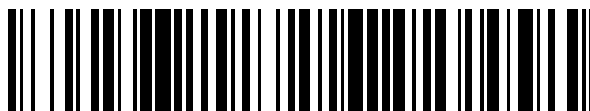


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 265**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2008 E 08864000 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2231709**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos bivalentes**

30 Prioridad:

21.12.2007 EP 07024867

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

16.06.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KLEIN, CHRISTIAN y
SCHAEFER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 468 265 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos bivalentes

5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos biespecíficos bivalentes, a su preparación y a su utilización.

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

20 También se han desarrollado otros formatos nuevos en los que la estructura del núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) ya no se encuentra retenida, tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, minicuerpos, varios formatos de una sola cadena (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 conector mismo o contra la unión entre la proteína y el conector. 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 resultar deseable conservar 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. De esta manera, idealmente, el objetivo debe ser el desarrollo de anticuerpos biespecíficos que presentan una estructura general muy similar a los anticuerpos naturales (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), con diferencias mínimas respecto a las secuencias humanas.

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

50 Un enfoque para evitar el problema de los productos secundarios mal apareados, que se conoce como "botón en ojal", pretende forzar el apareamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfaz de contacto. En una cadena se sustituyen aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas, para crear un "ojal". A la inversa, se introducen aminoácidos con cadenas laterales grandes en el otro dominio CH3, para crear un "botón". Mediante la coexpresión de estas dos cadenas pesadas (y 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 nº 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 botón-en-ojal 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 bivalentes 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.

El documento WO n° 2006/093794 se refiere a composiciones de unión a proteína heterodimérica. El documento WO n° 99/37791 describe derivados de anticuerpos con múltiples fines. Morrison *et al.*, J. Immunolog. 160:2802-2808, 1998, se refieren a la influencia del intercambio de dominios de la región variable sobre las propiedades funcionales de IgG.

Descripción resumida de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico bivalente, que comprende:

- a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
 - b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno,
- en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.

Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de un anticuerpo biespecífico bivalente según la invención, que comprende las etapas de:

- a) transformar una célula huésped con
 - vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
 - vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno,en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.
- 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:

- vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
 - vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno,
- en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.

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

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

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 un anticuerpo según la invención.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico bivalente, que comprende:

- 5 a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
 b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno,
 en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.

10

Por lo tanto, dicho anticuerpo biespecífico bivalente comprende:

- 15 a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
 b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno,

en el que los dominios variables VL y VH de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se sustituyen uno por otro,

20 y
 en el que los dominios constantes CL y CH1 de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se sustituyen uno por otro.

De esta manera, para dicho anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, se aplica lo siguiente:
 dentro de la cadena ligera:

el dominio VL de cadena ligera variable se sustituye por el dominio variable de cadena pesada VH de dicho anticuerpo, y el dominio constante de cadena ligera CL se sustituye por el dominio constante de cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo;

30

y dentro de la cadena pesada:

el dominio variable de cadena pesada VH se sustituye por el dominio variable de cadena ligera VL de dicho anticuerpo, y el dominio constante de cadena pesada CH1 se sustituye por el dominio constante de cadena ligera CL de dicho anticuerpo.

35

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a anticuerpos monoclonales completos. Dichos anticuerpos completos consisten de dos parejas de una "cadena ligera" (CL) y una "cadena pesada" (CP) (dichas parejas de cadena ligera (CL)/cadena pesada se abrevian en la presente memoria como CL/CP). Las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de dichos anticuerpos son polipéptidos que consisten de varios dominios. En un anticuerpo completo, cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como CPRV o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3 (clases de anticuerpo IgA, IgD e IgG) y opcionalmente el dominio constante de cadena pesada CH4 (clases de anticuerpo IgE e IgM). Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera VL y un dominio constante de cadena ligera CL. La estructura de un anticuerpo completo natural, el anticuerpo IgG, se muestra en, por ejemplo, Fig. 1. Los dominios variables VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas por regiones que se encuentran más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesto de tres CDR y cuatro FR, dispuestos de extremo amino-terminal a extremo carboxi-terminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (Janeway C.A. Jr. *et al.*, Immunobiology, 5a ed., Garland Publishing, 2001; y Woof J, Burton D Nat Rev Immunol 4:89-99, 2004). Las dos parejas de cadena pesada y cadena ligera (CP/CL) son capaces de unirse específicamente al mismo antígeno. De esta manera, dicho anticuerpo completo es un anticuerpo monoespecífico bivalente. Entre dichos "anticuerpos" se incluyen, por ejemplo, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos genéticamente manipulados (anticuerpos variantes o mutantes), con la condición de que se conserven sus propiedades características. Resultan especialmente preferentes los anticuerpos humanos o humanizados, especialmente en forma de anticuerpos humanos o humanizados recombinantes.

Existen cinco tipos de cadenas pesadas de anticuerpo de mamífero indicados por las letras griegas: α , δ , ϵ , γ y μ (Janeway C.A. Jr., *et al.*, Immunobiology, 5a ed., Garland Publishing, 2001). El tipo de cadena pesada presente define la clase del anticuerpo; estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente (Rhoades R.A., Pflanzner R.G., Human Physiology, 4a ed., Thomson Learning, 2002). Las diferentes

60

cadenas pesadas difieren en su tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que m y ϵ presentan aproximadamente 550 aminoácidos.

5 Cada cadena pesada presenta dos regiones: la región constante y la región variable. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, aunque difiere en anticuerpos de isotipo diferente. Las cadenas pesadas γ , α y δ presentan una región constante compuesta de tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3 (en una línea) y una región bisagra para una flexibilidad adicional (Woof J., Burton D., Nat. Rev. Immunol. 4:89-99, 2004); las cadenas pesadas m y ϵ presentan una región constante compuesta de cuatro dominios constantes: CH1, CH2, CH3 y CH4 (Janeway C.A. Jr. *et al.*, Immunobiology, 5a ed., Garland Publishing, 2001). La región variable de la cadena pesada difiere en los anticuerpos producidos por diferentes células B, aunque es la misma para todos los anticuerpos producidos por una célula B individual o clon de células B. La región variable de cada cadena pesada presenta una longitud aproximada de 110 aminoácidos y está compuesta de un único dominio de anticuerpo.

15 En mamíferos existen únicamente dos tipos de cadena ligera, denominados lambda (λ) y kappa (κ). Una cadena ligera presenta dos dominios sucesivos: un dominio constante, CL, y un dominio variable, VL. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Preferentemente, la cadena ligera es una cadena ligera kappa (κ) y el dominio constante, CL, preferentemente es C kappa (κ).

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

25 Los "anticuerpos" según la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, preferentemente IgG o IgE) o subclase (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, preferentemente IgG1), en la que ambos anticuerpos, a partir de los que se deriva el anticuerpo biespecífico bivalente según la invención, presentan una parte Fc de la misma subclase (por ejemplo IgG1, IgG4 y similar, preferentemente IgG1), preferentemente del mismo alotipo (por ejemplo caucásico).

30 Una "parte Fc de un anticuerpo" es una expresión bien conocida por el experto en la materia y definida basándose en el corte con papaína de los anticuerpos. Los anticuerpos según la invención contienen una parte Fc, preferentemente una parte Fc derivada de origen humano y preferentemente todas las demás partes de las regiones constantes humanas. La parte Fc de un anticuerpo participa directamente en la activación del complemento, la unión de C1q, la activación de C3 y la unión de receptores de Fc. Aunque la influencia de un anticuerpo sobre el sistema del complemento depende de determinadas condiciones, la unión a C1q está causada por sitios de unión definidos en la parte Fc. Dichos sitios de unión son conocidos de la técnica y han sido descritos, por ejemplo, por 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, ver posteriormente). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente muestran activación del complemento y la unión a C1q y la activación de C3, mientras que IgG4 no activa el sistema de complemento y no se une a C1q y no activa C3. Preferentemente la parte Fc es una parte Fc humana.

45 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir la región de unión, procedente de una fuente o especie, y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana resultan preferentes. Otras formas preferentes de "anticuerpos quiméricos" comprendidas dentro de la presente invención son aquellas 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 del receptor de Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". 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 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.

60 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. Son CDR

particularmente preferentes las que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para 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.* 222:581-597, 1991). Las técnicas de Cole S.P.C. *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, New York, 1986, páginas 77 a 96; y Boerner P. *et al.*, *J. Immunol.* 147:86-95, 1991). Tal como ya se ha indicado para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, la expresión "anticuerpo humano" tal como se utiliza en la presente memoria también comprende los anticuerpos que se han modificado en la región constante para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o la unión de FcR, por ejemplo mediante "intercambio de clase", es decir, el cambio o mutación de partes Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).

La expresión "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 ó 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 uno de la pareja de cadena ligera y cadena pesada que participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de cadenas ligera y pesada variables presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas, conectadas mediante tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de láminas β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de láminas 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 del anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de los anticuerpos según la invención y por lo tanto proporcionan un objetivo adicional de la invención.

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

Los "dominios constantes" de la cadena pesada y de la cadena ligera no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, aunque muestran diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de

aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o las inmunoglobulinas se dividen en las clases siguientes:

5 La expresión "anticuerpo biespecífico bivalente", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo tal como se ha indicado anteriormente en el que cada una de las dos parejas de cadena pesada y cadena ligera (CP/CL) se une específicamente a un antígeno diferente, es decir, la primera cadena pesada y la primera cadena ligera (originada de un anticuerpo contra un primer antígeno) se unen específicamente de manera conjunta a un primer antígeno y la segunda cadena pesada y la segunda cadena ligera (originadas de un anticuerpo contra un segundo antígeno) se unen específicamente de manera conjunta a un segundo antígeno (tal como se ilustra en la fig. 2); dichos anticuerpos biespecíficos bivalentes son capaces de unirse específicamente a dos antígenos diferentes simultáneamente, y a no más de dos antígenos; por el contrario, por una parte, un anticuerpo monoespecífico, capaz de unirse únicamente a un antígeno y, por otra parte, por ejemplo, un anticuerpo tetraespecífico tetravalente, que puede unirse a cuatro moléculas de antígeno simultáneamente.

15 Según la invención, la proporción de un anticuerpo biespecífico bivalente deseado en comparación con productos secundarios no deseados puede mejorarse mediante la sustitución de determinados dominios en únicamente una pareja de cadena pesada y cadena ligera (CP/CL). Aunque la primera de las dos parejas de CP/CL se origina de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno y no resulta esencialmente modificado, el segundo de las dos parejas de CP/CL se origina de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno y resulta alterado por la sustitución siguiente:

25 -cadena ligera: sustitución del dominio variable de cadena ligera, VL, por el dominio variable de cadena pesada, VH, de dicho anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, y el dominio constante de cadena ligera, CL, por el dominio constante de cadena pesada, CH1, de dicho anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, y

30 -cadena pesada: sustitución del dominio variable de cadena pesada, VH, por el dominio variable de cadena ligera, VL, de dicho anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, y el dominio constante de cadena pesada, CH1, por el dominio constante de cadena ligera, CL, de dicho anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno.

De esta manera, los anticuerpos biespecíficos bivalentes resultantes son anticuerpos artificiales que comprenden:

- 35 a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno; y
b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno,

40 en el que dicha cadena ligera (de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno) contiene un dominio variable, VH, en lugar de VL, y un dominio constante CH1 en lugar de CL, en el que dicha cadena pesada (de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno) contiene un dominio variable, VL, en lugar de VH, y un dominio constante CL en lugar de CH1.

45 En un aspecto adicional de la invención, dicha proporción mejorada de un anticuerpo biespecífico bivalente deseado en comparación con productos secundarios no deseados puede mejorarse adicionalmente mediante una de las dos alternativas siguientes:

A) Primera alternativa (ver la fig. 3):

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

60 Por lo tanto, en una realización preferente, los dominios CH3 de un anticuerpo biespecífico bivalente en el que cada uno de primer dominio CH3 y segundo dominio CH3 se reúnen en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo resulta alterado mediante la tecnología de "botón en ojal", incluyendo la estabilización adicional mediante la introducción de un puente disulfuro en los dominios CH3 (descrito en el documento nº WO 96/027011, Ridgway J.B. *et al.*, Protein Eng. 9:617-621, 1996; Merchant A.M. *et al.*, Nature Biotech. 16:677-681, 1998; y Atwell S. *et al.*, J. Mol. Biol. 270:26-35, 1997) para estimular la formación del anticuerpo biespecífico bivalente. De esta manera, en un aspecto de la invención, dicho anticuerpo

biespecífico bivalente se caracteriza porque cada uno de dominio CH3 de una cadena pesada y dominio CH3 de la otra cadena pesada se reúne en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo, en el que dicha interfaz resulta alterada para estimular la formación del anticuerpo biespecífico bivalente, en el que la alteración se caracteriza porque:

5 a) el dominio CH3 de una cadena pesada resulta alterado, de manera que dentro del interfaz original el dominio CH3 de una cadena pesada que se reúne con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico bivalente, un residuo aminoácido resulta sustituido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más grande, generando de esta manera una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que es posicionable en una cavidad dentro del interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada,

10 y
b) el dominio CH3 de otra cadena pesada resulta alterado, de manera que dentro del interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico bivalente, un residuo aminoácido resulta sustituido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de esta manera una cavidad dentro de la interfaz del segundo dominio CH3 dentro del cual es posicionable una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.

20 Preferentemente dicho residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más grande se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). Preferentemente dicho residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

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

En otra realización preferente de la invención, se alteran ambos dominios CH3 mediante la utilización de los residuos R409D, K370E (K409D) como residuos de botón y D399K y E357K para los residuos de ojal descritos en, por ejemplo, el documento nº EP 1870459A1,

30 o
B) Segunda alternativa (ver la figura 4):
mediante la sustitución de un dominio constante CH3 de cadena pesada por un dominio constante de cadena pesada CH1, mientras que el otro dominio constante de cadena pesada CH3 se sustituye por un dominio constante de cadena ligera, CL .

El dominio constante de cadena pesada CH1 por el que se sustituye el dominio de cadena pesada CH3 puede ser de cualquier clase de Ig (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o subclase de IgG (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

40 El dominio constante de cadena ligera CL por el que se sustituye el dominio de cadena pesada CH3 puede ser de tipo lambda (λ) o de tipo kappa (κ), preferentemente del tipo kappa (κ).

De esta manera, una realización preferente de la invención es un anticuerpo biespecífico bivalente, que comprende:

45 a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno; y
b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno,

50 en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y
en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,
y en el que opcionalmente

55 c) el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio de la otra cadena pesada se reúne cada uno en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo, en el que dicha interfaz resulta alterada para estimular la formación del anticuerpo biespecífico bivalente, en el que la alteración se caracteriza porque:

60 ca) el dominio CH3 de una cadena pesada resulta alterado, de manera que dentro de la interfaz original el dominio CH3 de una cadena pesada que se reúne con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico bivalente, un residuo aminoácido resulta sustituido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más grande, generando de esta manera una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que es posicionable en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada,

y

cb) el dominio CH3 de otra cadena pesada resulta alterado, de manera que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico bivalente, un residuo aminoácido resulta sustituido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de esta manera una cavidad dentro de la interfaz del segundo dominio CH3 dentro del cual es posicionable una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3, o d) un dominio constante CH3 de cadena pesada resulta sustituido por un dominio constante de cadena pesada CH1, mientras que el otro dominio constante de cadena pesada CH3 se sustituye por un dominio constante de cadena ligera, CL.

Las expresiones "antígeno" o "molécula de antígeno" tal como se utilizan en la presente memoria se utilizan intercambiamente y se refieren a todas las moléculas que pueden ser específicamente ligadas por un anticuerpo. El anticuerpo biespecífico bivalente es de unión específica a un primer antígeno y a un segundo antígeno diferente. El término "antígenos" tal como se utiliza en la presente memoria incluye, por ejemplo, proteínas, diferentes epítopos sobre proteínas (como antígenos diferentes en el sentido de la invención), y polisacáridos. Lo anterior incluye principalmente partes (capas, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fimbrias y toxinas) de bacterias, virus y otros microorganismos. Los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos únicamente en combinación con proteínas y polisacáridos. Entre los antígenos exógenos no microbianos (no autoantígenos) pueden incluirse polen, clara de huevo y proteínas de tejidos y órganos trasplantados o sobre la superficie de células sanguíneas transfundidas. Preferentemente, el antígeno se selecciona de entre el grupo que consiste de citoquinas, proteínas de superficie celular, enzimas y receptores de citoquinas, proteínas, enzimas y receptores de superficie celular.

Los antígenos tumorales son aquellos antígenos que son presentados por las moléculas del CMH-I ó CMH-II sobre la superficie de las células tumorales. Estos antígenos en ocasiones pueden ser presentados por células tumorales y nunca por células normales. En este caso se denominan antígenos específicos tumorales (AET) y típicamente resultan de una mutación específica tumoral. Son más comunes los antígenos que son presentados por las células tumorales y las células normales y se denominan antígenos asociados a tumor (AAT). Los linfocitos T citotóxicos que reconocen estos antígenos pueden ser capaces de destruir las células tumorales antes de que proliferen o metastaticen. Los antígenos tumorales también pueden encontrarse sobre la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado, en cuyo caso serán reconocidos por las células B.

En una realización preferente, por lo menos uno de los dos antígenos diferentes (primer y segundo antígenos), al que se une específicamente el anticuerpo biespecífico bivalente, es un antígeno tumoral.

En otra realización preferente, los dos antígenos diferentes (primer y segundo antígenos), a los que se une el anticuerpo biespecífico bivalente, son antígenos tumorales; en este caso el primer y segundo antígenos también pueden ser dos epítopos diferentes en la misma proteína específica tumoral.

En otra realización preferente, uno de los dos antígenos diferentes (primer y segundo antígenos), al que se une específicamente el anticuerpo biespecífico bivalente, es un antígeno tumoral y el otro es un antígeno de célula efectora, tal como, por ejemplo, un receptor de célula T, CD3, CD16 y similar.

En otra realización preferente, uno de los dos antígenos diferentes (primer y segundo antígenos), al que se une específicamente el anticuerpo biespecífico bivalente, es un antígeno tumoral y el otro es una sustancia anticáncer, tal como una toxina o un inhibidor de quinasa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "de unión específica" o "se une específicamente a" se refieren a un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. Preferentemente la afinidad de unión del anticuerpo de unión específica a este antígeno presenta un valor de K_D de 10^{-9} moles/l o inferior (por ejemplo de 10^{-10} moles/l), preferentemente presenta un valor de K_D de 10^{-10} moles/l o inferior (por ejemplo de 10^{-12} moles/l). Se determina la afinidad de unión con un ensayo de unión estándar, tal como la técnica de resonancia de plasmón superficial (Biacore®).

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

Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de un anticuerpo biespecífico bivalente según la invención, que comprende:

- 5 a) transformar una célula huésped con:
-vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno, y
-vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno,
- 10 en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro,
y,
en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro,
- 15 b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo, y
c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

En general existen dos vectores codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de dicho anticuerpo de unión específica a un primer antígeno, y además dos vectores codificantes de la cadena ligera y de la cadena pesada de dicho anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno. Uno de los dos vectores es codificante de la cadena ligera respectiva y el otro de los dos vectores es codificante de la cadena pesada respectiva. Sin embargo, en un método alternativo para la preparación de un anticuerpo biespecífico bivalente según la invención, únicamente puede utilizarse para transformarse la célula huésped un primer vector codificante de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de unión específica a un primer antígeno y únicamente un segundo vector codificante de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno.

25 La invención comprende un método para la preparación de los anticuerpos, que comprende cultivar las células huésped correspondientes bajo condiciones que permiten la síntesis de dichas moléculas de anticuerpo y recuperar dichos anticuerpos a partir de dicho cultivo, por ejemplo mediante la expresión de:

- 30 -una primera secuencia de ácidos nucleicos codificante de la cadena ligera de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno,
-una segunda secuencia de ácidos nucleicos codificante de la cadena pesada de dicho anticuerpo de unión específica a un primer antígeno,
35 -una tercera secuencia de ácidos nucleicos codificante de la cadena ligera de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, en el que el dominio variable de cadena ligera, VL, se sustituye por el dominio variable de cadena pesada, VH, y en el que el dominio constante de cadena ligera, CL, se sustituye por el dominio constante de cadena pesada, CH1, y
-una cuarta secuencia de ácidos nucleicos codificante de la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, en el que el dominio variable de cadena pesada, VH, se sustituye por el dominio variable de
40 cadena ligera, VL, y en el que el dominio constante de cadena pesada, CH1, se sustituye por el dominio constante de cadena ligera, CL.

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

- 45 -vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno, y
-vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno,
- 50 en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.

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

- 55 a) un vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos codificante de la cadena ligera y un vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos codificante de la cadena pesada, de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno, y
b) un vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos codificante de la cadena ligera y un vector que
60 comprende una molécula de ácidos nucleicos codificante de la cadena pesada, de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno,
- en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro,
y

en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.

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

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

10 Una realización adicional de la invención es un método para el tratamiento de un paciente que necesita terapia, caracterizada por la administración en el paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico bivalente según la invención.

15 La expresión "ácido nucleico o molécula de ácidos nucleicos", tal como se utilizan en la presente memoria, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es de ADN bicatenario.

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

25 El término "transformación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento de transferencia de un vector/ácido nucleico en una célula huésped. En el caso de que se utilicen células sin barreras de pared celular formidables a modo de células huésped, la transfección se lleva a cabo, por ejemplo, mediante el método de precipitación con fosfato de calcio tal como se describe en 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 las células, tales como la electroporación, la nucleofección, la inyección nuclear o la fusión de protoplastos. En el caso de que se utilicen células procarióticas o células que contienen construcciones de pared celular sustanciales, un método de transfección es, por ejemplo, el tratamiento con calcio utilizando cloruro de calcio tal como describen Cohen S.N. *et al.*, *PNAS* 69:2110-2114, 1972.

35 La producción recombinante de anticuerpos utilizando la transformación es bien conocida del estado de la técnica y se describe, 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. *et al.*, *Arzneimittelforschung* 48:870-880, 1998, así como en la patente US nº 6.331.415 y nº 4.816.567.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la "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 el polinucleótido se derive del ADN genómico, la expresión en una célula eucariótica puede incluir el procesamiento del ARNm.

45 Un "vector" es una molécula de ácidos nucleicos, en particular autorreplicante, que transfiere una molécula de ácidos nucleicos insertada al interior de una célula huésped y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo la integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN, y los vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se encuentran incluidos vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

50 Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, al ser introducido en una célula huésped apropiada, puede ser transcrito y traducido en un polipéptido. Un "sistema de expresión" habitualmente se refiere a una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para rendir un producto de expresión deseado.

60 Los anticuerpos biespecíficos bivalentes según la invención preferentemente se producen por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el posterior aislamiento del polipéptido anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos codificantes de cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de los mismos se insertan en vectores de

expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células tras la lisis). Los anticuerpos biespecíficos bivalentes pueden encontrarse presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se lleva a cabo con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, la cromatografía de columna y otras bien conocidas de la técnica. Ver Ausubel F. *et al.*, editor, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, New York, 1987.

La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes L.M. *et al.*, *Cytotechnology* 32:109-123, 2000, y 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 para un polipéptido en el caso de que se exprese como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte 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 sitúe de manera que facilite la traducción. Generalmente, "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN que e ligan son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, son contiguos y se encuentran en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o conector según la práctica convencional.

Los anticuerpos biespecíficos bivalentes se separan convenientemente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificantes de los anticuerpos monoclonales se aíslan y 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 secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico bivalente se preparan mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo o mediante síntesis de nucleótidos. Sin embargo, dichas modificaciones pueden llevarse a cabo sólo en un abanico muy limitado, por ejemplo tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de anticuerpo anteriormente indicadas, tales como el isotipo de IgG y la unión de antígeno, aunque pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

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

Listado de secuencias

55	SEC ID n° 1	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje
	SEC ID n° 2	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje
	SEC ID n° 3	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada* (CP*) del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio variable de cadena pesada, VH, se sustituye por el dominio de cadena ligera, VL, y el dominio de cadena pesada, CH1, se sustituye por el dominio de cadena ligera, CL.
60	SEC ID n° 4	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera* (CL*) del anticuerpo <IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena ligera, VL, se sustituye por

		el dominio de cadena pesada, VH, y el dominio de cadena ligera, CL, se sustituye por el dominio de cadena pesada, CH1.
	SEC ID nº 5	secuencia de aminoácidos de la etiqueta peptídica de unión de His-estreptavidina de ectodominio de IGF-1R (IGF-1R-His-SBP ECD)
5	SEC ID nº 6	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo <ANGPT2> de angiopoyetina-2 de tipo salvaje
	SEC ID nº 7	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo <ANGPT2> de angiopoyetina-2 de tipo salvaje
10	SEC ID nº 8	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada* (CP*) del anticuerpo <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena pesada VH es sustituido por el dominio de cadena ligera VL, y el dominio de cadena pesada CH1 es sustituido por el dominio de cadena ligera CL.
	SEC ID nº 9	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera* (CL*) del anticuerpo <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena ligera VL es sustituido por el dominio de cadena pesada VH, y el dominio de cadena ligera CL es sustituido por el dominio de cadena pesada CH1.
15	SEC ID nº 10	secuencia de aminoácidos del dominio CH3 (botón) con un intercambio T366W para la utilización en la tecnología de botón-en-ojal.
	SEC ID nº 11	secuencia de aminoácidos del dominio CH3 (ojal) con un intercambio T366S, L368A, Y407V para la utilización en tecnología de botón-en-ojal
20	SEC ID nº 12	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo <VEGF> de tipo salvaje
	SEC ID nº 13 y nº 14	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo <VEGF> de tipo salvaje con y sin líder
25	SEC ID nº 15	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada* (CP*) del anticuerpo <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena pesada VH es sustituido por el dominio de cadena ligera VL, y el dominio de cadena pesada CH1 es sustituido por el dominio de cadena ligera CL y el dominio CH3 porta una secuencia de aminoácidos con un intercambio T366S, L368A, Y407V (ojal) para la utilización en tecnología de botón-en-ojal
30	SEC ID nº 16	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo <VEGF> de tipo salvaje, en la que el dominio CH3 porta una secuencia de aminoácidos con un intercambio T366W (botón) para la utilización en la tecnología de botón-en-ojal
	SEC ID nº 17	secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (G)* (CP*) del anticuerpo <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena pesada VH es sustituido por el dominio de cadena ligera VL y el dominio de cadena pesada CH1 es sustituido por el dominio de cadena ligera CL con una inserción de glicina adicional.
35	SEC ID nº 18	secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (G)* (CL*) del anticuerpo <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena ligera VL es sustituido por el dominio de cadena pesada VH y el dominio de cadena ligera CL es sustituido por el dominio de cadena pesada CH1 con una inserción de glicina adicional.
40		

Descripción de las figuras

45	Figura 1	Figura esquemática de IgG, un anticuerpo completo natural específico para un antígeno con dos parejas de cadena pesada y cadena ligera que comprende dominios variables y constantes en un orden típico.
	Figura 2	Figura esquemática de IgG, un anticuerpo completo natural específico para un antígeno con dos parejas de cadena ligera que comprende dominios variables y constantes en un orden típico.
50	Figura	esquemática de un anticuerpo biespecífico bivalente, que comprende: a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno, y b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH son sustituidos uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 son sustituidos uno por otro.
55	Figura 3	Figura esquemática de un anticuerpo biespecífico bivalente, que comprende: a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno, y b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH son sustituidos uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 son sustituidos uno por otro, y en el que los dominios CH3 de ambas cadenas pesadas son alterados mediante la tecnología de botón-en-ojal.
60	Figura 4	Figura esquemática de un anticuerpo biespecífico bivalente, que comprende: a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno, y b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH son sustituidos uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 son sustituidos uno por otro, y en el que uno de los dominios constantes de cadena pesada CH3 de ambas cadenas pesadas es sustituido por un dominio constante de cadena pesada CH1 y el otro dominio constante de cadena pesada CH3 es sustituido por un dominio constante de cadena ligera CL.

Figura 5 Esquema de secuencia de proteína de la cadena pesada* (CP*) del anticuerpo <IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1.

Figura 6 Esquema de secuencia de proteína de la cadena ligera* (CL*) del anticuerpo <IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1.

5 Figura 7 Mapa plasmídico del vector de expresión de la cadena pesada* de <IGF-1R> CP*, pUC-CP*-IGF-1R

Figura 8 Mapa plasmídico del vector de expresión de la cadena ligera* de <IGF-1R> CL*, pUC-CL*-IGF-1R

Figura 9 Mapa plasmídico del vector de expresión 4700-Hyg-OriP

10 Figura 10 SDS-PAGE del anticuerpo mono específico bivalente <IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1 (IgG1*) con CP* y CL* aislado mediante inmunoprecipitación con proteína A-agarosa a partir de sobrenadantes de cultivo celular tras la transfección transitoria de células HEK293E.

Figura 11 Unión del anticuerpo mono específico <IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1 y anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje del ECD de IGF-1R en un ensayo de unión basado en ELISA.

Figura 12 Mapa plasmídico del vector de expresión de la cadena pesada* de <ANGPT2> CP*, pUC-CP*-ANGPT2

15 Figura 13 Mapa plasmídico del vector de expresión de la cadena ligera* de <ANGPT2> CL*, pUC-CL*-ANGPT2

20 Figura 14 SDS-PAGE reductora y no reductora de la purificación de la mezcla de A) anticuerpo mono específico <IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico <ANGPT2-IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1, y C) anticuerpos <ANGPT2> de tipo salvaje ("mezcla de intercambio VL-VH/CL-CH1 biespecífica") a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguido de cromatografía de exclusión por tamaño y concentración.

Figura 15 Principio de ensayo de FACS celular de ensayo de puente de IGF-1R-ANGPT2 en células expresantes de IGF-1R I24 con el fin de detectar la presencia de anticuerpo biespecífico funcional <ANGPT2-IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1.

25 Figura 16 Resultados para las muestras A a G de FACS celular de ensayo de puente de IGF-1R-ANGPT2 en células expresantes de IGF-1R I24 con el fin de detectar la presencia de anticuerpo biespecífico funcional <ANGPT2-IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1 en sobrenadantes de cultivo celular.

Muestra	IGF-1R celular	Anticuerpo	ANGPT2h	Anticuerpo de detección	Detección
A	I24	no tratado	-	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
B	I24	no tratado	2 mg/ml hANGPT2	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
C	I24	Mezcla de anticuerpos biespecíficos <ANGPT2-IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1	2 mg/ml hANGPT2	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
D	I24	Mezcla de tipo salvaje	2 mg/ml hANGPT2	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
E	I24	Anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje	2 mg/ml hANGPT2	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
F	I24	Anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje	2 mg/ml hANGPT2	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
G	I24	Anticuerpo mono específico <IGF-1 R> de intercambio VL-VH/CL-CH1	2 mg/ml hANGPT2	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE

30 Figura 17 Resultados para las muestras A a G de FACS celular de ensayo de puente de IGF-1R-ANGPT2 en células expresantes de IGF-1R I24 con el fin de detectar la presencia de anticuerpo biespecífico funcional <ANGPT2-IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1.

Muestra	IGF-1R celular	Anticuerpo	ANGPT2_h	Anticuerpo de detección	Detección
A	I24	no tratado	-	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
B	I24	no tratado	2 mg/ml ANGPT2_h	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
C	I24	Mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1	2 mg/ml ANGPT2_h	mIgG1-Biotina-Isotype control	SA-PE
D	I24	Mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1	2 mg/ml ANGPT2_h	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
E	I24	Mezcla de tipo salvaje	2 mg/ml ANGPT2_h	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE

F	I24	Anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje	2 mg/ml ANGPT2_h	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE
G	I24	Anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje	2 mg/ml ANGPT2_h	<Ang-2>mIgG1-Biotina	SA-PE

- Figura 18 Esquema del ELISA de unión de ECD de IGF-1R
 Figura 19 Esquema del ELISA de unión de ANGPT2
 Figura 20 Esquema del ELISA de unión de VEGF-ANGPT2
 5 Figura 21 Esquema del ensayo Biacore de puente de ANGPT2-VEGF
 Figura 22 SDS-PAGE de la purificación del anticuerpo <IGF-1R> de intercambio VL-VH/CL-CH1, el anticuerpo <IGF-1R> purificado de intercambio VL-CH/CL-CH1 corresponde a una agrupación concentrada mediante CET, B) cromatografía de exclusión por tamaño (CET) del intercambio <IGF-1R> purificado de intercambio VL-VH/CL-CH1.
 10 Figura 23 SDS-PAGE de la purificación del anticuerpo <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1, el anticuerpo <ANGPT2> purificado de intercambio VL-CH/CL-CH1 corresponde a una agrupación concentrada mediante CET, B) cromatografía de exclusión por tamaño (CET) del intercambio <ANGPT2> purificado de intercambio VL-VH/CL-CH1.
 Figura 24 Unión del anticuerpo monoespecífico <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 y anticuerpo
 15 <ANGPT2> de tipo salvaje a ANGPT2 en un ensayo de unión basado en ELISA.
 Figura 25 Análisis de Biacore de la unión del anticuerpo monoespecífico <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 y anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje a ANGPT2.
 Figura 26 SDS-PAGE reductora y no reductora de las fracciones de elución de la cromatografía de exclusión por tamaño del anticuerpo biespecífico <VEGF-ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1
 20 Figura 27 Asignación de bandas en SDS-PAGE mediante espectrometría de masas de fracciones nativas. Se indica la posición de las proteínas identificada mediante espectrometría de masas en la SDS-PAGE no reductora respectiva.
 Figura 28 Análisis de las fracciones de elución 5 y 9 de la cromatografía de exclusión por tamaño del intercambio biespecífico <VEGF-ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 en el ELISA de puente de VEGF-ANGPT2. Se incluye a modo de control positivo un anticuerpo biespecífico y tetravalente TvG6-Ang23 que reconoce ANGPT2 y VEGF simultáneamente.
 25 Figura 29 Análisis de la resonancia del plasmón superficial de las fracciones de elución 5 y 9 de la cromatografía de exclusión por tamaño del anticuerpo biespecífico <VEGF-ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 en el ensayo Biacore de puente de VEGF-ANGPT2. Se incluye a modo de control positivo un anticuerpo biespecífico y tetravalente TvG6-Ang23 que reconoce ANGPT2 y VEGF simultáneamente.
 30 Figura 30 Esquema del anticuerpo biespecífico <VEGF-ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 con botón-en-ojal para la heterodimerización.
 Figura 31 Análisis de Biacore de la unión del anticuerpo monoespecífico <ANGPT2> de intercambio VL-VH(G)/CL-CH1(G) y anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje a ANGPT2.
 35

Ejemplos

Materiales y métodos generales

- 40 Se proporciona información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas en: Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos están numeradas y se hace referencia a ellas según la numeración de 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 ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.
 45

Técnicas de ADN recombinante

- 50 Se utilizaron 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. Se utilizaron los reactivos biológicos moleculares siguiendo las instrucciones del fabricante.

Síntesis génica

- 55 Se prepararon segmentos génicos deseados a partir de oligonucleótidos contruidos mediante síntesis química. Los segmentos génicos de 600 a 1.800 pb de longitud, los cuales se encuentran flanqueados por sitios de corte de endonucleasa de restricción únicos, se ensamblaron mediante hibridación y ligación de oligonucleótidos que incluía la amplificación por PCR y posteriormente fueron clonados mediante los sitios de restricción indicados, por ejemplo KpnI/SacI o AscI/PacI en un vector de clonación pGA4 basado en pPCRScrip (Stratagene). Las secuencias de ADN

de los fragmentos génicos subclonados se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Los fragmentos de síntesis génica se ordenaron según las especificaciones proporcionadas en Geneart (Regensburg, Alemania).

Determinación de la secuencia del ADN

5 Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de doble cadena realizada por MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o por Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).

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

10 Se utilizó el paquete informático versión 10.2 del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) y Vector NT1 Advance suite versión 8.0 de Infomax para la creación de secuencias, mapeado, análisis, anotado e ilustración. Vectores de expresión

15 Para la expresión de los anticuerpos indicados, se aplicaron variantes de plásmidos de expresión para la expresión transitoria (por ejemplo en células HEK293 EBNA o HEK293-F) basados en una organización de ADNc con un promotor de intrón A del CMV o en una organización genómica con un promotor del CMV. Aparte del casete de expresión de anticuerpo los vectores contenían:

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

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

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

35 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
40 plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Técnicas de cultivo celular

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

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

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-EBNA

55 Se expresaron anticuerpos biespecíficos mediante cotransfección transitoria de los plásmidos de expresión respectivos (por ejemplo codificantes de la cadena pesada y de la cadena pesada modificada, así como las cadenas ligera y ligera modificada correspondientes) en células HEK293-EBNA en crecimiento adherente (línea celular renal embrionaria humana 293 que expresa el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr; American Type Culture Collection número de depósito ATCC nº CRL-10852, Lote nº 959 218) cultivadas en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado con FCS (suero de feto bovino, Gibco) al 10% con niveles ultrabajos
60 de IgG, L-glutamina 2 mM (Gibco) y geneticina 250 mg/ml (Gibco). Para la transfección, se utilizó reactivo de transfección FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) en una proporción de reactivo FuGENE™ (µl) a ADN (µg) de 4:1 (comprendida entre 3:1 y 6:1). Se expresaron proteínas a partir de los plásmidos respectivos utilizando una proporción molar de plásmidos codificantes de cadena (modificada y de tipo salvaje) ligera y pesada de 1:1

(equimolar) comprendida entre 1:2 y 2:1, respectivamente. Las células se alimentaron el día 3 con L-glutamina 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpo biespecífico 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

Se generaron anticuerpos biespecíficos mediante transfección transitoria de los plásmidos respectivos (por ejemplo codificantes de cadena pesada y de cadena pesada modificada, así como las cadenas ligera y ligera modificada correspondientes) utilizando el sistema HEK293-F (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se transfectaron células HEK293-F (Invitrogen) cultivadas en suspensión en un matraz oscilante o en un fermentador bajo agitación en medio de expresión FreeStyle 293 sin suero (Invitrogen) con una mezcla de los cuatro plásmidos de expresión y 293fectina o con 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 CO_2 . El día después de transfectar las células a una densidad celular de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con aproximadamente 42 ml de mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 mg de ADN total de plásmido (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) codificante de la cadena pesada o de la cadena pesada modificada, respectivamente, y la cadena ligera correspondiente en una proporción equimolar, y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml de 293fectina o 293fectina (2 $\mu\text{l}/\text{ml}$). 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 purificados y derivados, 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 y derivados en sobrenadantes de cultivo celular mediante inmunoprecipitación con perlas de agarosa-proteína A (Roche). Se lavaron 60 μl de perlas de agarosa-proteína A tres veces en TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 al 1%). Posteriormente, se aplicaron 1 a 15 ml de sobrenadante de cultivo celular a las perlas de agarosa-proteína A preequilibradas en TBS-NP40. Tras la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las perlas se lavaron en una columna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) una vez con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml de 2x de solución salina tamponada con fosfato (2xPBS, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de citrato sódico 100 mM, pH 5,0. El anticuerpo 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.

La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se midió cuantitativamente mediante cromatografía HPLC de afinidad. Brevemente, se aplicaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos y derivados que se unen a la proteína A, a una columna Poros A/20 de Applied Biosystems en KH_2PO_4 200 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 a partir de la absorbancia de UV y la integración de las áreas de los picos. Un anticuerpo IgG1 estándar purificado sirvió como estándar.

Alternativamente, se midió la concentración de anticuerpos y derivados en los sobrenadantes de cultivo celular mediante ELISA tipo sándwich de IgG. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina StreptaWell High Bind (Roche) con 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de molécula de captura biotinilada anti-IgG humana $\text{F}(\text{ab}')_2\text{-hFc}\gamma$ BI (Dianova) a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 hora a temperatura ambiente, o alternativamente durante la noche a 4°C y posteriormente se lavaron tres veces con 200 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de PBS, Tween al 0,05% (PBST, Sigma). Se añadieron 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de una serie de dilución en PBS (Sigma) de sobrenadantes de cultivo celular que contenían el anticuerpo respectivo, a los pocillos y se incubaron durante 1 a 2 horas en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de PBST y el anticuerpo unido se detectó con 100 μl de $\text{F}(\text{ab}')_2\text{-hFc}\gamma\text{-POD}$ (Dianova) a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ 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

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

15 SDS-PAGE

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

Cromatografía analítica de exclusión por tamaño

25 La cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación de la agregación y estado oligomérico de los anticuerpos se llevó a cabo mediante cromatografía HPLC. Brevemente, se aplicaron anticuerpos purificados con proteína A en una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,5 en un sistema HPLC 1100 de Agilent o en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2xPBS en un sistema de HPLC de Dionex. Las proteínas eluidas se cuantificaron a partir de la absorbancia de UV y la integración de las áreas de los picos. El estándar de filtración en gel 151-1901 de BioRad sirvió de estándar.

Espectrometría de masas

35 Se determinó la masa desglucosilada total de los anticuerpos entrecruzados y se confirmó mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (EM-IEP). Brevemente, se desglucosilaron 100 mg de anticuerpos purificados con 50 mU de N-glucosidasa F (PNGasaF, ProZyme) 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). La masa de las cadenas pesada y ligera respectivas se determinó mediante EM-IEP tras la desglucosilación y reducción. Brevemente, se incubaron 50 μg de anticuerpo en 115 μl , con 60 μl de TCEP 1 M y 50 μl de hidrocloreuro de guanidina 8 M posteriormente desalado. Se determinó la masa total y la masa de las cadenas pesada y ligera reducidas mediante EM-IEP en un sistema Q-Star Elite MS dotado de una fuente NanoMate.

45 ELISA de unión de ECD de IGF-1R

Las propiedades de unión de los anticuerpos generados se evaluaron en un ensayo ELISA con el dominio extracelular (ECD) de IGF-1R. Para ello, el dominio extracelular de IGF-1R (residuos 1 a 462) que comprendía la secuencia líder natural y los 12 dominios LI ricos en cisteína del ectodominio de la IGF-1R humana de la cadena alfa (según McKern *et al.* 1997, Ward *et al.* 2001) fusionados con una etiqueta péptido N-terminal ligante de His-estreptavidina (His-SBP) se clonó en un derivado de vector pcDNA3 y se expresó transitoriamente en células HEK293F. La secuencia de proteínas de ECD de IGF-1R-His-SBP se proporciona en SEC ID nº 5. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche) con 100 μl /pocillo de sobrenadante de cultivo celular que contenía proteína de fusión soluble IGF-1R-ECD-SBP durante la noche a 4°C y se lavaron tres veces con 200 μl /pocillo de PBS, Tween al 0,05% (PBST, Sigma). A continuación, se añadieron 100 μl /pocillo de una serie de dilución del anticuerpo respectivo y como referencia, se añadió a los pocillos anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje en PBS (Sigma) que incluía BSA al 1% (fracción V, Roche) y se incubaron durante 1 a 2 horas en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Para la serie de dilución, se aplicó a los pocillos la misma cantidad de anticuerpo purificado a modo de referencia o sobrenadantes de la transfección transitoria en HEK293E (HEK293F) normalizados mediante Sandwich-IgG-ELISA para la misma concentración de anticuerpo. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 μl /pocillo de PBST y el anticuerpo unido se detectó con 100 μl /pocillo de $\text{F}(\text{ab}')_2\text{-hFc}\gamma\text{-POD}$ (Dianova) a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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).

Biacore de ECD de IGF-1R

5 También se investigó la unión de los anticuerpos generados a ECD de IGF-1R humano mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para las mediciones de afinidad, se inmovilizaron anticuerpos JIR 109-005-098 de cabra anti-IgG humana en un chip CM5 mediante acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos contra ECD de IGF-1R etiquetado con Fc. Se midió la unión en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005%, pH 7,4), a 25°C. Se añadió ECD de IGF-1R (R&D Systems o purificado en el propio laboratorio) en solución a diversas concentraciones. Se midió la asociación mediante una inyección de ECD de IGF-1R de 80 segundos a 3 minutos; la disociación se midió mediante lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 a 10 minutos y se estimó un valor de K_D utilizando un modelo de unión Langmuir 1:1. Debido a la baja densidad de carga y nivel de captura de anticuerpos <IGF-1R>, se obtuvo una unión monovalente de ECD de IGF-1R. 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 sensogramas y para el cálculo de los datos de afinidad (figura 18).

ELISA de unión a ANGPT2

Las propiedades de unión de los anticuerpos generados se evaluaron en un ensayo ELISA con proteína ANGPT2 His de longitud completa (R&D Systems).

25 Para ello, se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno transparente mejoradas Falcon con 100 µl de ANGPT2 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 anticuerpos purificados <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 y a modo de referencia anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje en PBS (Sigma) a los pocillos y se incubaron durante 1 h 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') <hk>POD 0,1 mg/ml (Biozol, nº de cat. 206005) ó 100 µl/pocillo de F(ab') <hFcy>POD 0,1 mg/ml (ImmunoResearch) en BSA al 2% y Tween-20 al 0,1% como anticuerpo de detección durante 1 h en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. 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).

BIACORE de unión a ANGPT2

45 También se investigó la unión de los anticuerpos generados a ANGPT2 humano mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para las mediciones de afinidad se inmovilizaron anticuerpos policlonales <hIgG-Fcg> de cabra en un chip CM5 ó CM4 mediante acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos contra ANGPT2 humano. Se midió la unión en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005%, pH 7,4) con o sin Ca^{2+} 5 mM, a 25°C. Se añadió ANGPT2-His purificado (R&D Systems o purificado en el propio laboratorio) a diversas concentraciones en solución. Se midió el grado de asociación mediante una inyección de ANGPT2 de 3 minutos; la disociación se midió mediante lavado de la superficie del chip con tampón HBS durante 3 a 5 minutos y se estimó un valor de K_D utilizando un modelo de unión Langmuir 1:1. Debido a la heterogeneidad de la preparación de ANGPT2, 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 sensogramas y para el cálculo de los datos de afinidad (figura 19).

Inhibición de la unión de ANGPT2-h a Tie-2-ECD (ELISA)

60 Para someter a ensayo la capacidad de los anticuerpos de ANGPT2 de interferir con la unión de Tie2, se diseñó el ELISA siguiente. Se llevó a cabo el ensayo en placas de microtitulación de 384 pocillos (MicroCoat, DE, nº de cat. 464718) a TA. Tras cada etapa de incubación, se lavaron las placas 3 veces con PBST. Al inicio, las placas se recubrieron con 0,5 µg/ml de proteína Tie-2 (R&D Systems, Reino Unido, nº de cat. 313-TI) durante como mínimo 2 horas (h). A continuación, se bloquearon los pocillos con PBS suplementado con Tween-20 al 0,2% y BSA al 2%

(Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 1 h. Las diluciones de anticuerpos purificados en PBS se incubaron conjuntamente con 0,2 µg/ml de ANGPT2_hu (R&D Systems, Reino Unido, nº de cat. 623-AN) durante 1 h a TA. Tras el lavado se añadió una mezcla de 0,5 µg/ml de anti-ANGPT2 biotinilado, clon BAM0981 (R&D Systems, Reino Unido) y estreptavidina-HRP diluida 1:3.000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, nº de cat. 11089153001) durante 1 h. Después, se lavaron las placas 6 veces con PBST. Las placas se revelaron con reactivo ABTS recién preparado (Roche Diagnostics GmbH, DE, tampón nº 204 530 001, tabletas nº 11 1112 422 001) durante 30 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 405 nm.

ELISA de puente de ANGPT2-VEGF

Se evaluaron las propiedades de unión de los anticuerpos biespecíficos generados en un ensayo ELISA con proteína VEGF165-His de longitud completa inmovilizada (R&D Systems) y proteína ANGPT2-His humana (R&D Systems) para la detección de anticuerpo biespecífico unido simultáneamente. Únicamente un anticuerpo biespecífico era capaz de unirse simultáneamente a VEGF y a ANGPT2 y, de esta manera, formar un puente entre los dos antígenos, mientras que los anticuerpos IgG1 mono-específicos “estándares” no fueron capaces de unirse simultáneamente a VEGF y ANGPT2. 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 h 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 anticuerpo biespecífico purificado y anticuerpos de control en PBS (Sigma) a los pocillos y se incubaron durante 1 h 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 ANGPT2-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 ANGPT2 unido se detectó con 100 µl de anticuerpo de <ANGPT2>mIgG1-biotina 0,5 µg/ml (BAM0981, R&D Systems) durante 1 h 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 hora 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) (figura 20).

Ensayo Biacore para detectar la unión simultánea de anticuerpos biespecíficos a VEGF y a ANGPT2

Con el fin de corroborar adicionalmente los datos del ELISA de puente, se preparó un ensayo adicional utilizando la tecnología de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore T100 para confirmar la unión simultánea a VEGF y a ANGPT2. Los datos se analizaron utilizando el paquete informático de T100: se capturó ANGPT2 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). El tampón HBS-N sirvió como tampón de migración; 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 ANGPT2 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 de anticuerpo biespecífico a ANGPT2 y a VEGF mediante la incubación con VEGF_rh. Para ello, se unió el anticuerpo biespecífico a ANGPT2 a un caudal de 50 µl/minuto y a una concentración de 100-500 nM, se diluyó con tampón de migración + BSA 1 mg/ml y se detectó la unión simultánea mediante incubación con VEGF (VEGF_rh, R&D-Systems, nº de cat. 293-VE) en PBS + tampón de migración Tween-20 al 0,005% (v/v) + BSA 1 mg/ml a un caudal de 50 µl/minuto y una concentración de VEGF de 100-150 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 sensogramas utilizando el método habitual de doble referenciado (referencia de control: unión de anticuerpo biespecífico y VEGF_rh a la molécula de captura PentaHisAb). Se midieron los blancos para cada Ab con VEGF_rh concentración “0”. En la figura 21 se muestra un esquema del ensayo Biacore. Se corrigieron los sensogramas utilizando el doble referenciado habitual (referencia de control: unión de anticuerpo biespecífico Ab y VEGF_rh a la molécula de captura PentaHisAb). Se midieron los blancos para cada Ab con VEGF_rh concentración “0”.

Ejemplo 1:

Producción, expresión, purificación y caracterización de anticuerpo mono-específico bivalente <IGF-1R>, en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se

sustituyen uno por otro (abreviadamente en la presente memoria, anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1).

Ejemplo 1A

5 Construcción de los plásmidos de expresión para el anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1.

10 Las secuencias de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 del receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina, incluyendo las secuencias líder respectivas indicadas en el presente ejemplo, se derivaron de la cadena pesada del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje (SEC ID nº 1, plásmido 4843-pUC-CP-IGF-1R) y una cadena ligera (SEC ID nº 2, plásmido 4842-pUC-CL-IGF-1R) descritas en el documento nº WO 2005/005635 y los dominios constantes de cadenas pesada y ligera se derivaron de un anticuerpo humano (C-kappa e IgG1).

15 Los segmentos génicos codificantes de la secuencia líder del anticuerpo <IGF-1R>, dominio variable de cadena ligera (VL) y el dominio constante de cadena ligera kappa humana (CL) se unieron y se fusionaron con el extremo 5' de los dominios Fc de los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana. El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio de los dominios VH y CH1 por los dominios VL y CL se generó mediante síntesis génica y se indica como <IGF1R> CP* (Cadena Pesada*) (SEC ID nº 3) a continuación.

20 Los segmentos génicos de la secuencia líder del anticuerpo <IGF-1R>, dominio variable de cadena pesada (VH) y los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana (CH1) se unieron como cadena independiente. El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio de los dominios VL y CL por los dominios VH y CH1 se generó mediante síntesis génica y se indica como <IGF1R> CL* (Cadena Ligera*) (SEC ID nº 4) a continuación.

25 Las figuras 5 y 6 muestran una vista esquemática de la secuencia proteica de <IGF-1R> CP* cadena pesada* modificada y de <IGF-1R> CL* cadena ligera* modificada.

30 A continuación se describen brevemente los vectores de expresión respectivos:

Vector DW047-pUC-CP*-IGF-1R

El vector DW047-pUC-CP*-IGF-1R es un plásmido de expresión, por ejemplo para la expresión transitoria de <IGF-1R> cadena pesada* CP* (casete de expresión organizado de ADNc; con CMV-Intrón A en células HEK293 (EBNA) o para la expresión estable en células CHO.

35 Aparte del casete de expresión de <IGF-1R> CP*, dicho vector contiene:
-un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
- un gen β -lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

40 La unidad de transcripción del gen de <IGF-1R> CP* está compuesta de los elementos siguientes:

- un sitio de restricción Ascl único en el extremo 5',
- el intensificador y promotor tempranos inmediatos del citomegalovirus humano,
- seguido de la secuencia del intrón A,
- una región 5' no traducida de un gen de anticuerpo humano,
- 45 - una secuencia de señal de cadena ligera de inmunoglobulina,
- la cadena CP* madura de <IGF-1R> humana codificante de uan fusión del dominio variable de cadena ligera (VL) humana y el dominio constante de la cadena ligera kappa (CL) humana fusionado con el extremo 5' de los dominios Fc de los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana (bisagra-CH2-CH3).
- una región 3' no traducida con una secuencia de señal de poliadenilación, y
- 50 -el sitio de restricción único SgrAI en el extremo 3'.

El mapa plasmídico del vector de expresión de <IGF-1R> CP*, DW047-pUC-CP*-IGF-1R se muestra en la figura 7. La secuencia de aminoácidos de <IGF-1R> CP* (incluyendo la secuencia de señal) se proporciona en SEC ID nº 3. Vector DW048-pUC-CL*-IGF-1R

55 El vector DW048-pUC-CL*-IGF-1R es un plásmido de expresión, por ejemplo para la expresión transitoria de <IGF-1R> cadena ligera* CL* de intercambio VL-VH/CL-CH1 (casete de expresión organizado de ADNc; con CMV-Intrón A en células HEK293 (EBNA) o para la expresión estable en células CHO.

60 Aparte del casete de expresión de <IGF-1R> CL*, dicho vector contiene:

- un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
- un gen β -lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción del gen de <IGF-1R> CL* está compuesta de los elementos siguientes:

- el sitio de restricción único Sse8387I en el extremo 5',
- el intensificador y promotor tempranos inmediatos del citomegalovirus humano,
- seguido de la secuencia del intrón A,
- 5 -una región 5' no traducida de un gen de anticuerpo humano,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina,
- la cadena CL* madura del anticuerpo <IGF-1R> humano codificante de una fusión del dominio variable de cadena pesada (VH) humana y los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 (CH1) humana.
- una región 3' no traducida con una secuencia de señal de poliadenilación, y
- 10 -los sitios de restricción únicos Sall y FseI en el extremo 3'.

El mapa plasmídico del vector de expresión de <IGF-1R> CL*, DW048-pUC-CL*-IGF-1R se muestra en la figura 8. La secuencia de aminoácidos de <IGF-1R> CL* (incluyendo la secuencia de señal) se proporciona en SEC ID nº 4.

- 15 Los plásmidos DW047-pUC-CP*-IGF-1R y DW048-pUC-CL*-IGF-1R pueden utilizarse para cotransfecciones transitorias o estables en, por ejemplo, células HEK293, HEK293 EBNA o CHO (sistema de 2 vectores). Por motivos de comparación, el anticuerpo <IGF1R> de tipo salvaje se expresó transitoriamente a partir de los plásmidos 4842-pUC-CL-IGF-1R (SEC ID nº 2 y 4843-pUC-CP-IGF-1R (SEC ID nº 1) análogos a los indicados en el presente ejemplo.

- 20 Con el fin de conseguir niveles de expresión más altos en expresiones transitorias en células HEK293 EBNA, el casete de expresión de <IGF-1R> CP* puede subclonarse mediante los sitios Ascl y SgrAI y el casete de expresión de <IGF-1R> CL* puede subclonarse mediante los sitios Sse8387I y FseI en el vector de expresión 4700 pUC-Hyg_OriP, que contiene:
- 25 -un elemento OriP, y
-un gen de resistencia a la higromicina como marcador seleccionable.

- 30 Las unidades de transcripción de cadenas pesada y ligera pueden subclonarse en dos vectores independientes 4700-pUC-Hyg-OriP para la cotransfección (sistemas de 2 vectores) o pueden clonarse en un vector 4700-pUC-Hyg-OriP común (sistema de 1 vector) para las posteriores transfecciones transitorias o estables con los vectores resultantes. La figura 9 muestra un mapa plasmídico del vector básico 4700-pUC-OriP.

Ejemplo 1B

- 35 Construcción de los plásmidos de expresión para el anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1

- 40 Los genes de fusión de <IGF-1R> (genes de fusión de CP* y CL*) que comprendían las secuencias de Fab intercambiadas del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje se ensamblaron mediante métodos y técnicas recombinantes conocidas mediante conexión de los segmentos de ácidos nucleicos correspondientes.

- 45 Cada una de las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de CP* y CL* de IGF-1R se sintetizaron mediante síntesis química y posteriormente se clonaron en un vector de clonación pGA4 basado en pCRScript (Stratagene) en Genearth (Regensburg, Alemania). El casete de expresión codificante de CP* de IGF-1R se ligó en el plásmido de *E. coli* respectivo mediante los sitios de restricción PvuII y BmgBI, resultando en el vector final DW047-pUC-CP*-IGF-1R; el casete de expresión codificante de la CL* de IGF-1R respectiva se ligó en el plásmido de *E. coli* respectivo mediante los sitios de restricción PvuII y Sall, resultando en el vector final DW048-pUC-CL*-IGF-1R. Las secuencias subclonadas de ácidos nucleicos se verificaron mediante secuenciación del ADN. Para las transfecciones estables y transitorias, se prepararon cantidades mayores de los plásmidos mediante preparación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).
- 50

Ejemplo 1C

- 55 Expresión transitoria de anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 en células HEK293 EBNA

- 60 Se expresó anticuerpo recombinante <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 mediante cotransfección transitoria de los plásmidos DW047-pUC-CP*-IGF-1R y DW048-pUC-CL*-IGF-1R 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 plásmidos de cadenas ligera y pesada codificantes de CP* y CL* de <IGF1R> (plásmidos DW047-pUC-CP*-IGF-1R and DW048-pUC-CL*-IGF-1R) a partir de dos plásmidos diferentes utilizando una proporción molar de plásmidos codificantes de cadena ligera a codificantes de cadena pesada de 1:1 (equimolar) comprendida entre 1:2 y 2:1, respectivamente. Las células se alimentaron el día 3 con L-glutamina 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 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.

Ejemplo 1D

Inmunoprecipitación de anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1

Se aisló el anticuerpo monoespecífico bivalente <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 a partir de sobrenadantes de cultivo celular (Ejemplo 1C) 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 a las perlas de agarosa-proteína A preequilibradas en TBS-NP40. Tras la incubación durante 1 h 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 20 µl a un SDS-PAGE Bis-Tris NuPAGE[®] al 4-12% (Invitrogen) (con tampón MOPS para SDS-PAGE no reducido y tampón MES con aditivo antioxidante de tampón de migración NuPAGE[®] (Invitrogen) para un SDS-PAGE reducido) y se tiñó con azul de Coomassie. La figura 10 muestra el SDS-PAGE de un experimento de inmunoprecipitación típico. El anticuerpo monoespecífico bivalente <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 se comporta como un anticuerpo IgG1 típico, con una banda de aproximadamente 25 kDa correspondiente a la cadena ligera CL* y una banda de 50 kDa correspondiente a la cadena pesada CP* respectiva. En el estado no reducido puede observarse una banda en aproximadamente 150 kDa del anticuerpo completo.

Ejemplo 1E

Purificación de anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y confirmación de la identidad mediante espectrometría de masas

El anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 expresado y secretado se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados, mediante cromatografía de afinidad de proteína A siguiendo métodos estándares conocidos. Brevemente, los sobrenadantes de cultivo celular que contenían el anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 de transfecciones transitorias se clarificaron mediante centrifugación (10.000 g durante 10 minutos) y filtración a través de un filtro de 0,45 µm y se aplicaron a una columna de proteína A HiTrap MabSelect Xtra (GE Healthcare) equilibrada con tampón PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no ligadas se lavaron con tampón de equilibración PBS, seguido de tampón de citrato sódico 0,1 M, pH 5,5, y se lavaron con PBS. La elución del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 se consiguió con citrato sódico 100 mM, pH 2,8, seguido de la neutralización inmediata de la muestra con 300 ml de Tris 2 M, pH 9,0, por cada fracción de 2 ml. Se separó la proteína agregada de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de grado prep. HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0, y las fracciones de anticuerpo monoméricas se concentraron posteriormente utilizando un concentrador centrífugo Amicon Ultra-15 de Millipore. El anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 se congeló y se almacenó a -20°C ó -80°C. Se analizó la integridad del intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 mediante SDS-PAGE en presencia y en ausencia de un agente reductor y posterior tinción con azul de Coomassie brillante tal como se describe en el Ejemplo 1D. El anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 purificado se comporta como un anticuerpo IgG1 típico, con una banda de aproximadamente 25 kDa correspondiente a la cadena ligera CL* y una banda de 50 kDa correspondiente a la cadena pesada CP* respectiva. En el estado no reducido puede observarse una banda en aproximadamente 150 kDa del anticuerpo completo. La agregación y el estado oligomérico del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 se analizaron mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño y demostraron que el anticuerpo Fab entrecruzado purificado se encontraba en un estado monomérico. Se proporcionaron muestras caracterizadas para el análisis proteico y caracterización funcional posteriores. La espectrometría de masas IEP confirmó la masa molecular teórica (calculada sin el residuo de lisina C-terminal de la cadena pesada y con un residuo piroglutamato C-terminal de la cadena ligera) del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 completamente desglusilado como especie principal (figura 22).

Ejemplo 1F

5 Análisis de las propiedades de unión a IGF-1R del anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 en un ELISA de unión de ECD de IGF-1R y mediante Biacore

10 Se evaluaron las propiedades de unión del anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 en un ensayo ELISA con el dominio extracelular (ECD) de IGF-1R tal como se ha indicado anteriormente. La figura 11 muestra los resultados normalizados de una titulación del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje de sobrenadantes de transfección transitoria en HEK293E mediante ELISA de IgG de tipo sándwich. Puede observarse claramente que el anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 es funcional y muestra características de unión comparables a las del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje y, de esta manera, aparentemente es completamente funcional. Las diferencias menores observadas se encuentran dentro del error del método y podrían resultar, por ejemplo, de variaciones menores de la concentración de proteína.

15 Estos resultados fueron corroborados por los datos del Biacore con los anticuerpos purificados respectivos, que demostraron que el anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 presentaba una afinidad y cinética de unión comparables para ECD de IGF-1R a las del anticuerpo de tipo salvaje original dentro del error del método. Se proporcionan los datos cinéticos en la tabla a continuación:

	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	$K(D)$ [M]
anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje	$3,18 \times 10^6$	$5,52110 \times 10^{-3}$	$1,74 \times 10^{-9}$
Anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1	$2,65 \times 10^6$	$6,258 \times 10^{-3}$	$2,36 \times 10^{-9}$

Ejemplo 1G

25 Análisis de las propiedades de unión a IGF-1R del anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 mediante FACS con células I24 sobreexpresantes de IGF-1R.

30 Con el fin de confirmar la actividad de unión de <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, se estudió mediante FACS anticuerpo de intercambio de unión a IGF-1R sobreexpresado sobre la superficie de las células I24 (células NIH3T3 que expresan IGF-1R humana recombinante, Roche). Brevemente, se incubaron 5×10^5 células I24 por cada tubo de FACS con una dilución de anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje como referencia, y se incubaron sobre hielo durante 1 h. Se lavó el anticuerpo no unido con 4 ml de PBS helado (Gibco) + FCS al 2% (Gibco). A continuación, las células se centrifugaron (5 min a 400 g) y el anticuerpo ligado se detectó con conjugado $F(ab')_2$ <Fc γ _h>PE (Dianova) sobre hielo durante 1 h protegido de la luz. El anticuerpo de detección no ligado se lavó con 4 ml de PBS helado + FCS al 2%. A continuación, las células se centrifugaron (5 min a 400 g), se resuspendieron en 300 a 500 ml de PBS y el anticuerpo de detección ligado se cuantificó en un FACSCalibur o FACS Canto (BD, canal FL2, 10.000 células por adquisición). Durante el experimento se incluyeron los controles de isotipo respectivos para excluir cualesquiera sucesos de unión no específica. La unión del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y el anticuerpo de referencia <IGF-1R> de tipo salvaje a IGF-1R sobre células I24 se compara mediante un desplazamiento de la intensidad de fluorescencia media dependiente de la concentración. Algunos experimentos adicionales demostraron que el anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 también conservaban su actividad de inducción de la internalización de IGF-1R sobre células MCF7 y sólo presentaban una actividad ADCC reducida sobre las células DU145 en caso de incubarse con PBMC humanas comparable a la del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje.

45 Conjuntamente los experimentos en el Ejemplo 1 demostraron que mediante la utilización del intercambio de dominios pueden generarse anticuerpos totalmente funcionales con propiedades comparables a las de los anticuerpos de tipo salvaje. Todas las propiedades funcionales se conservaron en los ensayos bioquímicos y celulares. Estos anticuerpos con intercambio de dominios forman la base para la generación de anticuerpos biespecíficos, tal como se indica posteriormente.

Ejemplo 2:

55 Producción, expresión, purificación y caracterización de anticuerpo mono específico bivalente <ANGPT2>, en el que los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro (abreviadamente en la presente memoria, anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1).

Ejemplo 2A

60

Construcción de los plásmidos de expresión para el anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio variante <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1

5 Las secuencias de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio de angiopoyetina <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, incluyendo las secuencias líder respectivas indicadas en el presente ejemplo, se derivaron de la cadena pesada del anticuerpo <ANGPT2> (SEC ID nº 6), y una cadena ligera (SEC ID nº 7) descrita en el documento nº WO 2006/045049 y los dominios constantes de cadenas pesada y ligera se derivaron de un anticuerpo humano (C-kappa e IgG1).

10 Los segmentos génicos codificantes de la secuencia líder del anticuerpo <ANGPT2>, dominio variable de cadena ligera (VL) y el dominio constante de cadena ligera kappa humana (CL) se unieron y se fusionaron con el extremo 5' de los dominios Fc de los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana (bisagra-CH2-CH3). El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio de los dominios VH y CH1 por los dominios VL y CL se generó mediante síntesis génica y se indica como <ANGPT2> CP* (Cadena Pesada*) (SEC ID nº 8) a
15 continuación.

Los segmentos génicos de la secuencia líder del anticuerpo <ANGPT2>, dominio variable de cadena pesada (VH) y los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana (CH1) se unieron como cadena independiente. El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio de los dominios VL y CL por los dominios VH y CH1 se generó mediante síntesis génica y se indica como <ANGPT2> CL* (Cadena Ligera*) (SEC ID nº 9) a
20 continuación.

Los vectores de expresión respectivos son análogos a los indicados en el Ejemplo 1A. El mapa plasmídico del vector de expresión de <ANGPT2> CP*, pUC-CP*-ANGPT2, se muestra en la figura 12. La secuencia de aminoácidos de <ANGPT2> CP* (incluyendo la secuencia de señal) se proporciona en SEC ID nº 8.
25

El mapa plasmídico del vector de expresión de <ANGPT2> CL*, pUC-CL*-ANGPT2, se muestra en la figura 13. La secuencia de aminoácidos de <ANGPT2> CL* (incluyendo la secuencia de señal) se proporciona en SEC ID nº 9. Los plásmidos pUC-CP*-ANGPT2 y pUC-CL*-ANGPT2 pueden utilizarse para cotransfecciones transitorias o estables en, por ejemplo, células HEK293-F, HEK293 EBNA o CHO (sistema de 2 vectores).
30

Con el fin de conseguir niveles de expresión más altos en expresiones transitorias en células HEK293 EBNA, el casete de expresión de <ANGPT2> CP* puede subclonarse mediante los sitios Ascl y SgrAI y el casete de expresión de <ANGPT2> CL* puede subclonarse mediante los sitios Sse8387I y Fsel en el vector de expresión 4700 pUC-Hyg_OriP, tal como se indica en el Ejemplo 1A: Las unidades de transcripción de cadenas pesada y ligera pueden subclonarse en dos vectores independientes 4700-pUC-Hyg-OriP para la cotransfección (sistemas de 2 vectores) o pueden clonarse en un vector 4700-pUC-Hyg-OriP común (sistema de 1 vector) para las posteriores transfecciones transitorias o estables con los vectores resultantes mediante los sitios Fsel, SgrAI, Sse8387I y Ascl.
35

40 El anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje se clonó en los plásmidos SB04-pUC-CP-ANGPT2 (SEC ID nº 6) y SB06-pUC-CL-ANGPT2 (SEC ID nº 7) que son análogos a los vectores descritos en el presente ejemplo y en el ejemplo anterior, 1A. Las unidades de transcripción para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje se subclonaron a partir de los plásmidos vectores básicos SB04-pUC-CP-ANGPT2 y SB06-pUC-CL-ANGPT2 mediante los sitios Fsel, SgrAI, Sse8387I en los plásmidos SB07-pUC-Hyg-OriP-CP-ANGPT2 y SB09-pUC-Hyg-OriP-CL-ANGPT2 con el fin de conseguir niveles de expresión transitoria más altos en las células HEK293E. Por motivos comparativos y para los experimentos de coexpresión (ver el Ejemplo 3), el anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje se (co-) expresó transitoriamente a partir de los plásmidos SB07-pUC-Hyg-OriP-CP-ANGPT2 y SB09-pUC-Hyg-OriP-CL-ANGPT2 ó a partir de los plásmidos SB04-pUC-CP-ANGPT2 y SB06-pUC-CL-ANGPT2.
45

50 Ejemplo 2B

Construcción de los plásmidos de expresión para el anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1

55 Los genes de fusión del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 (genes de fusión de CP* y CL*) que comprendían las secuencias de Fab intercambiadas del anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje se ensamblaron mediante métodos y técnicas recombinantes conocidos mediante conexión de los segmentos de ácidos nucleicos correspondientes.

60 Cada una de las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de CP* y CL* del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 se sintetizaron mediante síntesis química y posteriormente se clonaron en un vector de clonación pGA4 basado en pPCRScrip (Stratagene) en Genearth (Regensburg, Alemania). El casete de expresión codificante de CP* del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 se ligó en el plásmido de *E. coli*

respectivo mediante los sitios de restricción PstI y EcoNI, resultando en el vector final pUC-CP*-<ANGPT2>; el casete de expresión codificante de la CL* de <ANGPT2> respectiva se ligó en el plásmido de *E. coli* respectivo mediante los sitios de restricción PvuII y FseI, resultando en el vector final pUC-CL*-<ANGPT2>. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonadas se verificaron mediante secuenciación del ADN. Para las transfecciones transitorias y estables, se prepararon cantidades mayores de los plásmidos mediante preparación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Ejemplo 2C

10 Expresión transitoria de anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 en células HEK293 EBNA

15 Se expresó anticuerpo recombinante de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 mediante cotransfección transitoria de los plásmidos pUC-CP*-<ANGPT2> y pUC-CL*-<ANGPT2> en células HEK293-EBNA de 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 plásmidos de cadenas ligera y pesada codificantes de CP* y CL* de <ANGPT2> (plásmidos pUC-CP*-<ANGPT2> and pUC-CL*-<ANGPT2>) a partir de dos plásmidos diferentes utilizando una proporción molar de plásmidos codificantes de cadena ligera a codificantes de cadena pesada de 1:1 (equimolar) comprendida entre 1:2 y 2:1, respectivamente. Las células se alimentaron el día 3 con L-glutamina 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 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.

Ejemplo 2D

30 Purificación de anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 y confirmación de la identidad mediante espectrometría de masas

35 El anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 expresado y secretado se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados, mediante cromatografía de afinidad de proteína A siguiendo métodos estándares conocidos. Brevemente, los sobrenadantes de cultivo celular que contenían el anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 de transfecciones transitorias se clarificaron mediante centrifugación (10.000 g durante 10 minutos) y filtración a través de un filtro de 0,45 µm y se aplicaron a una columna de proteína A HiTrap MabSelect Xtra (GE Healthcare) equilibrada con tampón PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no ligadas se lavaron con tampón de equilibración PBS, seguido de tampón de citrato sódico 0,1 M, pH 5,5, y se lavaron con PBS. La elución del anticuerpo de intercambio VL-VH/CL-CH1 se consiguió con citrato sódico 100 mM, pH 2,8, seguido de la neutralización inmediata de la muestra con 300 ml de Tris 2 M, pH 9,0, por cada fracción de 2 ml. Se separó la proteína agregada de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de grado prep. HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0, y las fracciones de anticuerpo monoméricas se concentraron posteriormente utilizando un concentrador centrífugo Amicon Ultra-15 de Millipore. El anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 se congeló y se almacenó a -20°C ó -80°C. Se analizó la integridad del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 mediante SDS-PAGE en presencia y en ausencia de un agente reductor y posterior tinción con azul de Coomassie brillante (figura 23-A). La agregación y el estado oligomérico del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 se analizaron mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (figura 23-B). Se proporcionaron muestras caracterizadas para el análisis proteico y caracterización funcional posteriores. La espectrometría de masas IEP confirmó la masa molecular teórica del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 desglucosilado como especie principal. No pudo observarse contaminación por proteínas similares a anticuerpos.

Ejemplo 2F

60 Análisis de las propiedades de unión a <ANGPT2> del anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 en un ELISA de unión de <ANGPT2> y mediante Biacore

Se evaluaron las propiedades de unión del anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 en un ensayo ELISA con proteína <ANGPT2>-His de longitud completa (R&D Systems) tal como se ha indicado anteriormente. La figura 24 muestra los resultados de una titulación del anticuerpo de intercambio <IGF-

1R> VL-VH/CL-CH1 purificado y del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje en el ELISA de unión de tipo sándwich. Puede observarse claramente que el anticuerpo de intercambio <ANGPT> VL-VH/CL-CH1 es funcional y muestra características de unión comparables a las del anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje y, de esta manera, aparentemente es completamente funcional. Las diferencias menores observadas se encuentran dentro del error del método y podrían resultar, por ejemplo, de variaciones menores de la concentración de proteína.

Estos resultados fueron corroborados por los datos del Biacore con los anticuerpos purificados respectivos, que demostraron que el anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 presentaba un valor de K_D de 13 pM, presentaba una afinidad y cinética de unión comparables para ANGPT2 dentro del error del método a las del anticuerpo original de tipo salvaje <ANGPT2> con un valor K_D de 12 pM (figura 25).

Ejemplo 2G

Análisis de las propiedades funcionales del anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1

Con el fin de demostrar que el anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 presenta propiedades funcionales comparables a las del anticuerpo original de tipo salvaje <ANGPT2>, se compararon los dos anticuerpos para su capacidad de interferir con la unión de ANGPT2 a su dominio extracelular del receptor Tie2 en un ensayo de unión de ELISA tal como se ha indicado anteriormente. En el ELISA de unión respectivo, el anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 presentaba un valor de EC_{50} de 135 ng/ml para la interferencia con la unión de ANGPT2 humano, que es comparable al valor de EC_{50} de 145 nM para el anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje original. Estos datos fueron confirmados en un ensayo de unión competitiva de ligandos celulares con células HEK293 sobreexpresantes de Tie2 sobre su superficie, en las que el anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 presentaba un valor de EC_{50} de 225 ng/ml para la interferencia con la unión de la ANGPT2 humana que era comparable al valor de EC_{50} de 205 nM para el anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje original (datos no mostrados).

Conjuntamente los experimentos en el Ejemplo 2 demostraron que mediante la utilización del intercambio de dominios pueden generarse anticuerpos totalmente funcionales con propiedades comparables a las de los anticuerpos de tipo salvaje. Todas las propiedades funcionales se conservaron en los ensayos bioquímicos y celulares. Estos anticuerpos con intercambio de dominios forman la base para la generación de anticuerpos biespecíficos, tal como se indica posteriormente, en los Ejemplos 3 y 4.

Ejemplo 2H

Un análisis de modelaje molecular de los anticuerpos con intercambio de dominios reveló que el espacio estérico entre los dominios intercambiados podría estar limitando el plegamiento. Por lo tanto, se diseñaron constructos en los que se introdujo un residuo adicional de glicina en el extremo C-terminal de los dominios intercambios del Fab, por ejemplo entre la región conectora de VL-CL y la bisagra, o en el extremo del dominio VH-CH1 libre, respectivamente. El anticuerpo bivalente mono específico respectivo se indica como anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G) a continuación.

Las secuencias de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo mono específico bivalente de intercambio de angiopoyetina <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, incluyendo las secuencias líder respectivas indicadas en el presente ejemplo, se derivaron de la cadena pesada del anticuerpo <ANGPT2> humano (SEC ID n° 6), y una cadena ligera (SEC ID n° 7) descrita en el documento n° WO 2006/045049 y los dominios constantes de cadenas pesada y ligera se derivaron de un anticuerpo humano (C-kappa e IgG1).

Los segmentos génicos codificantes de la secuencia líder del anticuerpo <ANGPT2>, dominio variable de cadena ligera (VL) y el dominio constante de la cadena ligera kappa humana (CL) se unieron y se fusionaron con el extremo 5' de los dominios Fc de los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana (bisagra-CH2-CH3), incluyendo un residuo adicional de glicina. El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio de los dominios VH y CH1 por los dominios VL y CL se generó mediante síntesis génica y se indica como <ANGPT2> CP(G)* (Cadena Pesada*) (SEC ID n° 17) a continuación.

Los segmentos génicos de la secuencia líder del anticuerpo <ANGPT2>, dominio variable de cadena pesada (VH) y los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana (CH1) se unieron como cadena independiente, incluyendo un residuo adicional de glicina. El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio de los dominios VL y CL por los dominios VH y CH1 se generó mediante síntesis génica y se indica como <ANGPT2> CL(G)* (Cadena Ligera*) (SEC ID n° 18) a continuación.

Los vectores de expresión respectivos son análogos a los indicados en los Ejemplos 2, anteriormente. A continuación, se utilizaron estos vectores de expresión para la coexpresión transitoria del anticuerpo <ANGPT2> VL-

VH(G)/CL-CH1(G) respectivo con intercambio de dominio en células HEK293-F. El anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G) respectivo se purificó a partir de la expresión transitoria tal como se ha indicado anteriormente, y se analizó mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño y espectrometría de masas del anticuerpo respectivo. Los rendimientos de expresión de proteínas eran buenos y similares a los rendimientos de expresión obtenidos para el anticuerpo de intercambio VL-VH/CL-CH1 indicado anteriormente. Todas las propiedades investigadas no mostraron resultados inesperados y eran esencialmente comparables al anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2> respectivo. La figura 31 de muestra las propiedades virtualmente comparables del anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2> y el anticuerpo <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G) en un ensayo Biacore de unión de ANGPT2. Dentro del error del método, ambos anticuerpos mostraron una afinidad de unión comparable para ANGPT2 humano, con valores de K_D estimados (medias de dos determinaciones) de aproximadamente 38 pM para el anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2> y de aproximadamente 45 pM para el anticuerpo <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G).

	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	$K(D)$ [M]
anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje	$5,26 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-4}$	$3,79 \times 10^{-10}$
Anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH(G)/CL-CH1(G)	$5,29 \times 10^6$	$2,358 \times 10^{-3}$	$4,45 \times 10^{-9}$

15 Ejemplo 3

Expresión de anticuerpo biespecífico bivalente <ANGPT2-IGF-1R>, en el que en las cadenas pesada y ligera de unión específica a IGF-1R, los dominios variables VL y VH se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro (abreviadamente en la presente memoria, anticuerpo de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1).

20 Ejemplo 3A

Coexpresión transitoria del anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2> y del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 en células HEK293 EBNA, rindiendo el anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1

Con el fin de generar un anticuerpo biespecífico funcional que reconociese <ANGPT2> mediante la región Fab de tipo salvaje <ANGPT2> en un lado e IGF-1R mediante la región Fab del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 en el otro lado, se coexpresaron los dos plásmidos de expresión codificantes del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 (Ejemplo 1A) con dos plásmidos de expresión codificantes del anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2> (Ejemplo 2A). Bajo la premisa de una asociación estadística entre las cadenas pesadas de tipo salvaje CP y las cadenas pesadas entrecruzadas de Fab CP*, lo anterior resultó en la generación de anticuerpo biespecífico y bivalente de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1. Bajo la premisa de que ambos anticuerpos se expresan igualmente bien y sin considerar productos secundarios, lo anterior debería haber resultado en una proporción 1:2:1 de los tres productos principales: anticuerpo mono específico de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2>. Además, pueden esperarse varios productos secundarios, tales como CL-CL* (fragmento Fab2), CP-CP* (anticuerpo monovalente) y dímeros CP*-CP.

En contraste, al coexpresar los dos plásmidos de expresión codificantes del anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R> (Ejemplo 1A) y los dos plásmidos de expresión codificantes del anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2> como referencia, únicamente se genera una proporción reducida de anticuerpo biespecífico <IGF-1R-ANGPT2> funcional debido a la asociación estadística de las cadenas pesadas aunque asociación no guiada de cadenas ligeras con ambas cadenas pesadas de los anticuerpos de tipo salvaje <IGF-1R> y <ANGPT2>.

Para generar la mezcla de los productos principales: A) anticuerpo mono específico de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y C) anticuerpos de tipo salvaje <ANGPT2>, los cuatro plásmidos, DW047-pUC-CP*-IGF-1R Y DW048-pUC-CL*-IGF-1R y los plásmidos SB07-pUC-Hyg-OriP-CP-ANGPT2 y SB09-pUC-Hyg-OriP-CL-ANGPT2 ó los plásmidos SB04-pUC-CP-ANGPT2 y SB06-pUC-CL-ANGPT2, se cotransfectaron transitoriamente en células HEK293-EBNA de crecimiento adherente (líneas celular renal embrionaria humana 293 expresante de antígeno nuclear de virus de Epstein-Barr; número de depósito de la American Type Culture Collection (ATCC) n° CRL-10852, n° de 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). Los plásmidos de cadenas ligera y pesada codificantes de <IGF-1R> CP* y CL* (plásmidos DW047-pUC-CP*-IGF-1R y DW048-pUC-CL*-IGF-1R) y de <ANGPT2> CP y CL (plásmidos SB07-pUC-Hyg-OriP-CP-ANGPT2 y SB09-pUC-Hyg-OriP-CL-ANGPT2 ó los plásmidos SB04-pUC-CP-ANGPT2 y SB06-pUC-CL-ANGPT2, respectivamente) se expresaron a partir de cuatro plásmidos diferentes

utilizando una proporción molar de plásmidos codificantes de cadenas ligeras a plásmidos codificantes de cadenas pesadas de 1:1 (equimolaridad). Las células se alimentaron el día 3 con L-glutamina 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. El sobrenadante recolectado contenía una mezcla de los productos principales: A) anticuerpo monoespecífico de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y C) anticuerpos de tipo salvaje <ANGPT2> y se indica como "mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1". Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían la mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1 se recolectaron entre los días 5 y 11 después de la transfección, mediante centrifugación, y se almacenaron a -20°C.

Por motivos de comparación, el anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R> se coexpresó transitoriamente a partir de plásmidos CP y CL (4842-pUC-CL-IGF-1R y 4843-pUC-CP-IGF-1R, Ejemplo 1A) conjuntamente con los plásmidos de tipo salvaje <ANGPT2> CP y CL (SB07-pUC-Hyg-OriP-CP-ANGPT2 y SB09-pUC-Hyg-OriP-CL-ANGPT2 ó SB04-pUC-CP-ANGPT2 y SB06-pUC-CL-ANGPT2, respectivamente). Las células se alimentaron el día 3 con L-glutamina 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. El sobrenadante recolectado contenía una mezcla de diferentes variantes de anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R> y <ANGPT2>, monoespecíficas, biespecíficas o incompetentes para la unión debido a la asociación no guiada de cadenas ligeras con las cadenas pesadas de los anticuerpos de tipo salvaje <IGF-1R> y <ANGPT2>, resultando en una asociación incorrecta de cadenas ligeras, y se indica como "mezcla de tipo salvaje". Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían la mezcla de tipo salvaje se recolectaron entre los días 5 y 11 después de la transfección, mediante centrifugación, y se almacenaron a -20°C.

Debido a que el anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2> mostraba rendimientos de expresión transitoria significativamente más altos que los anticuerpos entrecruzados Fab <IGF-1R> y <IGF-1R>, la proporción de plásmidos de anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2> y plásmidos de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 se encontraba desplazada en favor de la expresión del anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2>. La proporción de plásmidos debe adaptarse durante los experimentos futuros para permitir una expresión igual de ambas especificidades, resultando en una distribución más uniforme de los diferentes anticuerpos.

Ejemplo 3B

Inmunoprecipitación de anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1

Se aisló a partir de sobrenadantes de cultivo celular (Ejemplo 3A) mediante inmunoprecipitación con perlas de proteína A-agarosa (Roche) una mezcla de los productos principales: A) anticuerpo monoespecífico de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y C) anticuerpos de tipo salvaje <ANGPT2> ("mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1") y se indica como "mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1". Se lavaron 60 µl de perlas de agarosa-proteína A tres veces en TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 al 1%). Posteriormente, se aplicaron 1 a 15 ml de sobrenadante de cultivo celular a las perlas de agarosa-proteína A preequilibradas en TBS-NP40. Tras la incubación durante 1 h a temperatura ambiente, las perlas se lavaron en una columna de filtración 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 20 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. En el SDS-PAGE no pudo observarse ninguna diferencia entre las tres especies de anticuerpo. Todos los anticuerpos se comportaron como anticuerpos IgG1 típicos, con una banda de aproximadamente 25 kDa correspondiente a la cadenas ligeras y una banda de 50 kDa correspondiente a la cadenas pesadas respectivas. En el estado no reducido podía observarse una banda en aproximadamente 150 kDa del anticuerpo completo. De esta manera, con el fin de demostrar la presencia de anticuerpo biespecífico <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 funcional, se purificó la mezcla entrecruzada de las tres especies de anticuerpo (Ejemplo 3C) y se diseñó un ensayo de FACS celular de puente (Ejemplo 3D).

Ejemplo 3C

Purificación de anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1

La mezcla de los productos principales: A) anticuerpo monoespecífico de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y C) anticuerpos de tipo salvaje <ANGPT2> ("mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1") del Ejemplo 3A se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguido de cromatografía de exclusión por tamaño siguiendo métodos estándares conocidos. Brevemente, los sobrenadantes de cultivo celular que contenían la mezcla de anticuerpos procedente de transfecciones de los plásmidos DW047-

pUC-CP*-IGF-1R y DW048-pUC-CL*-IGF-1R y SB07-pUC-Hyg-OriP-CP-ANGPT2 y SB09-pUC-Hyg-OriP-CL-ANGPT2<IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 se clarificaron mediante centrifugación (10.000 g durante 10 minutos) y filtración a través de un filtro de 0,45 µm y se aplicaron a una columna de proteína A HiTrap MabSelect Xtra (GE Healthcare) equilibrada con tampón PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no ligadas se lavaron con tampón de equilibración PBS, seguido de tampón de citrato sódico 0,1 M, pH 5,5, y se lavaron con PBS. La elución del anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 se consiguió con citrato sódico 100 mM, pH 2,8, seguido de la neutralización inmediata de la muestra con 300 ml de Tris 2 M, pH 9,0, por cada fracción de 2 ml. Se separó la proteína agregada de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de grado prep. HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0, y las fracciones de anticuerpo monoméricas se concentraron posteriormente utilizando un concentrador centrífugo Amicon Ultra-15 de Millipore. La mezcla de anticuerpos de intercambio VL-VH/CL-CH1 se congeló y se almacenó a -20°C o a -80°C. Se analizó la integridad de las especies de anticuerpo mediante SDS-PAGE (ver la fig. 14) en presencia y en ausencia de un agente reductor y posterior tinción con azul de Coomassie brillante tal como se describe en el Ejemplo 1D. La mezcla de anticuerpos se comportó como anticuerpos IgG1 típicos, con una banda aproximadamente en 25 kDa correspondiente a la cadenas ligeras y una banda en 50 kDa correspondiente a la cadenas pesadas respectivas. En el estado no reducido podía observarse una banda en aproximadamente 150 kDa del anticuerpo completo. No eran visibles productos secundarios evidentes, tales como anticuerpos monovalentes, etc., en el SDS-PAGE tras la purificación con proteína A. La agregación y el estado oligomérico del anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 se analizaron mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño y demostraron que las especies de anticuerpo purificadas se encontraban en un estado monomérico. Se proporcionaron muestras caracterizadas para el análisis proteico y caracterización funcional posteriores. De esta manera, con el fin de demostrar la presencia de anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 funcional, se purificó la mezcla de las tres especies de anticuerpo en un ensayo de FACS celular de puente (Ejemplo 3D).

Por motivos de comparación, la mezcla de tipo salvaje resultante de la coexpresión de los plásmidos de anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R> CP y CL (4842-pUC-CL-IGF-1R y 4843-pUC-CP-IGF-1R, Ejemplo 1A) conjuntamente con los plásmidos de tipo salvaje <ANGPT2> CP y CL (SB07-pUC-Hyg-OriP-CP-ANGPT2 y SB09-pUC-Hyg-OriP-CL-ANGPT2) se purificó como referencia a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados, mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguido de cromatografía de exclusión por tamaño siguiendo el procedimiento descrito.

Ejemplo 3D

Detección de anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 funcional en un ensayo FACS celular de puente sobre células I24 expresantes de IGF-1R

Con el fin de confirmar la presencia de anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 funcional en la "mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1" de los productos principales A) anticuerpo monoespecífico de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 y C) anticuerpos de tipo salvaje <ANGPT2> de la coexpresión transitoria descritos en el Ejemplo 3A, se llevó a cabo un ensayo FACS celular de puente de IGF-1R-ANGPT2 sobre células I24 (células NIH3T3 expresantes de IGF-1R humano recombinante, Roche). El principio del ensayo se ilustra en la fig. 15. Un anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 que se encuentra presente en el sobrenadante (Ejemplo 3A) o en la mezcla de anticuerpos purificada (Ejemplo 3C), respectivamente, es capaz de unirse a IGF-1R en las células I24 y a ANGPT2 simultáneamente, y de esta manera formará un puente entre sus dos antígenos diana y las dos regiones Fab opuestas.

Brevemente, se incubaron 5×10^5 células I24 por cada tubo de FACS con 50 ml de sobrenadante de cultivo celular no diluido o con una dilución de 160 mg/ml de mezcla de anticuerpos totales purificada y se incubaron sobre hielo durante 1 h. En el primer caso las células se incubaron con A) sobrenadantes de cultivo celular de la coexpresión de los plásmidos de <IGF-1R> entrecruzado (DW047-pUC-CP*-IGF-1R y DW048-pUC-CL*-IGF-1R) con los plásmidos de tipo salvaje <ANGPT2> (SB04-pUC-CP-ANGPT2) y SB06-pUC-CL-ANGPT2) indicados como "mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1" o B) con sobrenadante de cultivo celular procedente de la coexpresión de los plásmidos de tipo salvaje <IGF-1R> (4842-pUC-CL-IGF-1R y 4843-pUC-CP-IGF-1R) con los plásmidos de tipo salvaje <ANGPT2> (SB04-pUC-CP-ANGPT2) y SB06-pUC-CL-ANGPT2) indicados como "mezcla de tipo salvaje" (figura 16). En el segundo caso, la mezcla de anticuerpos purificada respectiva de la mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1 ó de la mezcla de tipo salvaje se aplicó a las células I24 (Ejemplo 3C, figura 17). Se eliminó mediante lavado el anticuerpo no ligado con 4 ml de PBS helado (Gibco) y FCS al 2% (Gibco) y las células se centrifugaron (5 min a 400g) y el anticuerpo biespecífico ligado se detectó con 50 ml de angiopoyetina-2 (ANGPT2) humana 2 mg/ml (R&D Systems) durante 1 h sobre hielo. A continuación, la angiopoyetina-2 (ANGPT2) no ligada se eliminó mediante lavado una vez (fig. 16) o dos veces (fig. 17) con 4 ml de PBS helado (Gibco) + FCS al 2% (Gibco); las células se centrifugaron (5 min a 400g) y la angiopoyetina-2 ligada se detectó con 50 ml de anticuerpo <Ang2>IgG1_m-Biotina 5 mg/ml (BAM0981, R&D Systems) durante 45 min sobre hielo; alternativamente

5 las células se incubaron con 50 ml de IgG1_m-Biotina-control de isotipo 5 mg/ml (R&D Systems). Se eliminó mediante lavado el anticuerpo no ligado con 4 ml de PBS helado (Gibco) y FCS al 2% (Gibco) y las células se centrifugaron (5 min a 400g) y el anticuerpo de detección ligado se detectó con 50 ml de conjugado de estreptavidina-PE 1:400 (Invitrogen/Zymed) durante 45 min sobre hielo protegido de la luz. El conjugado de estreptavidina-PE no ligado se eliminó mediante lavado con 4 ml de PBS helado + FCS al 2%. A continuación, las células se centrifugaron (5 min a 400 g), se resuspendieron en 300 a 500 ml de PBS y el conjugado de estreptavidina-PE ligado se cuantificó en un FACSCalibur o FACS Canto (canal FL2, 10.000 células por adquisición). Durante el experimento se incluyeron los controles de isotipo respectivos para excluir cualesquiera sucesos de unión no específica. Además, a modo de controles se incluyeron los anticuerpos monoespecíficos bivalentes IgG1 purificados <IGF1R> y <ANGPT2>.

15 La fig. 16 muestra los resultados del ensayo de FACS celular de puente sobre células I24 con los sobrenadantes de cultivo celular; la fig. 17 muestra los resultados con la mezcla de anticuerpos purificada. En ambos casos en los que se aplicó la tecnología de intercambio VL-VH/CL-CH1, la incubación con sobrenadante o con "mezcla de anticuerpos biespecíficos de intercambio VL-VH/CL-CH1" purificada procedente de la coexpresión de un anticuerpo de intercambio VL-VH/CL-CH1 con un anticuerpo de tipo salvaje resultó en un desplazamiento significativo de la fluorescencia indicativo de la presencia de un anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 funcional que era capaz de unirse a IGF-1R en las células I24 y a ANGPT2 simultáneamente, y que de esta manera forma un puente entre sus dos antígenos diana y las dos regiones Fab opuestas. En contraste con lo anterior y tal como se predice para la coexpresión de dos anticuerpos de tipo salvaje, sólo se forma una proporción muy reducida de anticuerpos biespecíficos funcionales, resultando en únicamente un ligero desplazamiento de la fluorescencia en el ensayo FACS de puente al aplicar el sobrenadante de cultivo celular o la "mezcla de tipo salvaje" de anticuerpos purificada procedente de la coexpresión de los plásmidos de tipo salvaje <IGF-1R> con los plásmidos de tipo salvaje <ANGPT2>, indicando la presencia de sólo una fracción reducida de anticuerpo biespecífico de tipo salvaje <IGF-1R-ANGPT2> funcional.

25 Estos resultados demuestran que mediante la coexpresión de plásmidos de intercambio VL-VH/CL-CH1 codificantes de un anticuerpo <IGF-1R> con plásmidos de tipo salvaje codificantes de un anticuerpo <ANGPT2>, pueden generarse fácilmente anticuerpos biespecíficos de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 funcionales que reconocen las dos dianas diferentes simultáneamente. En contraste, la coexpresión de dos plásmidos de tipo salvaje codificantes de los anticuerpos <IGF-1R> y <ANGPT2> resulta en una complejidad elevada de los anticuerpos formados y en sólo una proporción menor de anticuerpo biespecífico de tipo salvaje <IGF-1R-ANGPT2> funcional.

35 Ejemplo 4

Generación de anticuerpo biespecífico bivalente de intercambio <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 con dominios CH3 modificados (botones-en-ojales) (figura 30)

40 Tal como se muestra en el ejemplo, anteriormente, la coexpresión de plásmidos codificantes de anticuerpos de tipo salvaje con plásmidos codificantes de anticuerpos de intercambio VL-VH/CL-CH1 resulta en la generación de una mezcla biespecífica de intercambio VL-VH/CL-CH1 de los productos principales A) anticuerpo monoespecífico de intercambio VL-VH/CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio VL-VH/CL-CH1 y C) anticuerpo de tipo salvaje. Con el fin de mejorar adicionalmente el rendimiento de anticuerpo biespecífico de intercambio <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, se aplicó la tecnología de botones-en-ojales a la coexpresión de un anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 y un anticuerpo de tipo salvaje <VEGF> para inducir la heterodimerización de las cadenas pesadas no modificadas y modificadas respectivas (mediante CP y CP*) y obtener una preparación de anticuerpos biespecíficos más homogénea y funcional. En el presente ejemplo, se generó un anticuerpo biespecífico que reconocía VEGF y ANGPT2 simultáneamente basándose en el anticuerpo de tipo salvaje <VEGF> llamado G6-31 y el anticuerpo <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 llamado Mab536, tal como se ha indicado anteriormente.

55 Tal como se ha indicado anteriormente, los segmentos génicos codificantes de la secuencia líder del anticuerpo <ANGPT2>, dominio variable de cadena ligera (VL) y el dominio constante de cadena ligera kappa humana (CL) se unieron y se fusionaron con el extremo 5' de los dominios Fc de los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana (bisagra-CH2-CH3). El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio de los dominios VH y CH1 por los dominios VL y CL se generó mediante síntesis génica y se indica como <ANGPT2> CP* (Cadena Pesada*) (SEC ID nº 8).

60 Los segmentos génicos de la secuencia líder del anticuerpo <ANGPT2>, dominio variable de cadena pesada (VH) y los dominios constantes de la cadena pesada γ 1 humana (CH1) se unieron como cadena independiente. El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio de los dominios VL y CL por los dominios VH y CH1 se generó mediante síntesis génica y se indica como <ANGPT2> CL* (Cadena Ligera*) (SEC ID nº 9) a continuación.

Las secuencias de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de tipo salvaje del anticuerpo mono-específico bivalente <VEGF> G6-31, incluyendo las secuencias líder respectivas indicadas en el presente ejemplo, se derivaron de los dominios variables de cadena pesada del anticuerpo <VEGF> humano G6-31 de SEC ID nº 12, y los dominios variables de cadena ligera de SEC ID nº 13, derivados ambos del anticuerpo G6-31 anti-VEGF humano derivado mediante expresión fágica, el cual se describe en detalle en Liang *et al.*, J. Biol. Chem. 281(2):951-61, 13 de enero de 2006 y en la patente US nº 2007/0141065, y los dominios constantes de cadenas pesada y ligera se derivaron de un anticuerpo humano (C-kappa e IgG1).

Con este fin, el plásmido codificante de la cadena pesada del anticuerpo G6-31 de tipo salvaje <VEGF> se modificó mediante la introducción de un segmento génico de CH3 generado mediante síntesis génica y codificante del residuo de botón T366W de SEC ID nº 10 en el dominio CH3 de la cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje G6-31 <VEGF> respectivo, resultando en SEC ID nº 16; en contraste, el plásmido codificante de la cadena pesada*, CP*, del anticuerpo Mab536 <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 se modificó mediante la introducción de un segmento génico de CH3 generado mediante síntesis génica y codificante de los residuos de ojal T366S, L368A e Y407V de SEC ID nº 11 en el dominio CH3 de la cadena pesada*, CP*, del anticuerpo Mab536 <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1, resultando en SEC ID nº 15. En este caso, los plásmidos codificantes del anticuerpo G6-31 <VEGF> de tipo salvaje de botón se organizaron como vectores genómicos, mientras que los plásmidos para el anticuerpo Mab536 <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 se organizaron como vectores intrónA-ADNc.

A continuación, los cuatro plásmidos respectivos codificantes de la cadena pesada CP de G6-31 <VEGF> con el botón SEC ID nº 16 y la cadena ligera LC de tipo salvaje SEC ID nº 14 y la cadena pesada*, CP*, de <ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 modificada con el ojal SEC ID nº 15 y la cadena ligera*, modificada, LC* (SEC ID nº 8) se coexpresaron en una proporción equimolar mediante transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F tal como se ha indicado anteriormente a una escala de 2,6 L en un fermentador Quad. Se purificaron los anticuerpos con una columna HiTrap MabSelect (GE), seguido de cromatografía de exclusión por tamaño en una columna HiLoad Superdex 200 26/60 (GE), tal como se ha indicado anteriormente. Los rendimientos tras la CET fueron del orden de aproximadamente 38 mg de fracciones de anticuerpo purificadas a partir de 2 l de expresión transitoria. La figura 26 muestra SDS-PAGE reducido y no reducido de las fracciones de exclusión por tamaño obtenidas durante la purificación. En el SDS-PAGE reducido puede observarse que las cadenas pesada y ligera de tipo salvaje y modificadas respectivas han sido sintetizadas y purificadas homogéneamente. Sin embargo, en el SDS-PAGE no reducido resulta evidente que todavía se encontraban presentes varias especies de anticuerpo.

A continuación se analizaron mediante espectrometría de masas las fracciones de exclusión por tamaño obtenidas (desglucosiladas pero no reducidas o desglucosiladas y reducidas). Pudieron identificarse varias especies de anticuerpo en las fracciones de espectrometría de masas y también pudieron asignarse a las bandas observadas en el SDS-PAGE respectivo (figura 27). La tabla, a continuación, muestra las especies de anticuerpo que pudieron identificarse:

Especies	1. Frac 5 desgluc.	1. Frac 9 desgluc.
CL G6-31/ 23255 Da / (SS): 23251 Da	-	-
CP G6-31/ 49149 Da / (SS): 49136 Da	-	-
CL* de anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 / 23919 Da / (SS): 23914 Da	-	-
CP* de anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 Mab536/ 49245 Da / (SS): 49231 Da	-	
CL G6-31 + CL de anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 Mab536 => (SS): 47165 Da	X	X
Antic. completo G6-31 (SS) 144774 Da	X	
Antic. completo biespecífico <VEGF-ANGPT2> de intercambio VL-VH/CL-CH1 (SS) 145532 Da (CL+ CP G6-31) + (CL* + CP*)	X	
Medio antic. G6-31 (SS) 72387 Da	X	X
(CP G6-31) + (CP de anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 Mab536)=> (SS) 98367 Da	X	X
(SH) 2 x (CP de anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 Mab536) + CL G6-31 => 121745 Da	X	
2 x (CP G6-31) + CL G6-31 + CP de anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 Mab536 => (SS): 170754 Da	X + 20 Da	

El anticuerpo biespecífico de intercambio <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 deseado que reconoce VEGF con un brazo y ANGPT2 con el otro brazo pudo, de esta manera, identificarse inequívocamente mediante espectrometría de

masas y también pudo observarse en el SDS-PAGE correspondiente. En la figura 30 se muestra un diagrama esquemático del anticuerpo biespecífico de intercambio <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1. La concentración más alta de este anticuerpo deseado pudo encontrarse en las fracciones 5 y 6, mientras que su concentración era más reducida en las fracciones posteriores.

5 Además, la presencia de anticuerpo biespecífico de intercambio <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 capaz de unirse simultáneamente a ANGPT2 y VEGF se confirmó mediante un ensayo ELISA de puente (figura 28) y en ensayos Biacore de puente (figura 29) indicados anteriormente, en los que se demuestra que el anticuerpo biespecífico deseado era capaz de unirse a ANGPT2 y a VEGF simultáneamente. En estos ensayos el anticuerpo biespecífico tetraivalente TvG6-Ang23 sirvió de control.

10 Debe indicarse que, debido a una relativa sobreexpresión del anticuerpo <VEGF> de tipo salvaje G6-31, por ejemplo debido a mejores rendimientos de expresión para los vectores genómicos codificantes de derivados de G6-31, se indujo la formación de productos secundarios inactivos, resultando en un exceso de dímeros de G6-31 inactivos y mitades de anticuerpo. Con el fin de alcanzar un rendimiento máximo del anticuerpo biespecífico de intercambio <VEGF-ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 deseado, se están realizando estudios adicionales que consiguen una expresión uniforme de la totalidad de las cuatro cadenas de anticuerpo y reducen la formación de productos secundarios. Entre estos estudios se incluyen: i) la optimización de la estequiometría equimolar de los 4 plásmidos utilizados para la coexpresión, por ejemplo mediante combinación de las unidades transcripcionales sobre uno o dos plásmidos, la introducción de los elementos de control respectivos, así como ii) la optimización de la heterodimerización, por ejemplo mediante la utilización de tecnologías de botón en ojal, tales como la introducción de un puente disulfuro adicional en el dominio CH3, por ejemplo Y349C, en la "cadena de botón", y D356C en la "cadena de ojal" y/o combinados con la utilización de los residuos R409D, K370E (K409D) para los residuos de botón y D399K y E357K para los residuos de ojal indicados en el documento nº EP 1870459A1.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 30 <120> Anticuerpos biespecíficos bivalentes
- <130> 24677
- <150> EP 07024867
- 35 <151> 2007-12-21
- <160> 18
- 40 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 467
- <212> PRT
- 45 <213> Artificial
- <220>
- <223> secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R>
- 50 <400> 1

ES 2 468 265 T3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 115 120 125

ES 2 468 265 T3

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

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

ES 2 468 265 T3

	340		345		350											
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			355					360					365			
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		370					375					380				
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	385					390					395					400
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
					405					410					415	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				420					425					430		
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			435					440					445			
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	450					455						460				
	Pro	Gly	Lys													
	465															

5 <210> 2
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> secuencias de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R>

<400> 2

Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5				10						15	
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser
			20					25					30		
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
			35				40					45			

15

ES 2 468 265 T3

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 3
<211> 462
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada* (CP*) del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena pesada VH se sustituye por el dominio de cadena ligera VL, y el dominio de cadena pesada CH1 se sustituye por el dominio de cadena ligera CL

<400> 3

ES 2 468 265 T3

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
 115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190

ES 2 468 265 T3

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

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

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

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

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285

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

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

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

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

ES 2 468 265 T3

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

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

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 4
 <211> 240
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera* (CL*) del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena ligera VL se sustituye por el dominio de cadena pesada VH, y el dominio de cadena ligera CL se sustituye por el dominio de cadena pesada CH1

<400> 4

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

15 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

ES 2 468 265 T3

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

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

<210> 5
 <211> 557
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos etiqueta péptido de unión His-estreptavidina de ectodominio de IGF-1R (IGF-1R-His-SBP ECD)

10

<400> 5

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
 20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45

ES 2 468 265 T3

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
 50 55 60

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

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
 85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
 100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
 115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
 130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220

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

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
 260 265 270

ES 2 468 265 T3

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
 275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
 290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
 325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
 340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
 355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
 370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
 385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
 405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
 420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
 435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
 450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
 465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Ala Ala Ala Leu
 485 490 495

ES 2 468 265 T3

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Thr His His His His His His Ser
 500 505 510

Gly Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 515 520 525

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
 530 535 540

Gln Gly Gln Arg Glu Pro Ser Gly Gly Cys Lys Leu Gly
 545 550 555

<210> 6

<211> 471

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje de la angiopoyetina-2

<ANGPT2>

<400> 6

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

15

ES 2 468 265 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr
 115 120 125
 Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

ES 2 468 265 T3

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

ES 2 468 265 T3

<211> 468
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada* (CP*) del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena pesada VH se sustituye por el dominio de cadena ligera VL, y el dominio de cadena pesada CH1 se sustituye por el dominio de cadena ligera CL

10 <400> 8

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
 20 25 30

Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 35 40 45

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu
 50 55 60

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn
 65 70 75 80

Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 130 135 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 165 170 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 180 185 190

ES 2 468 265 T3

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 195 200 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 210 215 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

ES 2 468 265 T3

405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 9
 <211> 244
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera* (CL*) del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena ligera VL se sustituye por el dominio de cadena pesada VH, y el dominio de cadena ligera CL se sustituye por el dominio de cadena pesada CH1

<400> 9

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

15

ES 2 468 265 T3

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr
 115 120 125

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser ...
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

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

Pro Lys Ser Cys

<210> 10
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> secuencia de aminoácidos del dominio CH3 (botón) con un intercambio T366W para la utilización en la tecnología de botón en ojal

<400> 10
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15

ES 2 468 265 T3

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 11

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencia de aminoácidos del dominio CH3 (ojal) con intercambios T366W, L368A e Y407V para la utilización en la tecnología de botón en ojal

<400> 11

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

15

ES 2 468 265 T3

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje <VEGF>

10

<400> 12

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile
 35 40 45

Ser Asp Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

ES 2 468 265 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

ES 2 468 265 T3

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

- 5 <210> 13
- <211> 233
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje <VEGF> con líder

<400> 13

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
 35 40 45

Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60

ES 2 468 265 T3

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly
100 105 110

Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

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

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 14
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje <VEGF> sin líder

<400> 14

ES 2 468 265 T3

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

ES 2 468 265 T3

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

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 468 265 T3

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

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

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

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

<210> 16
 <211> 450
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje <VEGF>, en el que el dominio CH3 porta una secuencia de aminoácidos con un intercambio T366W (botón) para la utilización en la tecnología de botón en ojal

<400> 16

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

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

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

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

ES 2 468 265 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 17
 <211> 447
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada* (CP*) del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena pesada VH se sustituye por el dominio de cadena ligera VL, y el dominio de cadena pesada CH1 se sustituye por el dominio de cadena ligera CL con una Gly

<400> 17
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

15 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

ES 2 468 265 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

ES 2 468 265 T3

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera* (CL*) del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1, en el que el dominio de cadena ligera VL se sustituye por el dominio de cadena pesada VH, y el dominio de cadena pesada CL se sustituye por el dominio de cadena pesada CH1 con una Gly

5

<400> 18

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

10

ES 2 468 265 T3

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

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

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

Gly Cys
225

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo biespecífico bivalente, que comprende:

- 5 a) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
 b) la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno,
 en el que los dominios variables V_L y V_H se sustituyen uno por otro,
 y
 en el que los dominios constantes C_L y C_H se sustituyen uno por otro.

10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque cada uno del dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se reúne en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo, en el que dicha interfaz se altera para inducir la formación del anticuerpo biespecífico bivalente, en el que la alteración se caracteriza porque:

- 15 a) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada,
 de manera que dentro de la interfaz original del dominio CH3 de una cadena pesada que se reúne con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada del anticuerpo biespecífico bivalente,
 se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más grande,
 20 generando de esta manera una protuberancia en el interior de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada, pudiendo situarse dicha protuberancia en una cavidad en el interior de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada
 y
 b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada,
 25 de manera que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico bivalente,
 se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más pequeño,
 generando de esta manera una cavidad en el interior de la interfaz del segundo dominio CH3, en el interior de la cual puede situarse una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.

30 3. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más grande se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

35 4. Anticuerpo según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado porque dicho residuo aminoácido de volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

40 5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3.

6. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque:

45 uno de los dominios constantes de cadena pesada CH3 de ambas cadenas pesadas se sustituye por un dominio constante de cadena pesada CH1, y el otro dominio constante de cadena pesada CH3 se sustituye por un dominio constante de cadena ligera CL.

7. Método para la preparación de un anticuerpo biespecífico bivalente según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- 50 a) transformar una célula huésped con:
 -vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
 55 -vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno,
 en el que los dominios variables V_L y V_H se sustituyen uno por otro, y en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.
 b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo, y
 60 c) recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

8. Célula huésped que comprende:

-vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno, y
-vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno,

5

en el que los dominios variables V_L y V_H se sustituyen uno por otro,
y
en el que los dominios constantes C_L y $CH1$ se sustituyen uno por otro.

10

9. Composición del anticuerpo biespecífico bivalente según las reivindicaciones 1 a 6.

10. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico bivalente según las reivindicaciones 1 a 6 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15

Fig. 1

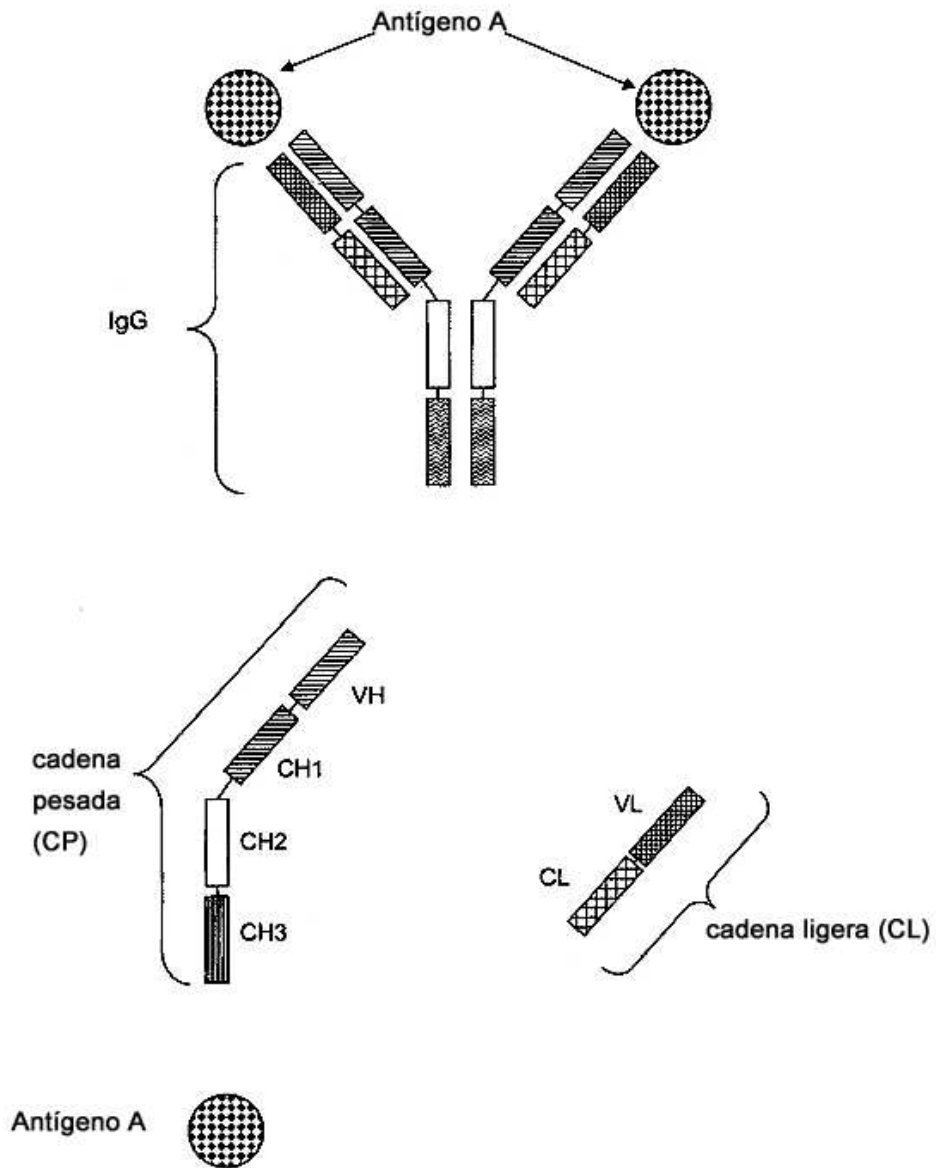


Fig. 2

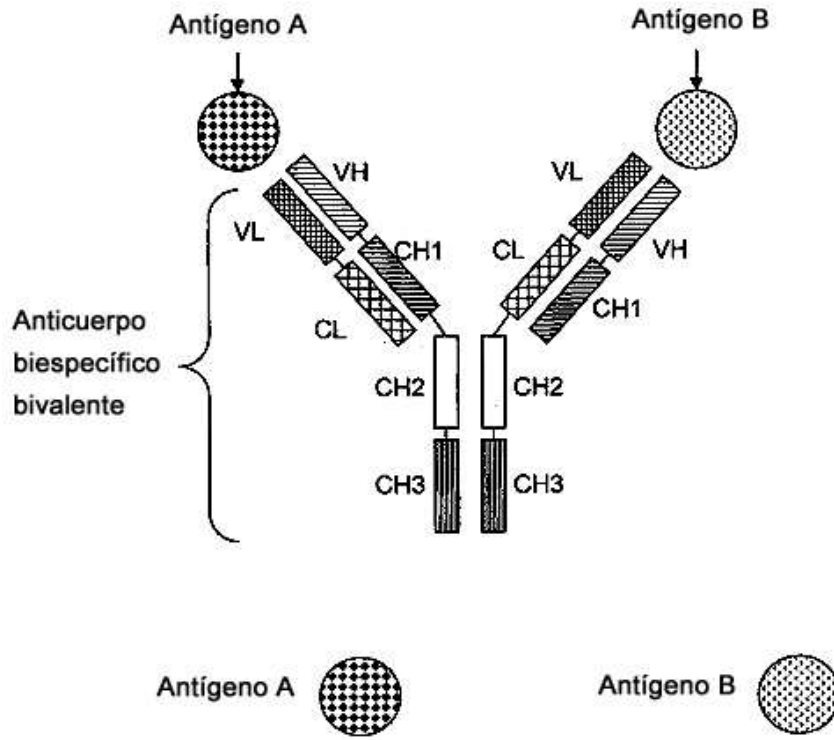


Fig. 3

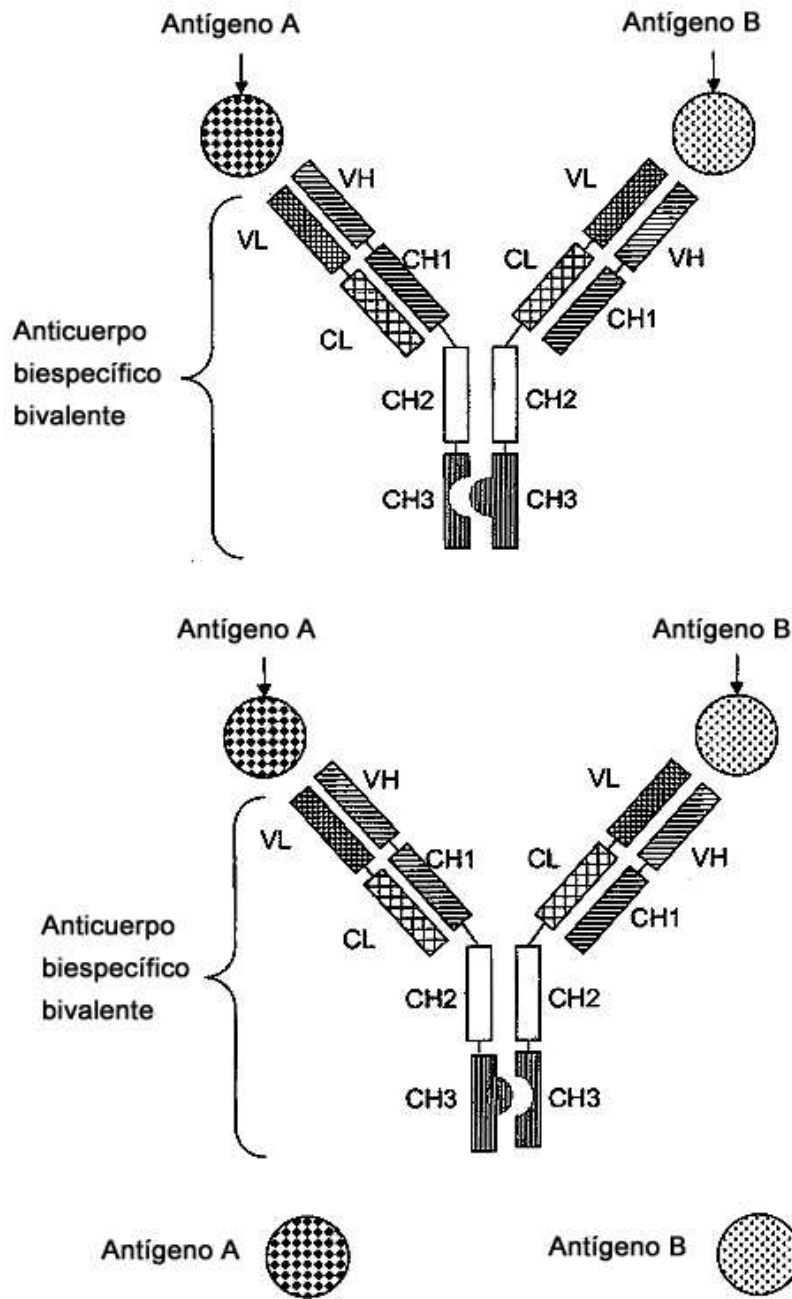


Fig. 4

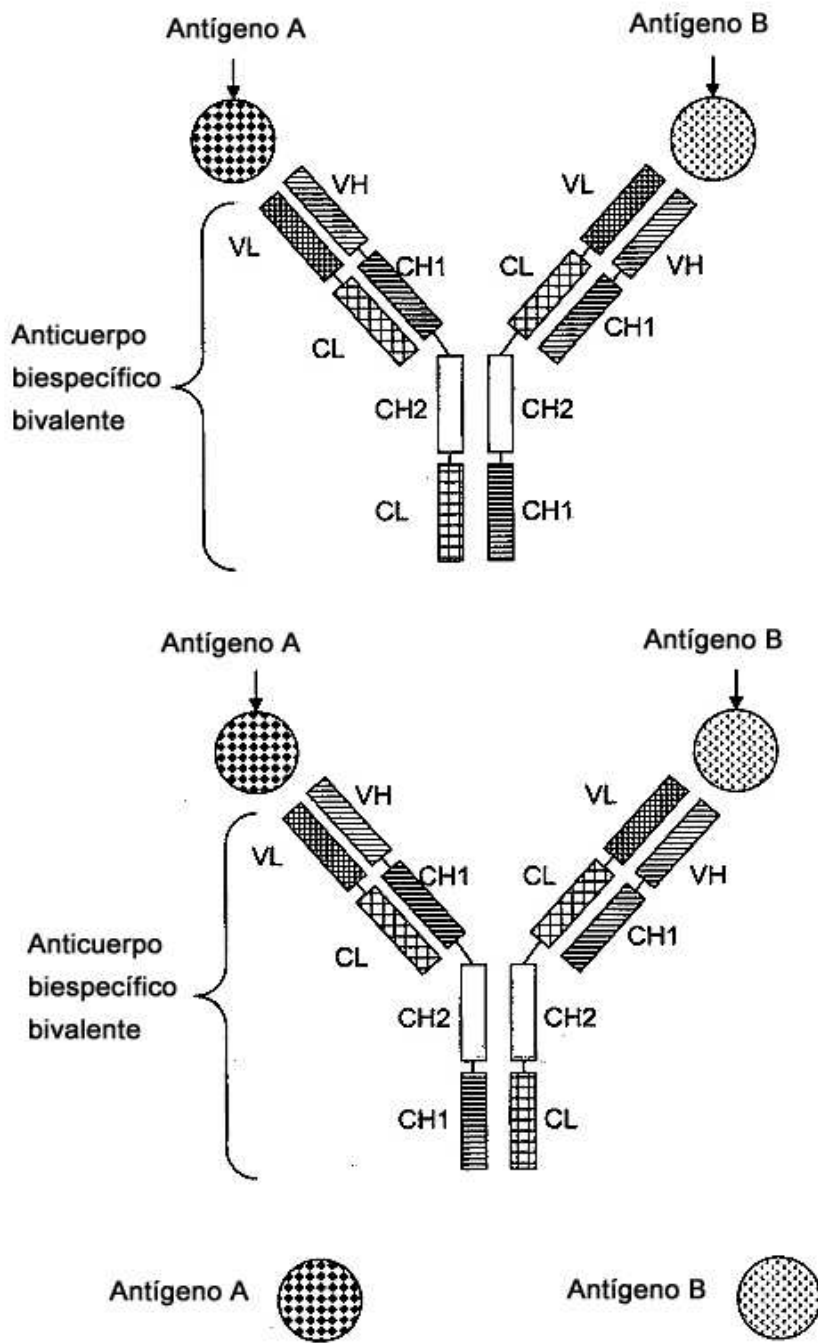


Fig. 5

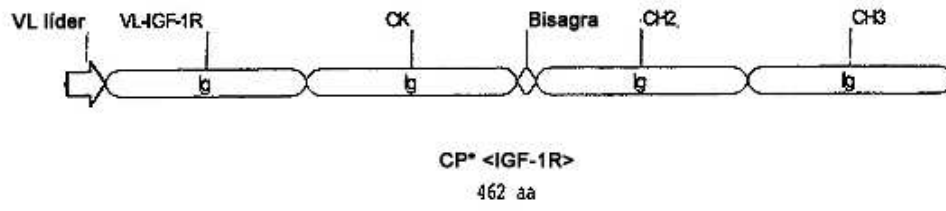


Fig. 6

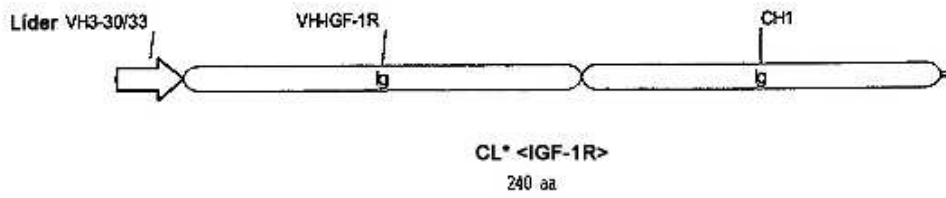


Fig. 7

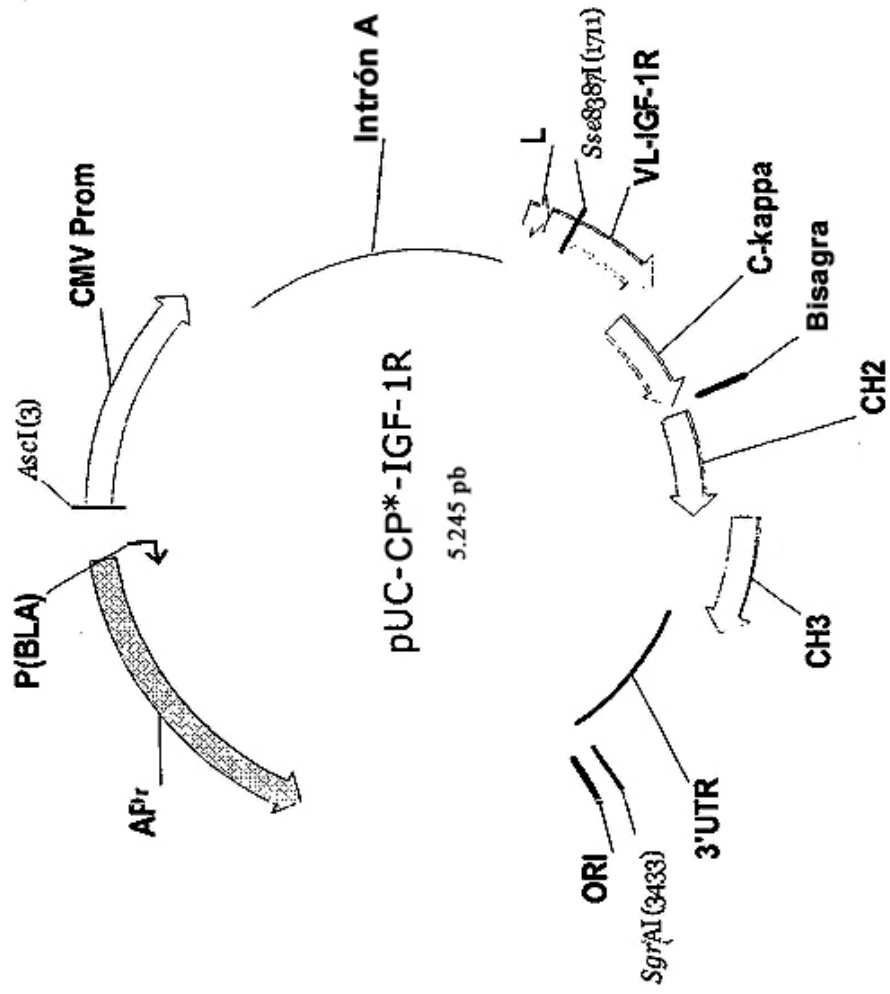


Fig. 8

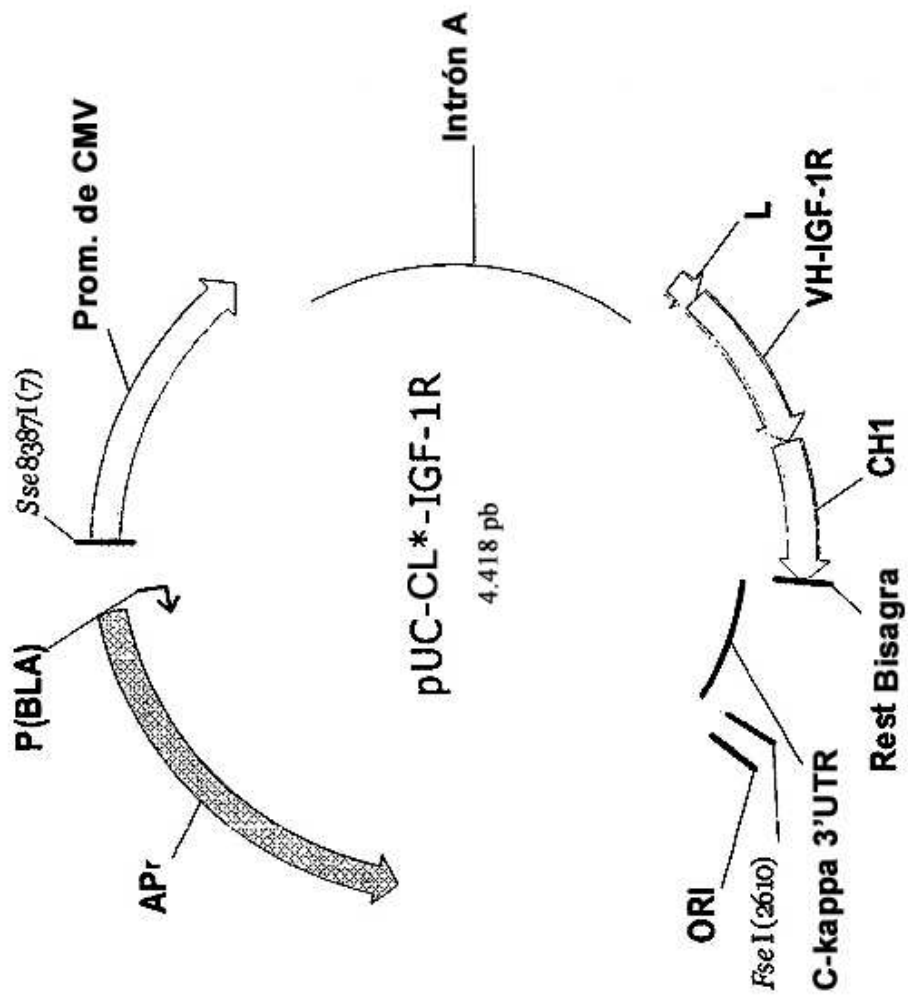


Fig. 9

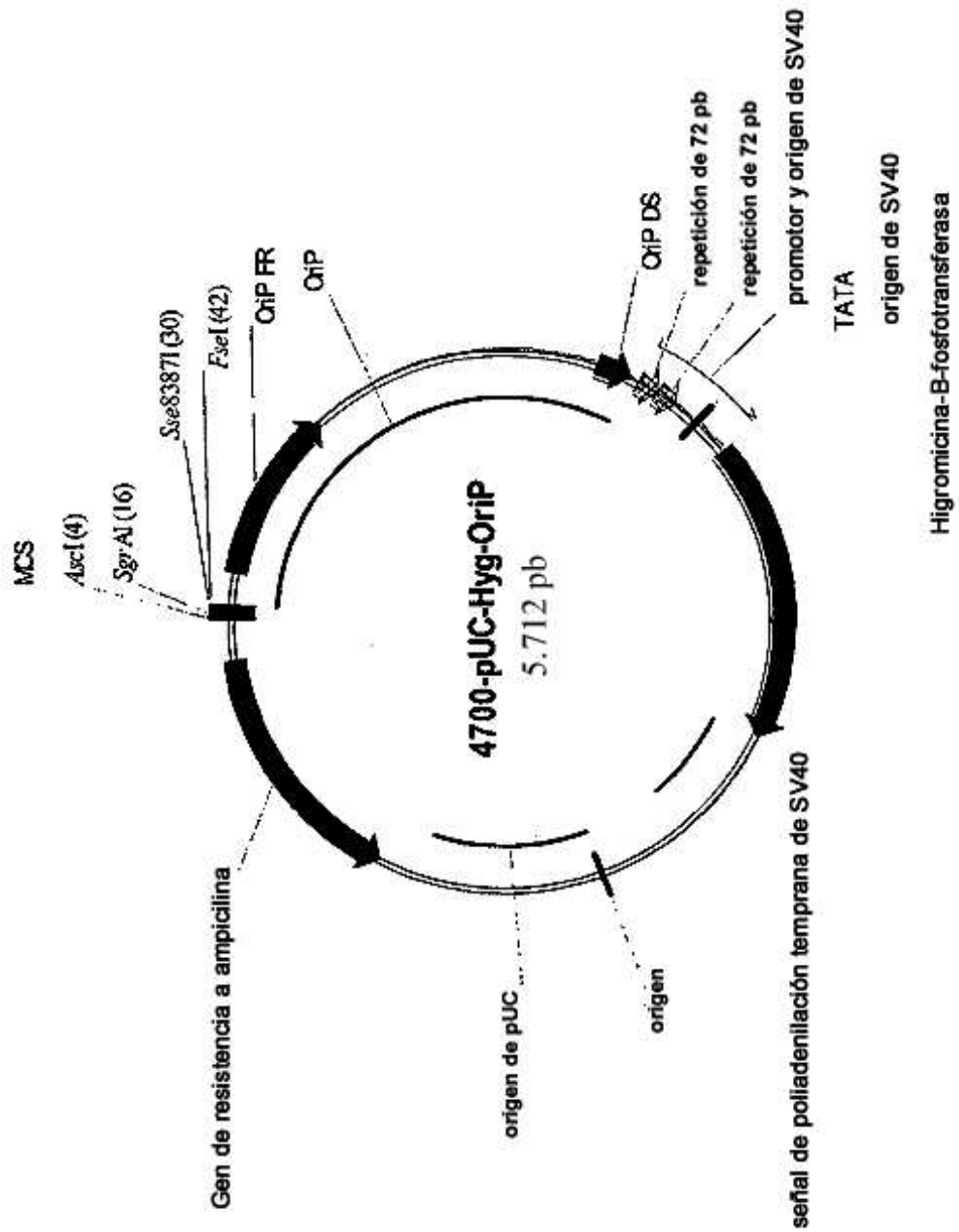


Fig. 10

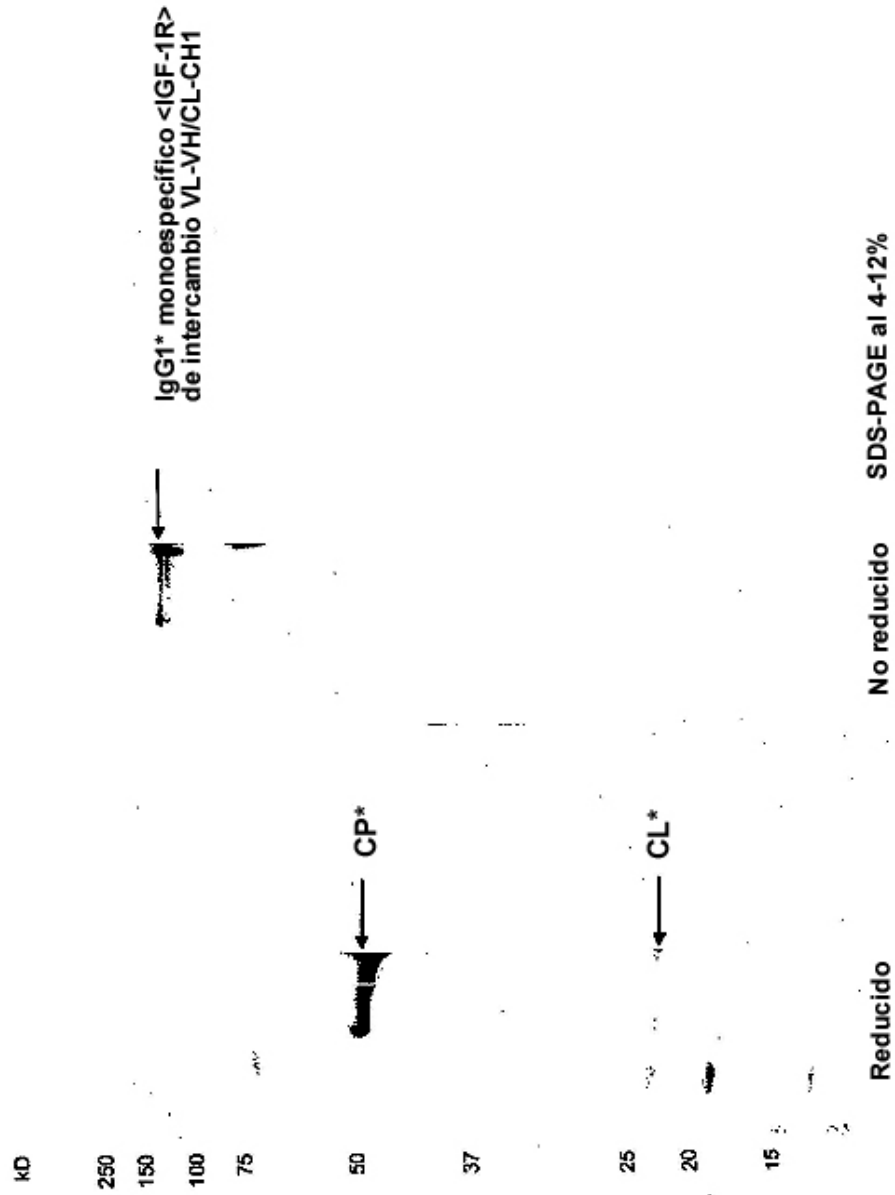
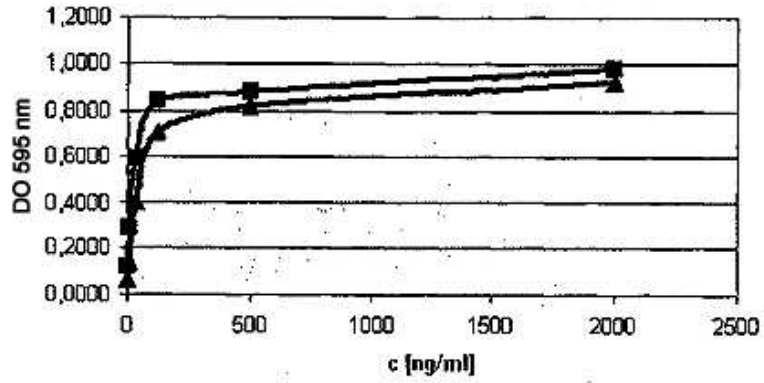


Fig. 11

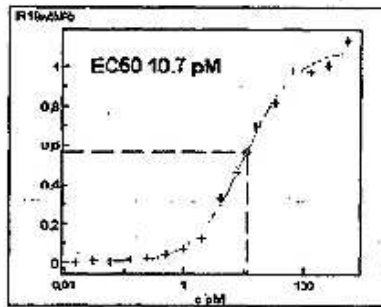
A



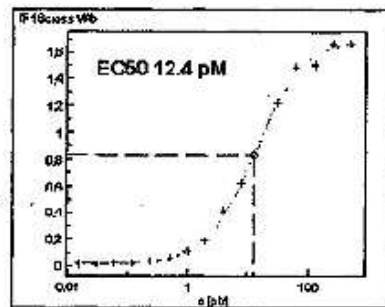
anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R>

▲ anticuerpo de intercambio
<IGF-1R> VL-VH/CL-CH1

B



Unión de anticuerpo <IGF-1R>
de tipo salvaje a IGF-1R-ECD



Unión de anticuerpo de intercambio
<IGF-1R> VL-VH/CL-CH1 a
IGF-1R-ECD

Fig. 12

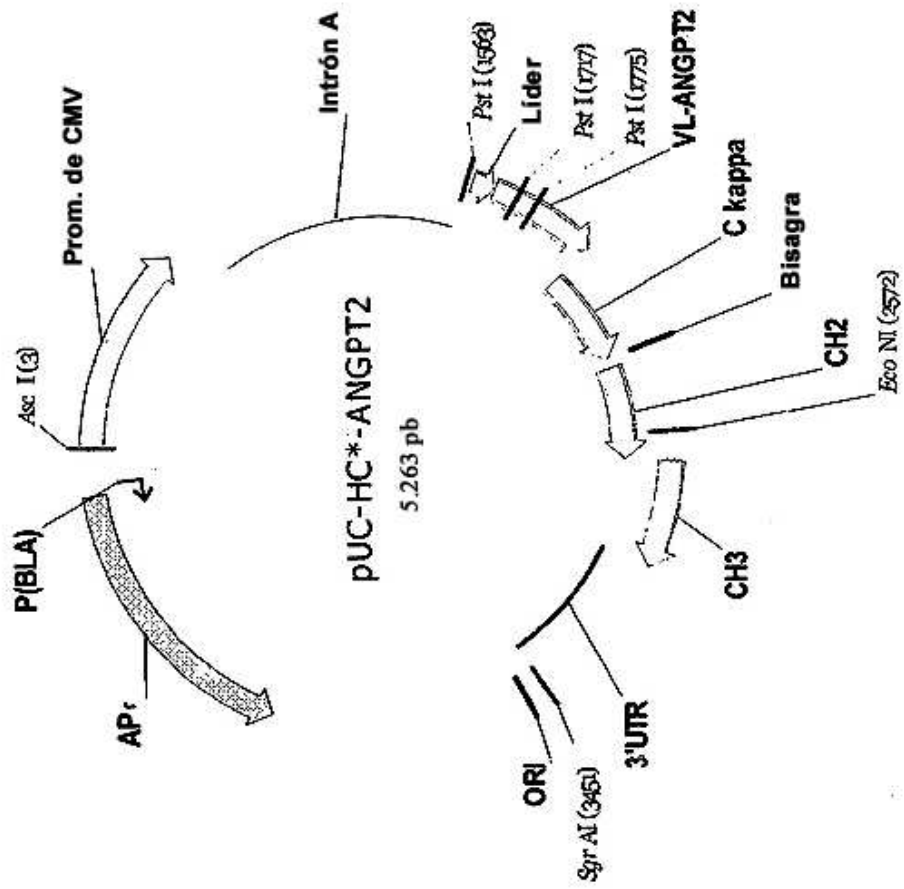


Fig. 13

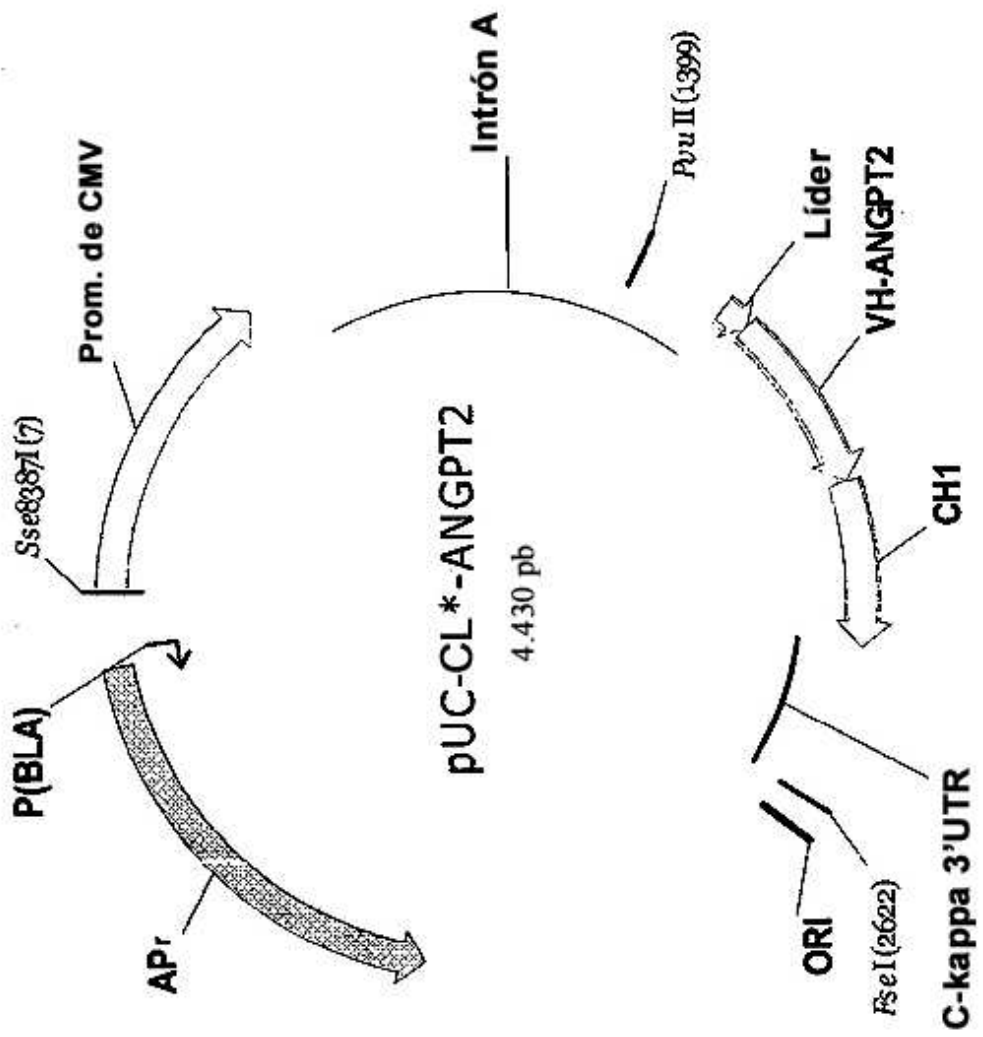


Fig. 14

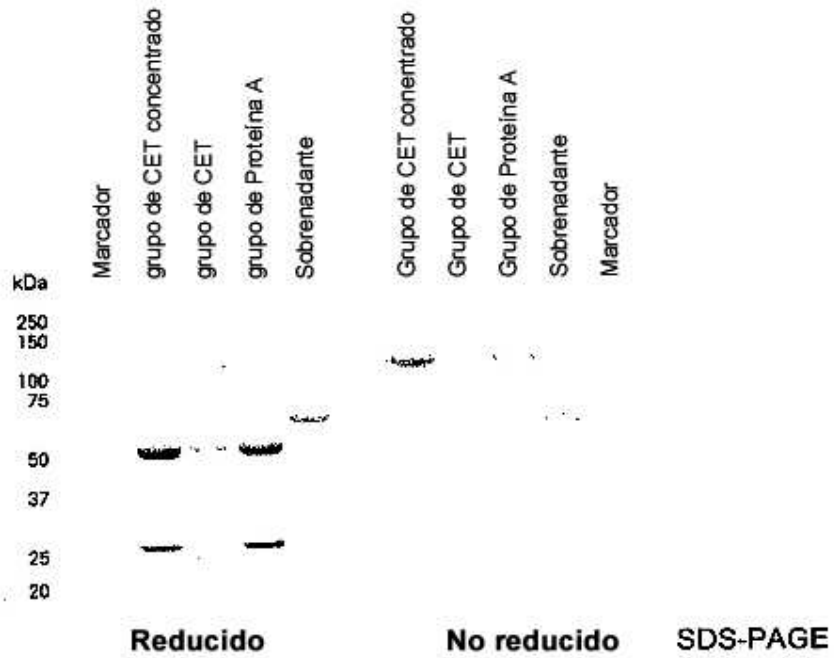


Fig. 15

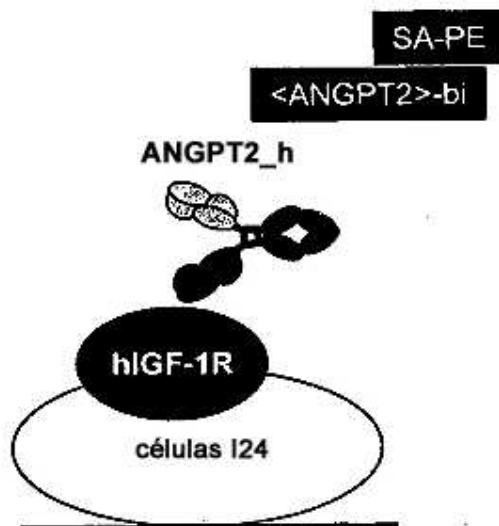


Fig. 16

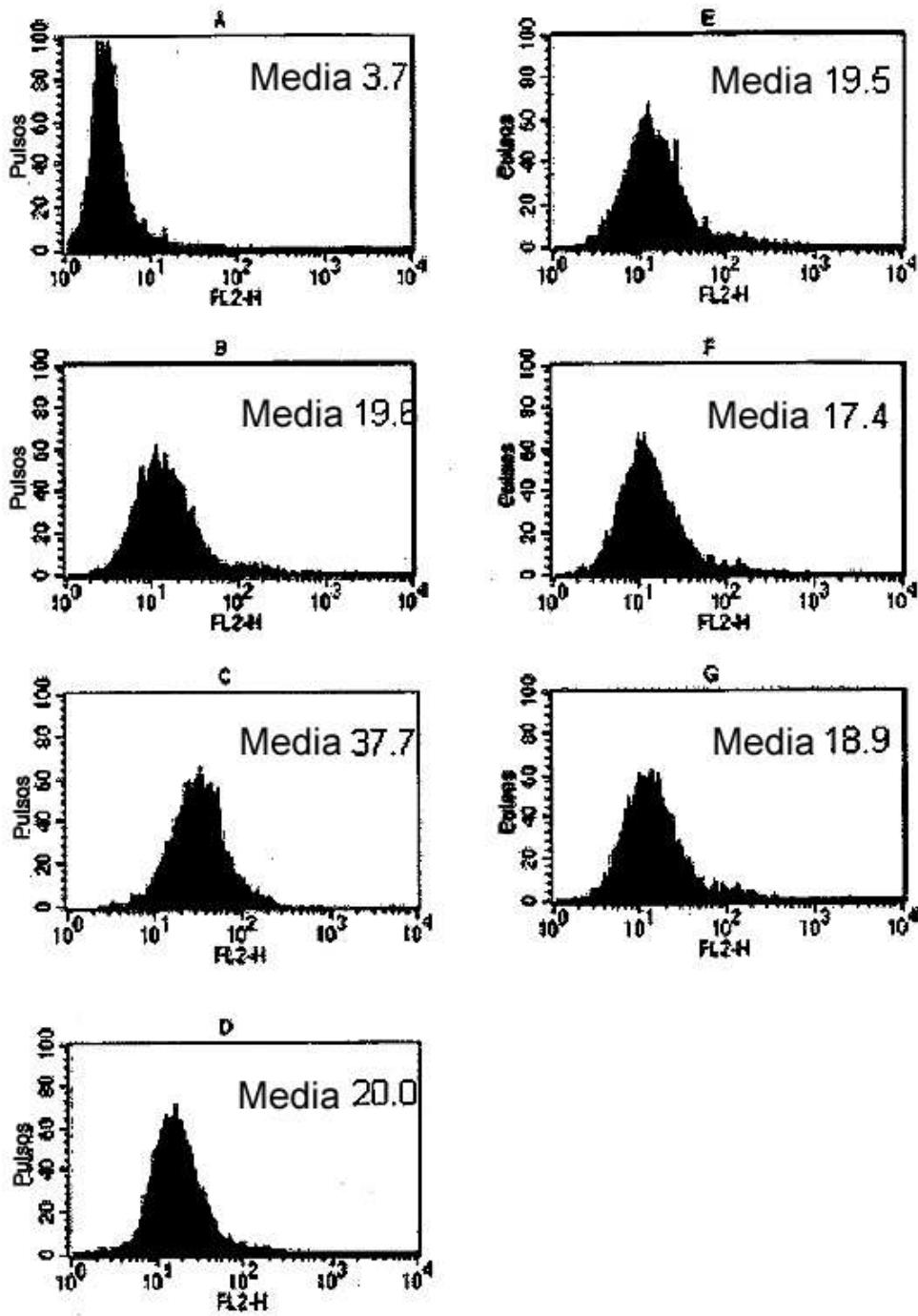


Fig. 17

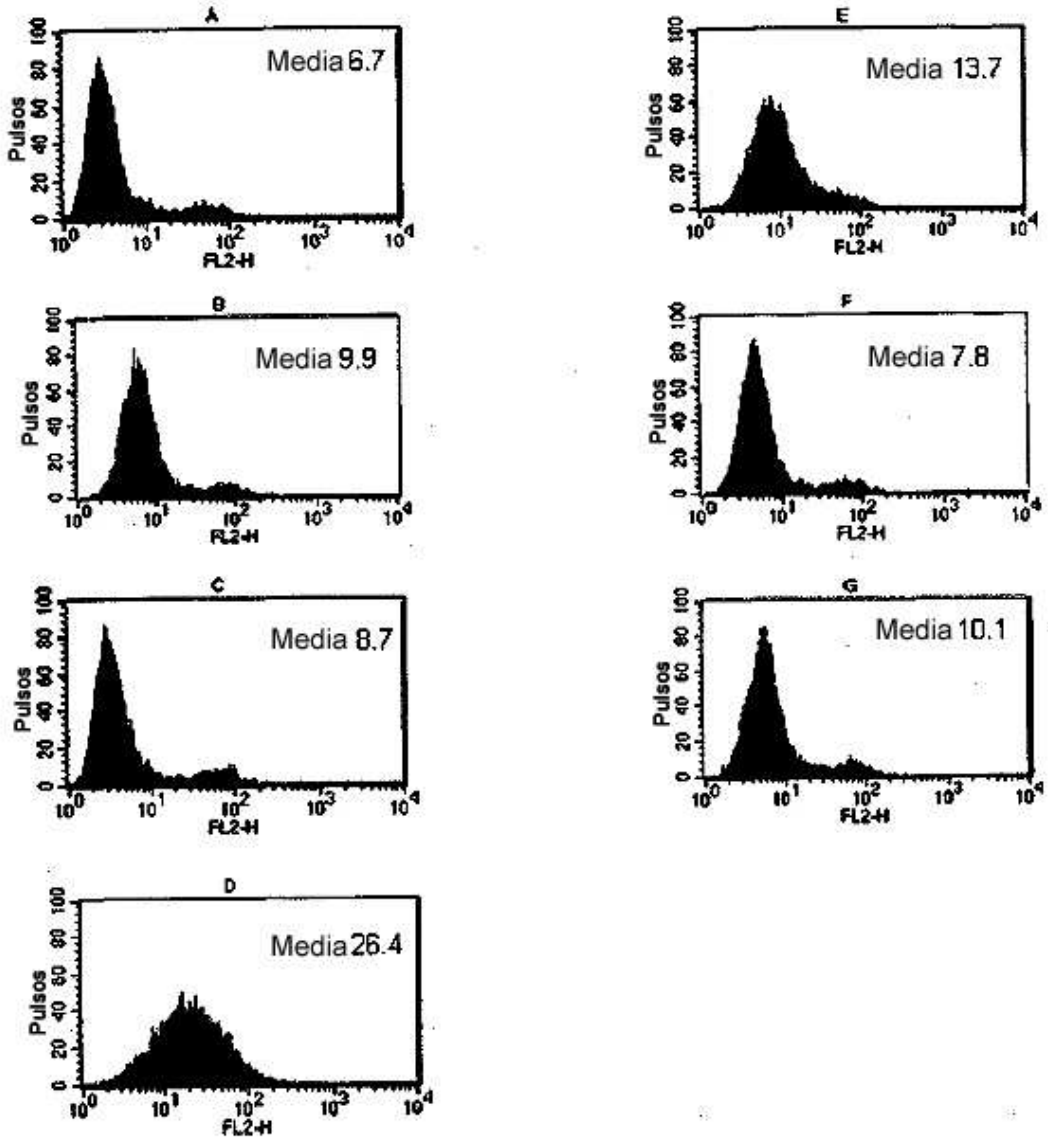


Figura 18

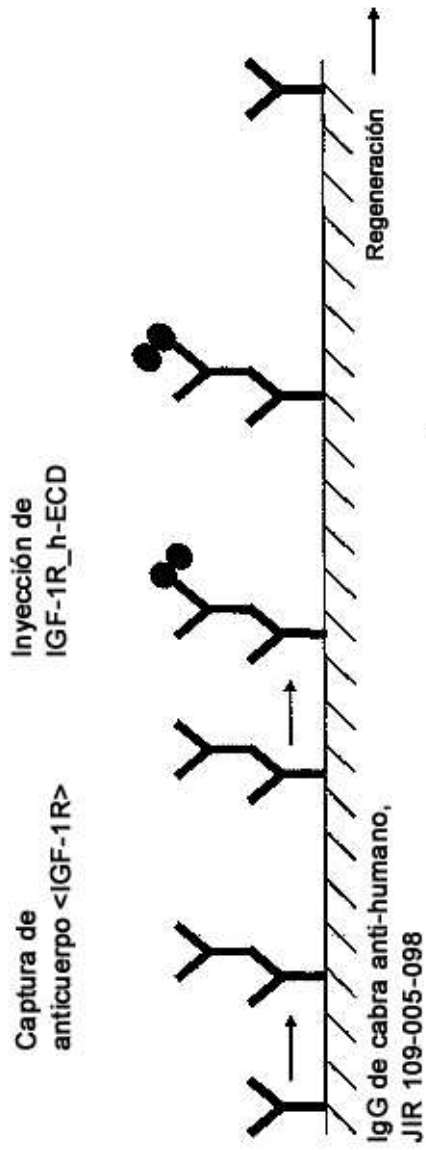


Figura 19

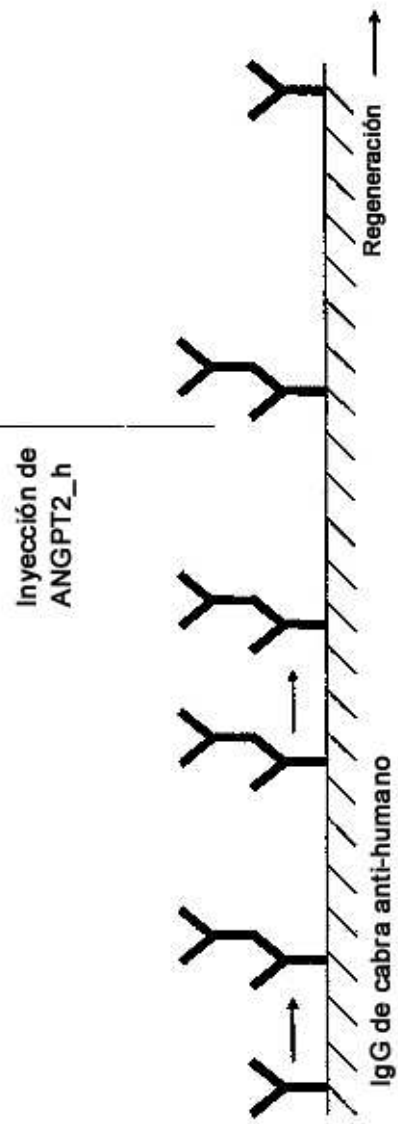


Figura 20

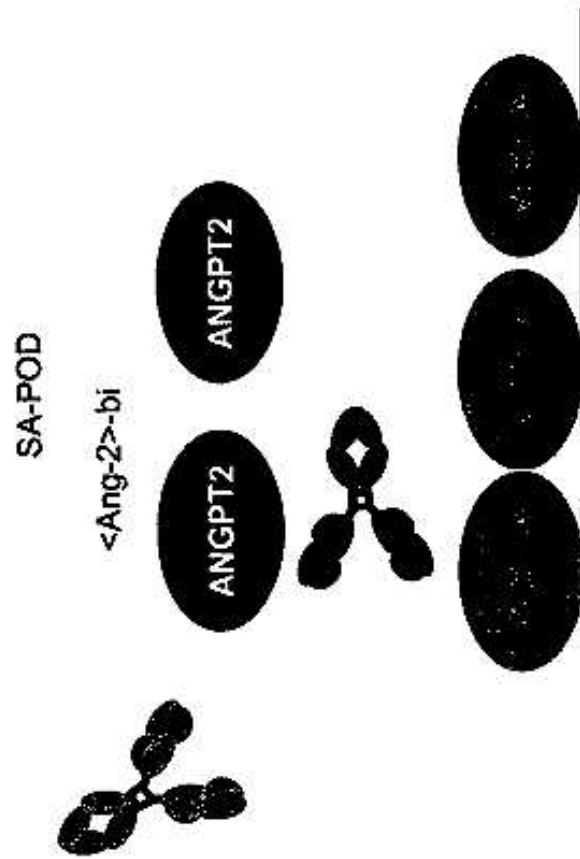


Figura 21

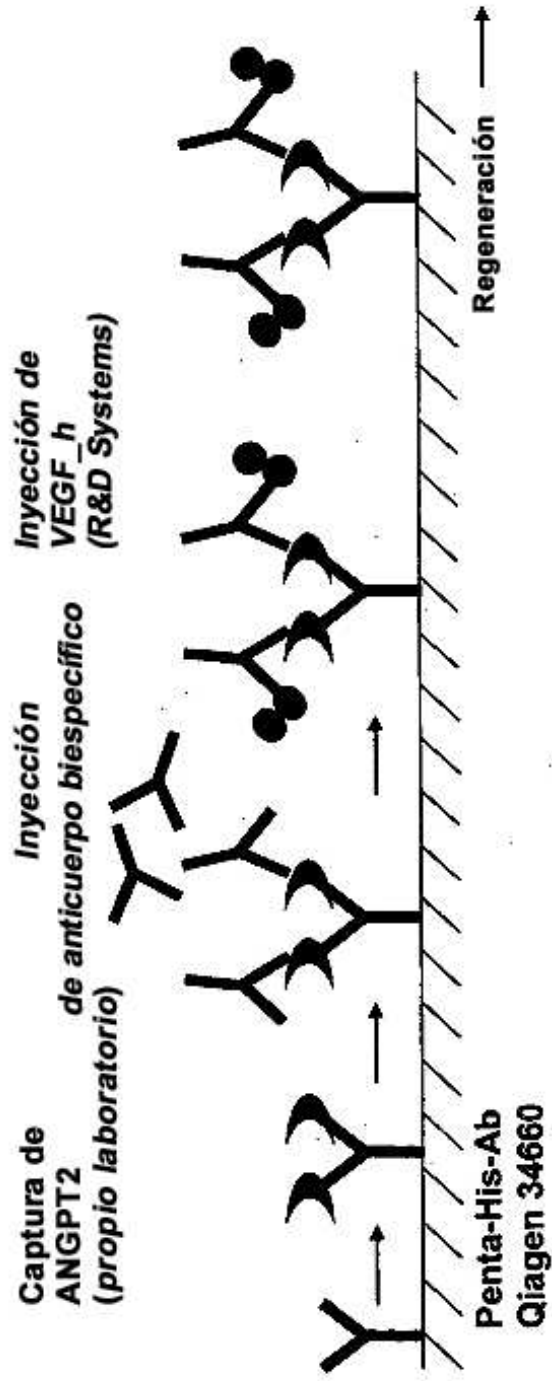
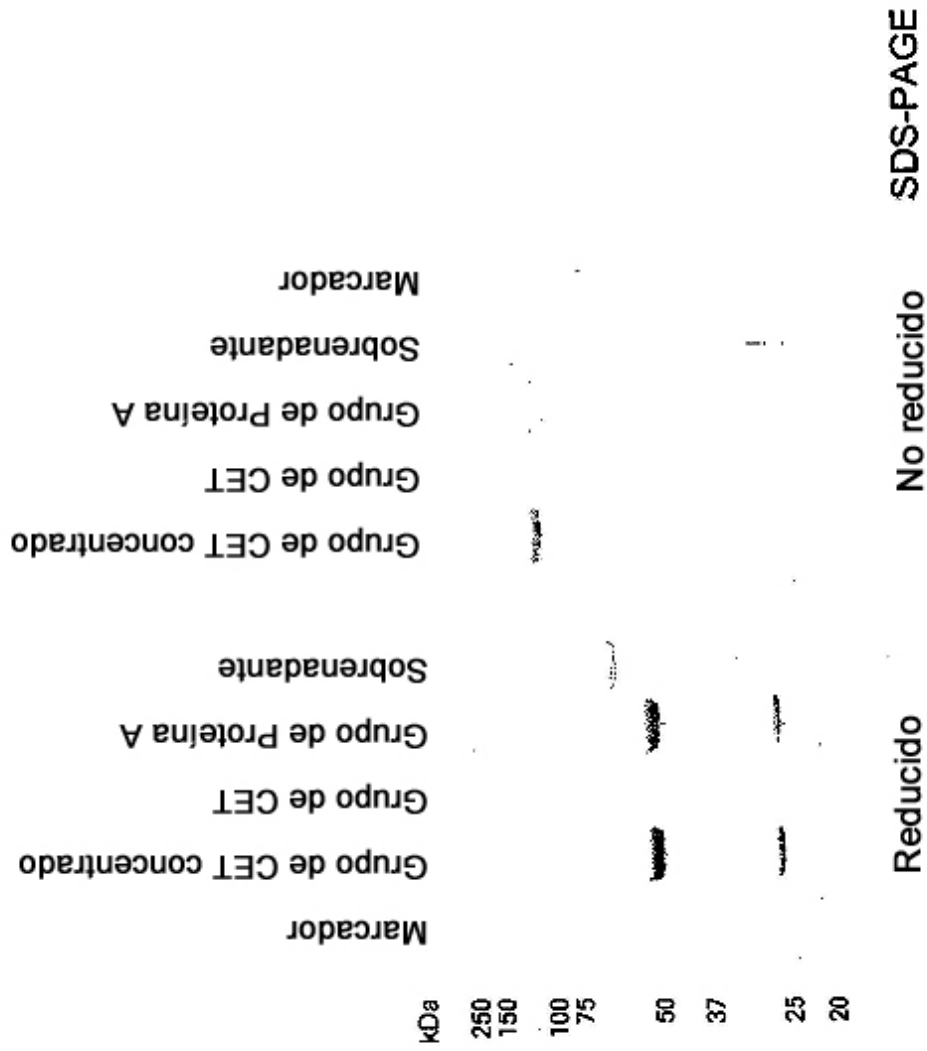


Figura 22

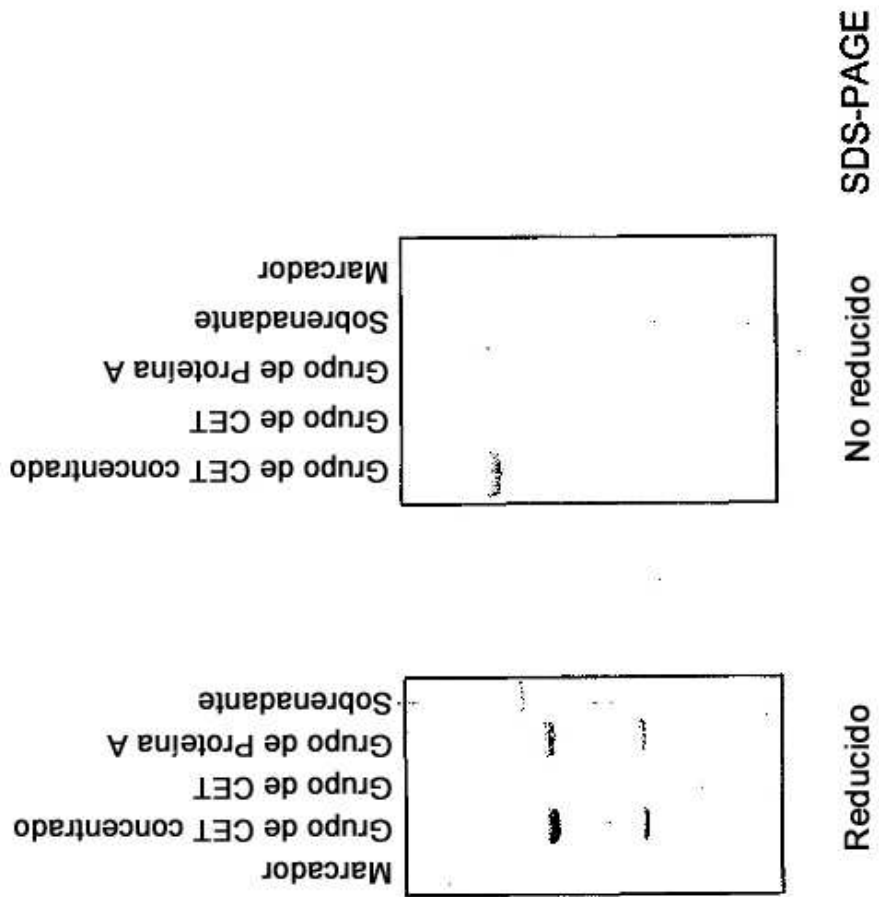


A

Figura 22

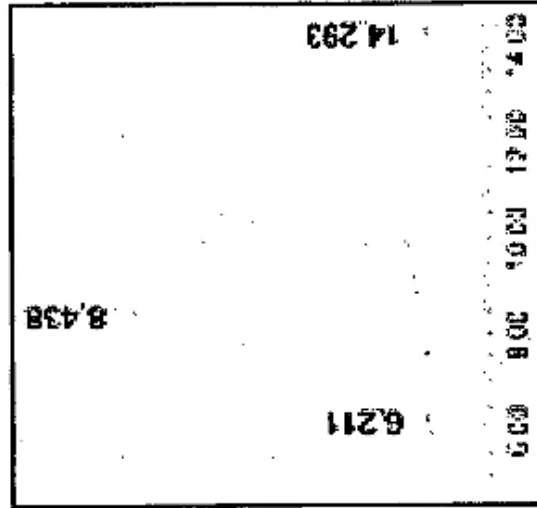


Figura 23



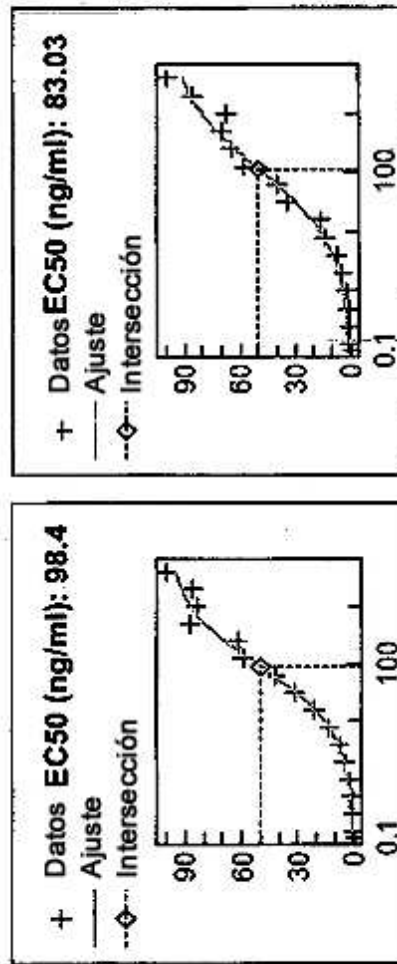
A

Figura 23



B

Figura 24



anticuerpo de intercambio
<ANGPT2> VL-VH/CL-CH1

Anticuerpo <ANGPT2>

Figura 25

Unión del anticuerpo <ANGPT2> a ANGPT2
Unión del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> VL-VH/CL-CH1 a ANGPT2

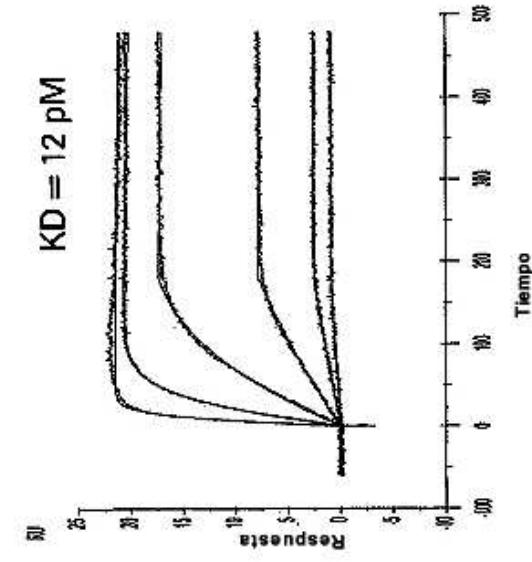
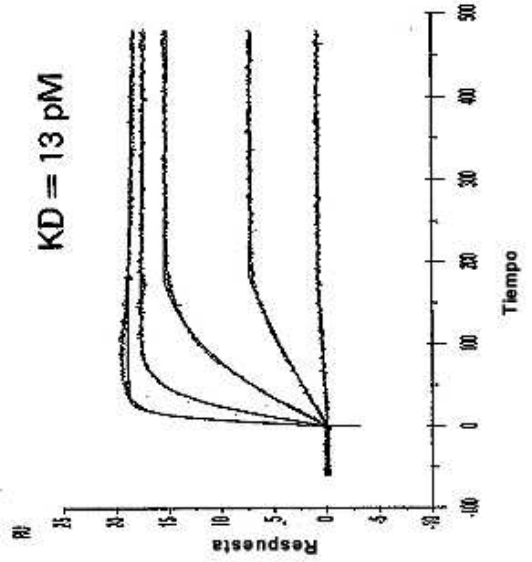


Figura 26

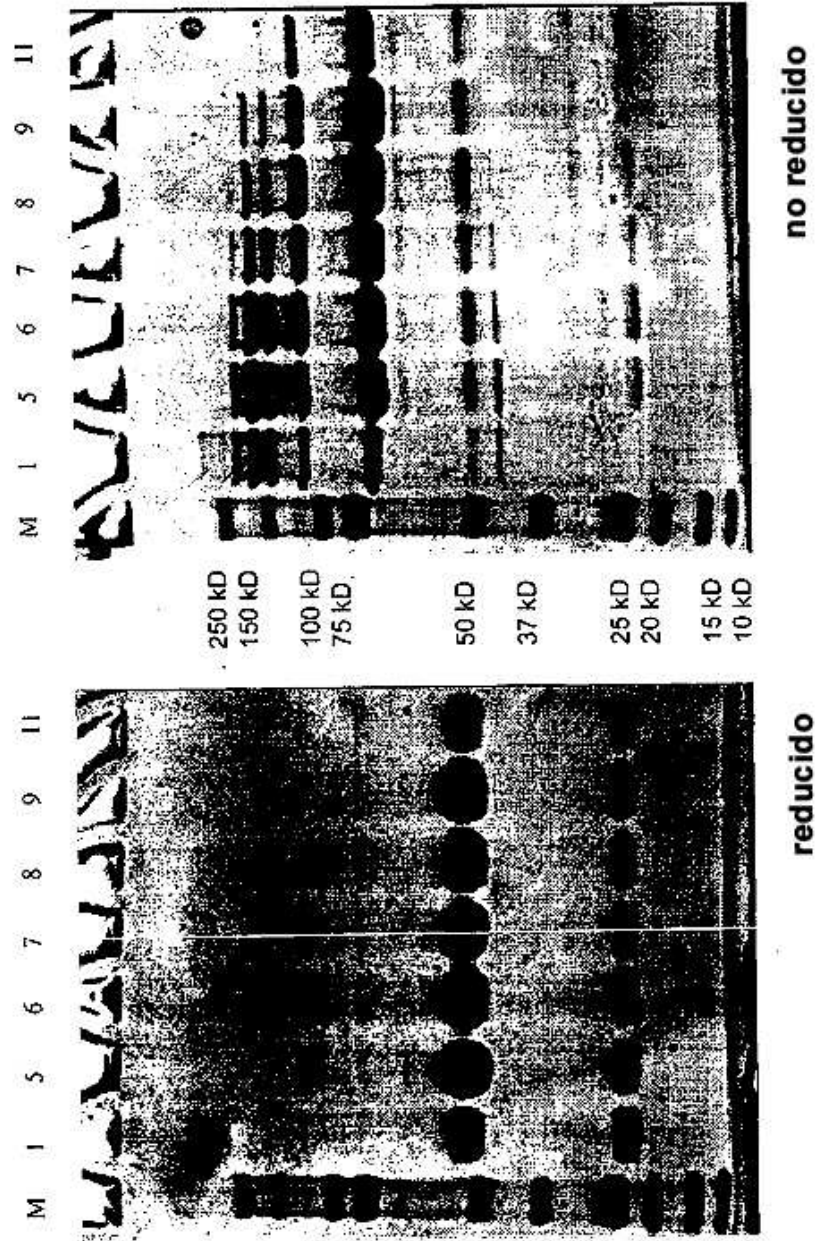


Figura 27

Asignación de bandas en SDS-PAGE mediante espectrometría de masas de las fracciones nativas

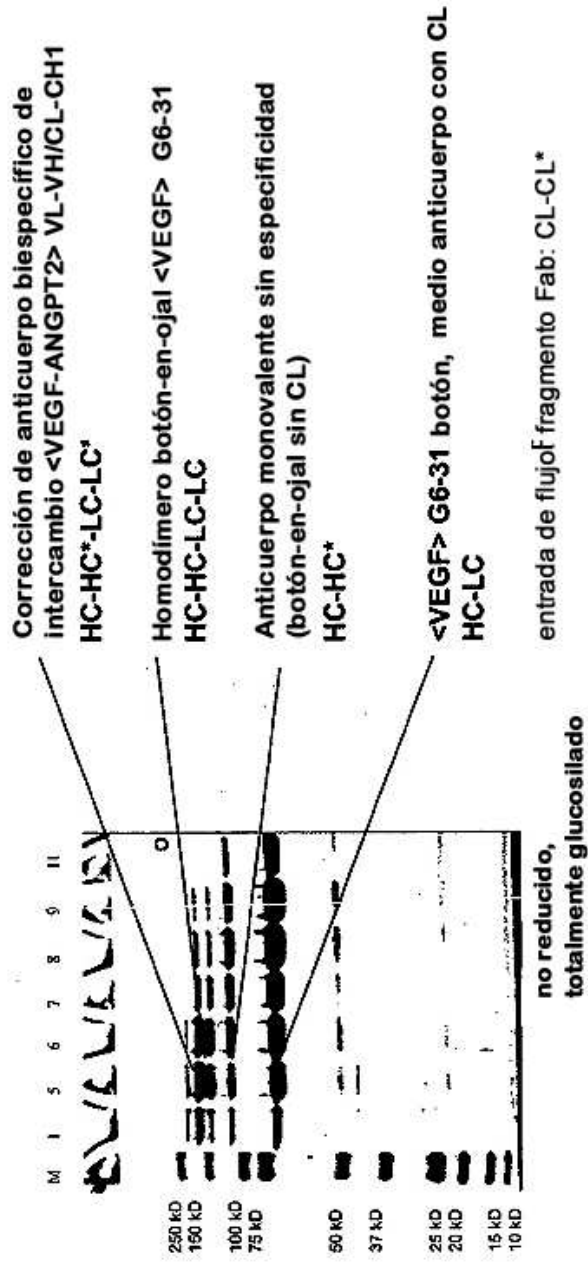


Figura 28

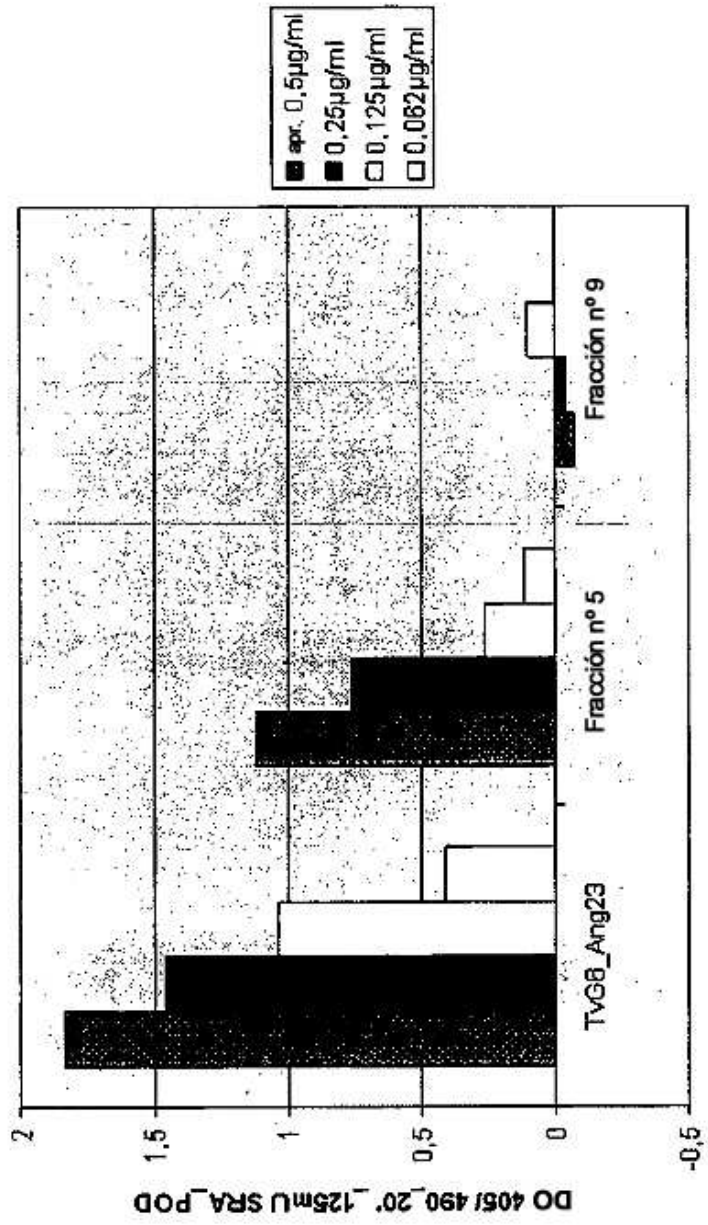


Figura 29

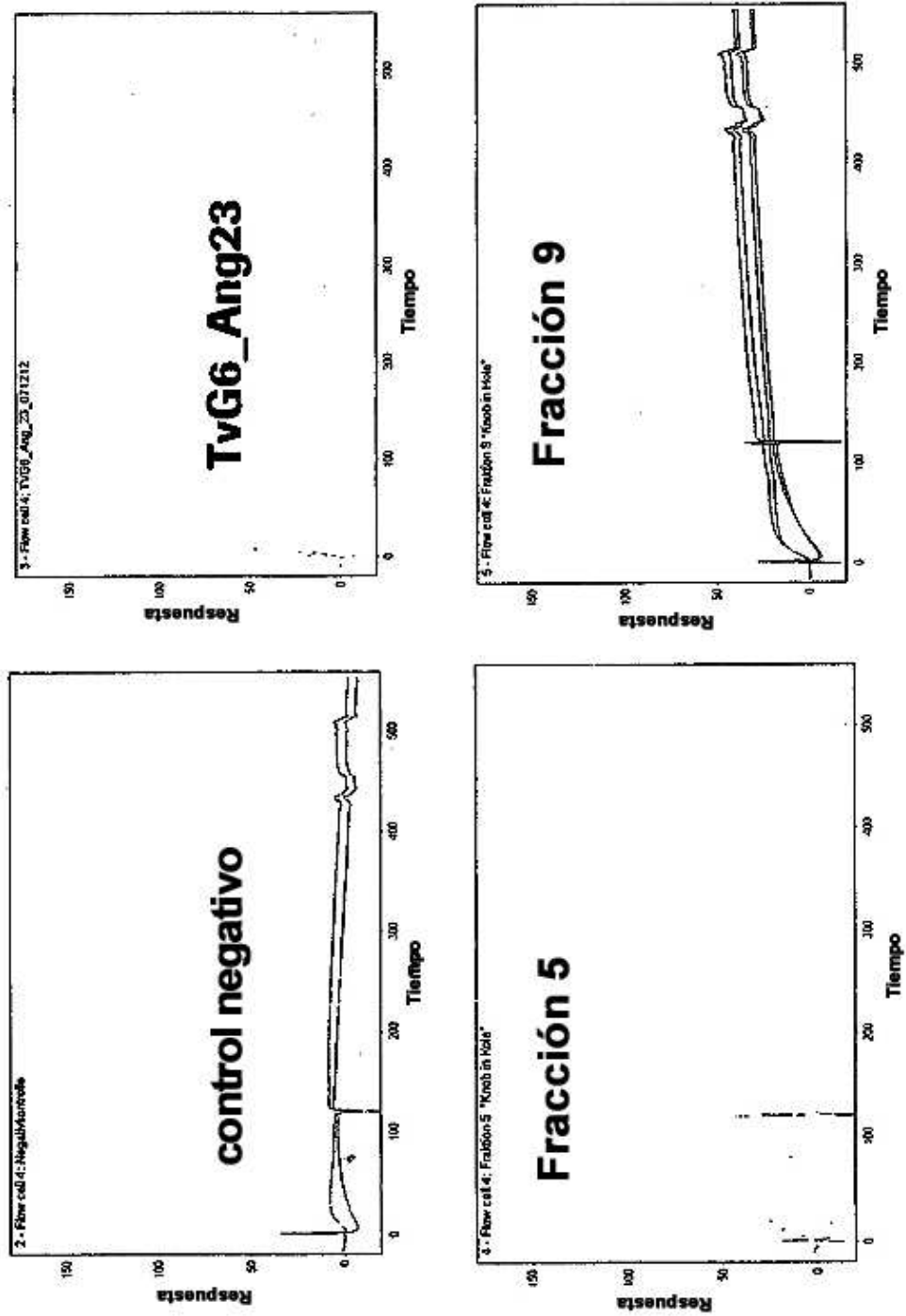


Figura 30

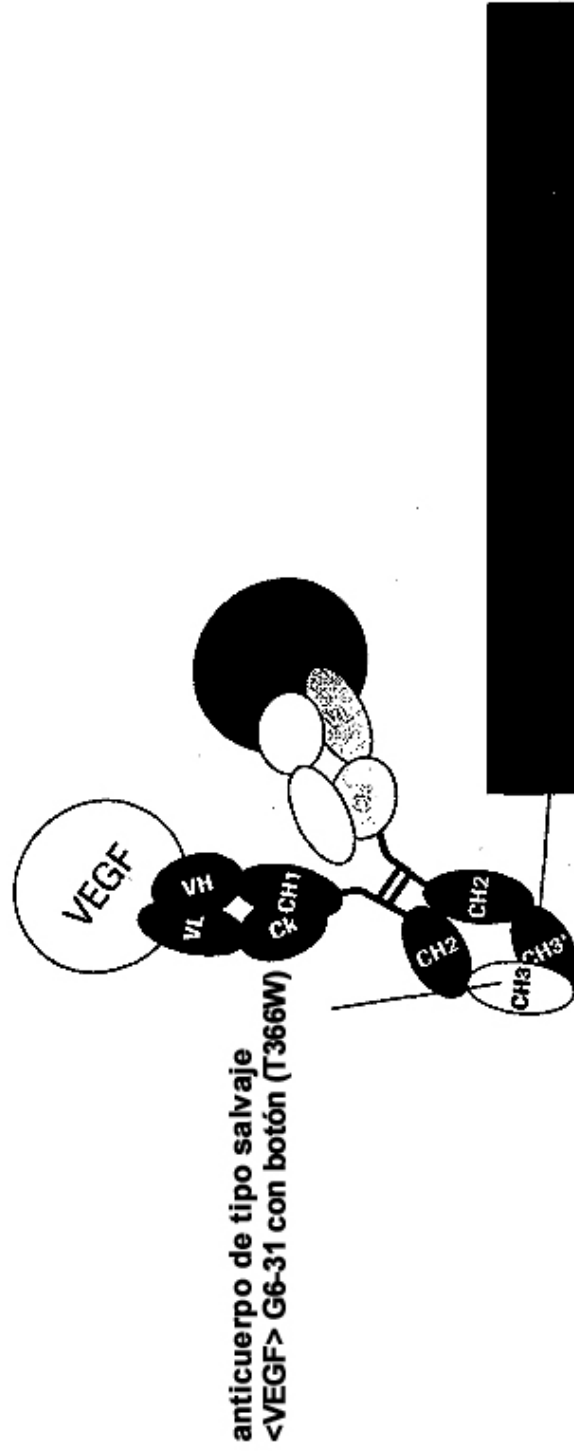


Figura 31

