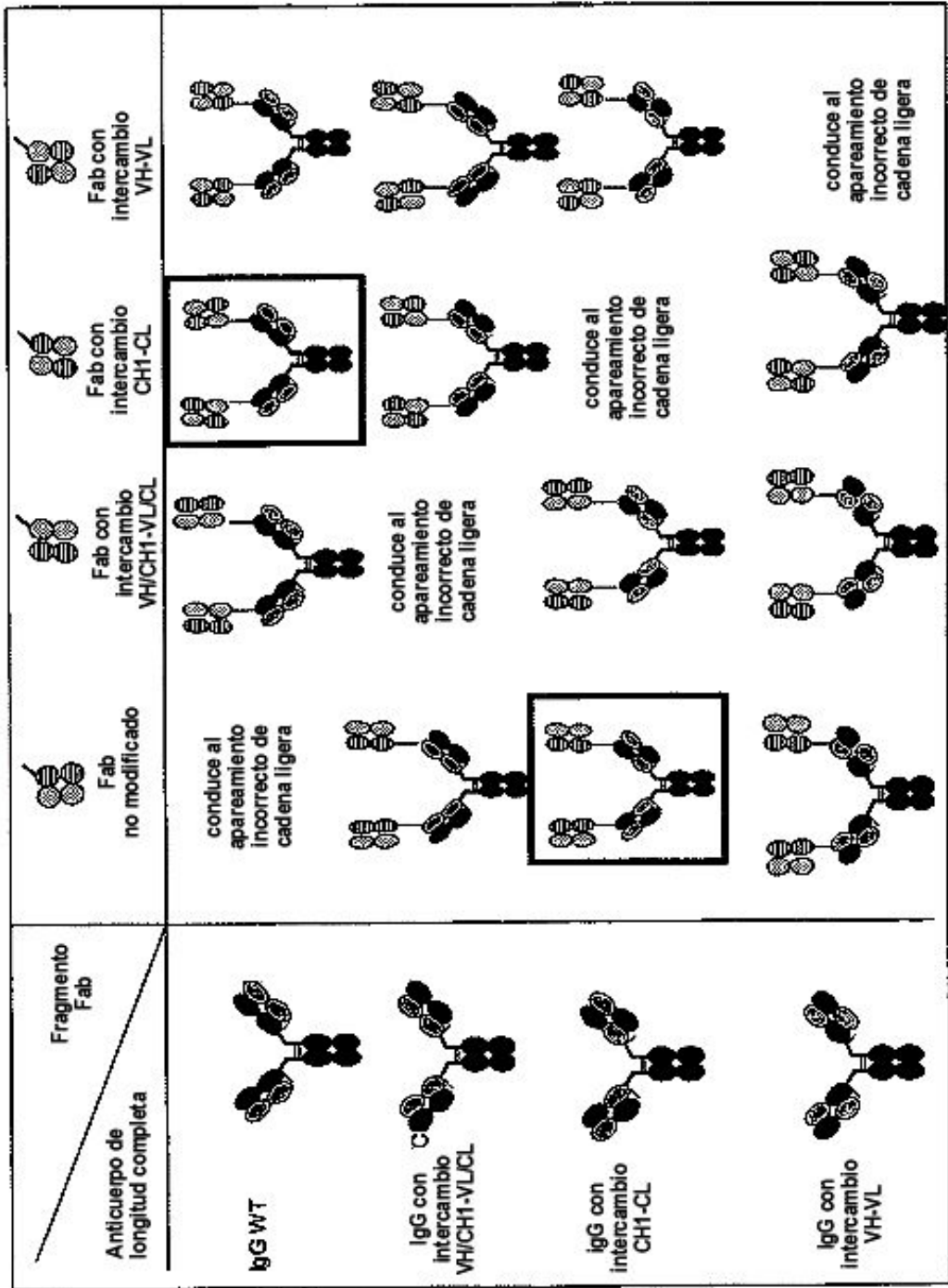


Fig. 5

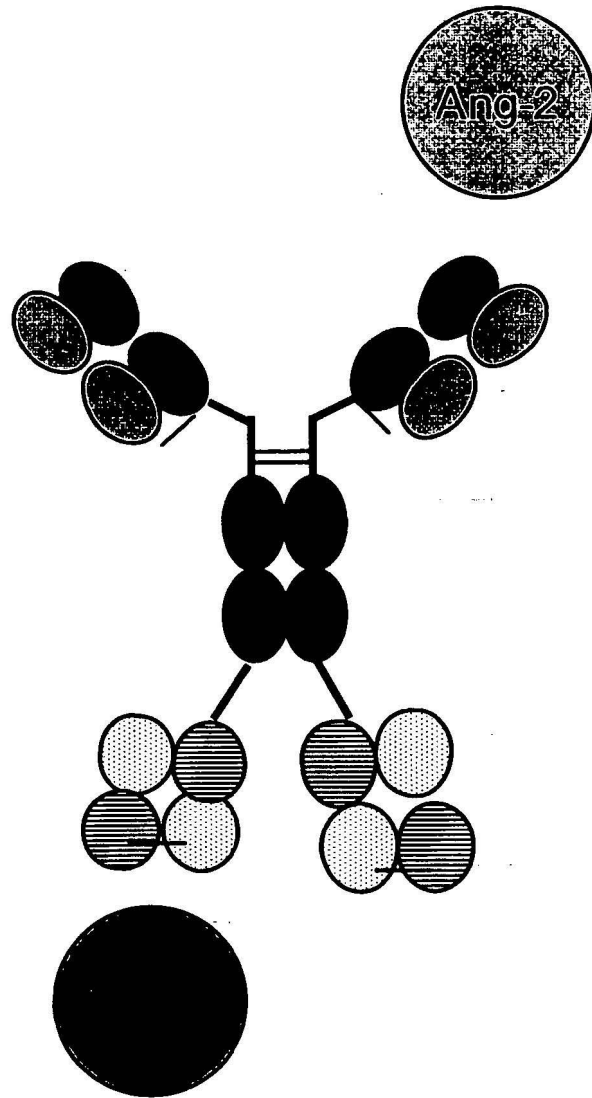


Fig. 6

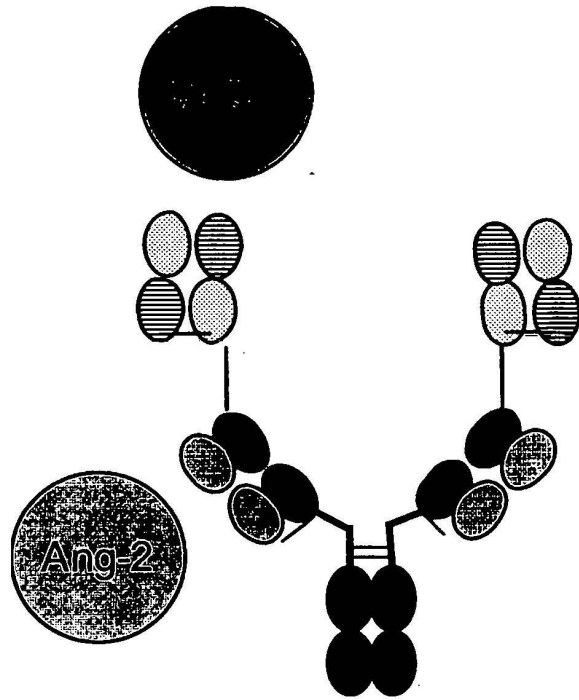


Fig. 7

