

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 266**

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 08864822 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2225280**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos bivalentes**

30 Prioridad:

**21.12.2007 EP 07024865**

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

**25.06.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KLEIN, CHRISTIAN y  
SCHÄFER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 471 266 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 la fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (ver, por ejemplo, Coloma M.J., Nature Biotech. 25:1233-1234, 2007; documento nº WO 2001/077342, y Morrison S.L., Nature Biotech. 25:1233-1234, 2007).

20 Además, se han desarrollado algunos otros formatos nuevos en los que ya no se retiene la estructura nuclear del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, minicuerpos, varios formatos de cadena sencilla (scFv, Bis-scFv), que son capaces de unirse a dos o más antígenos (Holliger P. *et al.*, Nature Biotech. 23:1126-1136, 2005; Fischer N. y Léger O., Pathobiology 74:3-14, 2007; Shen J. *et al.*, Journal of Immunological 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 líinker mismo o contra la unión entre la proteína y el líinker. Además, la naturaleza flexible de estos péptidos provoca que presenten una mayor tendencia al corte proteolítico, potencialmente conduciendo a una pobre estabilidad del anticuerpo, a agregación y a una inmunogenicidad incrementada. Además, puede desearse retener funciones efectoras, tales como, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), que se encuentran mediadas a través de la unión de receptores de Fc mediante el mantenimiento de un elevado grado de similitud a anticuerpos naturales.

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

40 En un enfoque, se han producido anticuerpos biespecíficos que son muy similares a los anticuerpos naturales, utilizando la tecnología del cuadroma (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 cuadroma) híbrido resultante, se generan hasta diez especies diferentes de anticuerpo de entre las que únicamente una es el anticuerpo biespecífico funcional deseado. Debido a la presencia de productos secundarios 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 nº WO 1996/027011). El porcentaje de heterodímeros podría incrementarse adicionalmente mediante el remodelaje de las superficies de interacción de los dos dominios CH3 utilizando un enfoque de expresión fágica y la introducción de un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant A.M. *et al.*, Nature Biotech. 16:677-681, 1998; Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P., 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.

Simon T. *et al.*, EMBO Journal 9:1051-1056, 1990, se refiere a mutantes de dominio de anticuerpos monoespecíficos. El documento nº WO 93/06217 da a conocer el acoplamiento de dos fragmentos de anticuerpo monoespecífico o biespecífico utilizando un residuo de cisteína con un tiol libre. El documento nº WO 99/37791 da a conocer la utilización de la interacción CL-CH1 como andamiaje de heterodimerización para constructos de anticuerpo biespecífico o multiespecífico.

### **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 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 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,
- 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, 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,
- 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, 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:

- 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 de unión específica a un segundo antígeno, en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.

Por lo tanto, dicho anticuerpo biespecífico bivalente comprende:

- a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno, y  
 b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, en el que los dominios constantes CL y CH1 de la segunda cadena ligera y de 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 constante de cadena ligera CL se sustituye por el dominio constante de cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo, y dentro de la cadena pesada, el dominio constante de cadena pesada CH1 se sustituye por el dominio constante de cadena ligera CL de dicho anticuerpo.

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  $V_H$ ) 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  $V_L$  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  $V_H$  y  $V_L$  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  $V_H$  y  $V_L$  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.*, 2001). *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:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$  (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 cadenas pesadas difieren en su tamaño y composición;  $\alpha$  y  $\gamma$  contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que  $\mu$  y  $\epsilon$  presentan aproximadamente 550 aminoácidos.

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  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$  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  $\mu$  y  $\epsilon$  presentan una región constante compuesta de cuatro dominios constantes: CH1, CH2, CH3 y CH4 (Janeway C.A. Jr. *et al.*, (2001). *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.

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

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.

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).

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.

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

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

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

La expresión "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos

los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 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  $\beta$  y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de láminas  $\beta$ . Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión 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 ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDRs en cada cadena se encuentran separadas por dichos aminoácidos de marco. En particular, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Los "dominios constantes" de la cadena pesada y de la cadena ligera no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en clases:

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) es de unión específica a un antígeno diferente, es decir, la primera cadena pesada y la primera cadena ligera (originadas 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 es capaz de unirse únicamente a un antígeno y, por otra parte, por ejemplo un anticuerpo tetraespecífico tetravalente puede unirse a cuatro moléculas de antígeno simultáneamente.

Según la invención, la proporción de un anticuerpo biespecífico bivalente en comparación con los 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 CP/CL se origina de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno y se deja esencialmente sin modificación, la segunda de las parejas CP/CL se origina en un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, y se modifica mediante la sustitución siguiente:

- cadena ligera: sustitución del dominio constante de cadena ligera CL por el dominio variable de cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, y
- cadena pesada: sustitución del 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:  
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 de unión específica a un segundo antígeno, en los que dicha cadena ligera (de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno) contiene un dominio constante CH1 en lugar de CL, en el que dicho cadena pesada (de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno) contiene un dominio constante CL en lugar de CH1.

5 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:

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

los dominios CH3 de dicho anticuerpo biespecífico bivalente según la invención pueden alterarse mediante la tecnología de "botón en ojal" que se describe en detalle mediante 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 dicho método, se alteran las superficies de interacción de los dos dominios CH3 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., Ridgway J.B., Wells J.A., J. Mol. Biol. 270:26-35, 1997) e incrementa el rendimiento.

20 Por lo tanto, en una realización preferente, los dominios CH3 de un anticuerpo biespecífico bivalente en los que cada uno de primer dominio CH3 y segundo dominios CH3 se reúne en la interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo, se alteran mediante la tecnología de "botón en ojal", incluyendo la estabilización adicional mediante la introducción de un puente disulfuro en los dominios CH3 (descrita 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., Ridgway J.B., Wells J.A., J. Mol. Biol. 270:26-35, 1997) para estimular la formación del anticuerpo biespecífico bivalente.

30 De esta manera, en un aspecto de la invención, dicho anticuerpo biespecífico bivalente se caracteriza porque cada uno de entre el 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 estimular la formación del anticuerpo biespecífico bivalente, en el que la alteración se caracteriza porque:

35 a) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada, 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, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido con un volumen de cadena lateral mayor, 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

40 b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada, de manera que, dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico bivalente, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido con un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de esta manera una cavidad dentro de la interfaz del segundo dominio CH3 dentro de la cual puede posicionarse una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.

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

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

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

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

o

60 B) Segunda alternativa (ver la figura 4):

mediante la sustitución de un dominio constante de cadena pesada CH3 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. 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). El dominio constante de cadena ligera CL por el que se sustituye el dominio de cadena pesada CH3 puede ser de tipo lambda ( $\lambda$ ) o kappa ( $\kappa$ ), preferentemente del tipo kappa ( $\kappa$ ).

De esta manera, una realización preferente de la invención es 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 constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en el que opcionalmente c) cada uno de entre el 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 se altera cada interfaz para estimular la formación del anticuerpo biespecífico bivalente, en el que la alteración se caracteriza porque:

ca) 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, generando de esta manera una protuberancia en el interior de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que puede posicionarse en una cavidad en el interior de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada, y

cb) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada, de manera que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo 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 posicionarse una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3,

o d)

un dominio constante de cadena pesada CH3 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.

Las expresiones "antígeno" o "molécula de antígeno" tal como se utilizan en la presente memoria se utilizan intercambiamente y se refieren a la totalidad de las moléculas que pueden unirse específicamente a un anticuerpo. El anticuerpo biespecífico bivalente se une específicamente 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, epítomos diferentes 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 los ácidos nucleicos son antigénicos únicamente en combinación con proteínas y polisacáridos. Entre los antígenos exógenos (no autoantígenos) no microbianos pueden incluirse polen, clara de huevo y proteínas procedentes de tejidos y órganos trasplantados o situados sobre la superficie de células sanguíneas trasplantadas. Preferentemente el antígeno se selecciona de entre el grupo que consiste de citoquinas, proteínas de superficie celular, enzimas y receptores de citoquinas, proteínas de superficie celular, enzimas y receptores.

Los antígenos tumorales son aquellos antígenos presentados por moléculas del CMH-I ó CMH-II sobre la superficie de las células tumorales. Estos antígenos en ocasiones pueden ser presentados por las células tumorales y nunca por las células normales. En este caso se denominan antígenos específicos tumorales (AET) y típicamente resultan de una mutación específica de tumor. Son más comunes los antígenos presentados por las células tumorales y las células normales, y se denominan antígenos asociados a tumor (AAT). Los linfocitos T citotóxicos que reconocen dichos antígenos pueden ser capaces de destruir las células tumorales antes de que proliferen o se 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), a los que se une específicamente el anticuerpo biespecífico bivalente, es un antígeno tumoral.

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

En otra realización preferente, uno de los dos antígenos diferentes (el primer y el segundo antígenos), a los 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 (el primer y el segundo antígenos), a los 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.

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

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

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

- 20 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,
  - vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada
- 25 de un anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno, 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.

30 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 la cadena pesada de dicho anticuerpo de unión específica a un segundo antígeno. Uno de los dos vectores codifica 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 un primer

35 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 pueden utilizarse para transformar la célula huésped.

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

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

55 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,
  - 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, en el que los dominios constantes CL y CH1 se
- 60 sustituyen uno por otro.

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

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,

5 b) 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 segundo antígeno, 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.

10 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.

15 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 biespecífico bivalente según la invención.

20 La expresión "ácido nucleico o molécula de ácidos nucleicos", tal como se utiliza 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.

25 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 primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada. En donde se pretendan utilizar denominaciones diferentes, éstas resultarán evidentes a partir del contexto.

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

40 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.* 16:151-161, 2000; Werner R.G. *et al.*, *Arzneimittelforschung* 48:870-880, 1998, así como en las patentes US nº 6.331.415 y nº 4.816.567.

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

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

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

Los anticuerpos bivalentes biespecíficos 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, se insertan ácidos nucleicos codificantes de cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas 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, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o de las 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. Se lleva a cabo la purificación con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo la cromatografía de columna y otras bien conocidas de la técnica. Ver Ausubel F. *et al.*, editor, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and 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; 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, la expresión "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, contiguas y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o *linker* según la práctica convencional.

Se separan convenientemente anticuerpos biespecíficos bivalentes a partir del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfieren 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 nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos. Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones que no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tal como el isotipo y la unión de antígeno del IgG pero que podrían mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

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

#### Listado de secuencias

- SEC ID nº 1**      secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R>
- SEC ID nº 2**      secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje <IGF-1R>
- SEC ID nº 3**      secuencia de aminoácidos de la cadena pesada\*\* (CP\*\*) del anticuerpo de intercambio <IGF-1R>

CL-CH1, en el que el dominio de cadena pesada CH1 se sustituye por el dominio de cadena ligera CL.

- 5      **SEC ID nº 4**      secuencia de aminoácidos de la cadena ligera\*\* (CL\*\*) del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1, en el que el dominio de cadena ligera CL se sustituye por el dominio de cadena pesada CH1.
- 10     **SEC ID nº 5**      secuencia de aminoácidos de la etiqueta péptido de unión His-estreptavidina de ectodominio de IGF-1R (IGF-1R-His-SBP ECD)
- SEC ID nº 6**      secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2>
- SEC ID nº 7**      secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje <ANGPT2>
- 15     **SEC ID nº 8**      secuencia de aminoácidos del dominio CH3 (botón) con un intercambio T366W para la utilización en la tecnología de botón en ojal
- SEC ID nº 9**      secuencia de aminoácidos del dominio CH3 (ojal) con intercambios T366W, L368A e Y407V para la utilización en la tecnología de botón en ojal
- 20     **SEC ID nº 10**     secuencia de aminoácidos de la etiqueta péptido de unión His-estreptavidina de ectodominio de IGF-1R (IGF-1R-His-SBP ECD)

**Descripción de las figuras**

- 25     **Figura 1**          Estructura esquemática de IgG, un anticuerpo completo natural específico de un antígeno con dos parejas de cadena pesada y cadena ligera que comprenden dominios variables y constantes en un orden típico.
- 30     **Figura 2**          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 constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.
- 35     **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 constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en los que los dominios CH3 de ambas cadenas pesadas se alteran mediante la tecnología de botón en ojal.
- 40     **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 constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro, y en los que los dominios CH3 de ambas cadenas pesadas se sustituyen 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.
- 45     **Figura 5**          Esquema de la secuencia de proteína de la cadena pesada\*\* <IGF-1R> CP\*\* del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 (con un dominio constante kappa de cadena ligera CL)
- 50     **Figura 6**          Esquema de la secuencia de proteína de la cadena ligera\*\* <IGF-1R> CL\*\* del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1
- 55     **Figura 7**          Mapa plasmídico del vector de expresión de cadena pesada\*\* <IGF-1R> CP\*\*, pUC-CP\*\*-IGF-1R
- Figura 8**          Mapa plasmídico del vector de expresión de cadena ligera\*\* <IGF-1R> CL\*\*, pUC-CL\*\*-IGF-1R
- Figura 9**          Mapa plasmídico del vector de expresión 4700-Hyg-OriP
- 60     **Figura 10**        Principio de ensayo del ensayo FACS celular de puente de IGF-1R-ANGPT2 sobre células I24 expresantes de IGF-1R para detectar la presencia de anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 funcional

- Figura 11** Esquema de Biacore de ECD de IGF-1R
- 5 **Figura 12** SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño del anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 (IgG1\*\*) con CP\*\* y CL\*\* aislados a partir de sobrenadantes de cultivo celular tras la transfección transitoria de células HEK293-F.
- 10 **Figura 13** Unión de anticuerpo mono específico de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 y del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje al ECD de IGF-1R en un ensayo de unión basado en ELISA.
- Figura 14** SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño de la mezcla de anticuerpos de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 purificada a partir de sobrenadantes de cultivo celular de células HEK293-F transfectadas transitoriamente.
- 15 **Figura 15** Resultados para las muestras A a F del FACS celular de puente de IGF-1R-ANGPT2 sobre células I24 expresantes de IGF-1R para detectar la presencia de anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 funcional en mezcla purificada de anticuerpos: Proteínas purificadas Muestras A a F:  
 A = I24 no tratadas  
 B = I24 + 2 mg/ml de ANGPT2\_h + isotipo de IgG\_h  
 C = I24 + 2 mg/ml de ANGPT2\_h + mezcla de la coexpresión de anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 y anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje que comprende anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1  
 D: no presente  
 E = I24 + 2 mg/ml de ANGPT2\_h + anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje  
 F = I24 + 2 mg/ml de ANGPT2\_h + anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje

## Ejemplos

### 30 Materiales y métodos generales

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

### 40 **Técnicas de ADN recombinante**

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

### 45 **Síntesis génica**

Se prepararon los segmentos génicos deseados a partir de oligonucleótidos construidos mediante síntesis química. Los segmentos génicos de 600 a 1800 pb de longitud, que se encontraban flanqueados por sitios de corte de endonucleasa únicos, se ensamblaron mediante hibridación y ligación de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron mediante los sitios de restricción indicados, por ejemplo KpnI/SacI o AscI/PacI en un vector de clonación pGA4 basado en pPCRScript (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 por Geneart (Regensburg, Alemania).

### 55 **Determinación de la secuencia de ADN**

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

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

Se utilizó el paquete informático versión 10.2 del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) y Vector NTI

Avance suite versión 8.0 de Infomax para la creación, mapeado, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.

### Vectores de expresión

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

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

- 10
- un origen de replicación que permitía la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
  - un gen  $\beta$ -lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

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

- 15
- 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,
  - la cadena de anticuerpo humano (de tipo salvaje o con intercambio de dominios) en forma de ADNc o como

20

  - 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'.

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

30

### Técnicas de cultivo celular

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

35

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.

40

### Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-EBNA

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 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.

45

50

55

### Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

60 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<sub>2</sub>. El día después de transfectar las células a una densidad celular de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml con aproximadamente 42 ml de mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 mg de ADN total de plásmido (1 µg/ml) codificante de la cadena pesada o de la cadena pesada modificada, respectivamente, y la cadena ligera correspondiente en una proporción equimolar, y B) 20 ml de Opti-MEM + 1,2 ml de 293fectina o 293fectina (2 µl/ml). Según el consumo de glucosa, se añadió solución de glucosa durante el curso de la fermentación. Tras 5 a 10 días se recolectó el sobrenadante que contenía el anticuerpo secretado, y los anticuerpos se purificaron directamente del sobrenadante o el sobrenadante se congeló y se almacenó.

#### Determinación de proteínas

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

#### 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<sup>®</sup> LDS (Invitrogen). Se combinó la mitad de la muestra con agente reductor de muestras NuPAGE<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> al 4-12% (Invitrogen) (con tampón MOPS para SDS-PAGE no reducido y tampón MES con aditivo antioxidante de tampón de migración NuPAGE<sup>®</sup> (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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 µl/pocillo de molécula de captura biotinilada anti-IgG humana F(ab')<sub>2</sub><h-Fcγ> BI (Dianova) a una concentración de 0,1 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente, o alternativamente durante la noche a 4°C y posteriormente se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBS, Tween al 0,05% (PBST, Sigma). Se añadieron 100 µl/pocillo de una serie de dilución en PBS (Sigma) de sobrenadantes de cultivo celular que contenían el anticuerpo respectivo, a los pocillos y se incubaron durante 1 a 2 horas en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo unido se detectó con 100 µl de F(ab')<sub>2</sub><h-Fcγ>POD (Dianova) a una concentración de 0,1 µg/ml como anticuerpo de detección durante 1 a 2 horas en un agitador para placas de microtitulación a temperatura ambiente. Se lavó el anticuerpo de detección no unido, tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia: 492 nm).

#### Purificación de proteínas

Se purificaron proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados siguiendo protocolos estándares. Brevemente, se aplicaron anticuerpos 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.

## 5 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

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, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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

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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 hidrócloruro 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.

## 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 10. 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. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo unido se detectó con 100 µl/pocillo de F(ab')<sub>2</sub><hFcy>POD (Dianova) a una concentración de 0,1 µg/ml (1:8.000) 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

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. La figura 11 muestra un esquema del ensayo Biacore.

**Ejemplo 1**

Producción, expresión, purificación y caracterización de anticuerpo monoespecífico bivalente <IGF-1R>, en el que los dominios variables CL y CH1 se sustituyen uno por otro (abreviado en la presente memoria como anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1).

**Ejemplo 1A**

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

Las secuencias de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoespecífico bivalente de intercambio <IGF-1R> CL-CH1, incluyendo las secuencias líder respectivas indicadas en el presente ejemplo, se derivaron de la cadena pesada del anticuerpo <IGF1R> humano (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 derivan de un anticuerpo humano (C-kappa e IgG1).

Los segmentos génicos codificantes de la secuencia líder del anticuerpo <IGF-1R>, dominio variable de cadena pesada (VH) 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  $\gamma 1$  humana (Bisagra-CH2-CH3). El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio del dominio CH1 por el dominio CL (intercambio CH1-CL) se generó mediante síntesis génica y se indica como <IGF1R> CP\*\* (SEC ID nº 3) a continuación.

Los segmentos génicos de la secuencia líder del anticuerpo <IGF-1R>, dominio variable de cadena ligera (VL) y el dominio constante de la cadena pesada  $\gamma 1$  humana (CH1) se unieron como cadena independiente. El ADN codificante de la proteína de fusión respectiva resultante del intercambio del dominio CL por el dominio CH1 (intercambio CL-CH1) se generó mediante síntesis génica y se indica como <IGF1R> CL\*\* (SEC ID nº 4) a continuación.

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.

A continuación se describen brevemente los vectores de expresión respectivos:

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

El vector 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.

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  $\beta$ -lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

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,
- una secuencia de señal de cadena ligera de inmunoglobulina,
- la cadena CP\*\* madura de <IGF-1R> humana codificante de una fusión del dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) 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  $\gamma 1$  humana (Bisagra-CH2-CH3).
- una región 3' no traducida con una secuencia de señal de poliadenilación, y

- el sitio de restricción único SgrAI en el extremo 3'.

El mapa plasmídico del vector de expresión de <IGF-1R> de intercambio CL-CH1 cadena pesada\*\* CP\*\*, 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 pUC-CL\*\*-IGF-1R

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

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  $\beta$ -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,
- 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 ligera (V<sub>L</sub>) humana y los dominios constantes de la cadena pesada  $\gamma$ 1 (CH1) humana.
- una región 3' no traducida con una secuencia de señal de poliadenilación, y
- los sitios de restricción Sall y FseI en el extremo 3'.

El mapa plasmídico del vector de expresión pUC-CL\*\*-IGF-1R del anticuerpo de intercambio de cadena ligera\*\* <IGF-1R> CL-CH1, 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.

Los plásmidos pUC-CP\*\*-IGF-1R y 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 del plásmido 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.

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:

- un elemento OriP, y
- un gen de resistencia a la higromicina como marcador seleccionable.

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**

Construcción de los plásmidos de expresión para el anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <IGF-1R> CL-CH1

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.

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 pPCRScripT (Stratagene) en Geneart (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 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 pUC-CL\*\*-IGF-1R. Las secuencias

subclonadas de ácidos nucleicos se verificaron mediante secuenciación del ADN. Para 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).

## 5 **Ejemplo 1C**

Expresión transitoria de anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <IGF-1R> CL-CH1, purificación y confirmación de la identidad mediante espectrometría de masas

10 Se expresó el anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 recombinante mediante cotransfección transitoria de los plásmidos pUC-CP\*\*-IGF-1R y pUC-CL\*\*-IGF-1R en células HEK293-F en suspensión tal como se ha indicado anteriormente.

15 El anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 expresado y secretado se purificó a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados, mediante cromatografía de afinidad de proteína A tal como se ha indicado anteriormente. Brevemente, los sobrenadantes de cultivo celular que contenían el anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 de transfecciones transitorias se clarificaron mediante centrifugación y filtración y se aplicaron a una columna de proteína A HiTrap MabSelect Xtra (GE Healthcare) equilibrada con tampón PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 se llevó a cabo 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> CL-CH1 se congeló y se almacenó a -20°C ó a -80°C. Se analizó la integridad del intercambio <IGF-1R> 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 ha indicado anteriormente. El estado monomérico del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 se confirmó mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (figura 12). 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 <IGF-1R> CL-CH1 completamente desglucosilado.

## 35 **Ejemplo 1D**

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

40 Se evaluaron las propiedades de unión del anticuerpo mono-específico bivalente de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 en un ensayo ELISA con el dominio extracelular (ECD) de IGF-1R tal como se ha indicado anteriormente. 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: ver anteriormente. La curva de titulación obtenida demostró que el anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 era funcional y mostraba características de unión y cinéticas comparables a las del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje y, de esta manera, dentro del error del método, aparentemente era completamente funcional (figura 13).

50 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> CL-CH1 con un valor de  $K_D$  de 3,7 pM, presentaba una afinidad y cinética de unión para ECD de IGF-1R comparables a las del anticuerpo original de tipo salvaje <IGF-1R>, con un valor  $K_D$  de 3,2 nM.

## 55 **Ejemplo 1G**

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

60 Con el fin de confirmar la actividad de unión de <IGF-1R> CL-CH1 a IGF-1R sobreexpresado sobre la superficie de células I24 (células NIH3T3 que expresan IGF-1R humana recombinante, Roche) se estudió mediante FACS. Brevemente, se incubaron  $5 \times 10^5$  células I24 por cada tubo de FACS con una dilución de anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 y anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje como referencia, y se incubaron sobre hielo durante 1 h.

Se eliminó mediante lavado 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')<sub>2</sub> <Fcy\_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> CL-CH1 y el anticuerpo de referencia <IGF-1R> de tipo salvaje a IGF-1R sobre células I24 resultó en un desplazamiento comparable de la intensidad de fluorescencia media dependiente de la concentración.

### **Ejemplo 2:**

Descripción de un anticuerpo mono específico bivalente <ANGPT2> de tipo salvaje

### **Ejemplo 2A**

Construcción de los plásmidos de expresión para el anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <ANGPT2> de tipo salvaje

Las secuencias de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo mono específico bivalente de intercambio <ANGPT2> de tipo salvaje, incluyendo las secuencias líder respectivas indicadas en el presente ejemplo, se derivan 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 derivan de un anticuerpo humano (C-kappa e IgG1).

El anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje se clonó en los plásmidos SB04-pUC-CP-ANGPT2 (SEC ID n° 6) y SB06-pUC-CL-ANGPT2 (SEC ID n° 7) que son análogos a los vectores descritos en el ejemplo anterior, 1A.

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 SB04-pUC-CP-ANGPT2 y SB06-pUC-CL-ANGPT2.

### **Ejemplo 2B**

Construcción de los plásmidos de expresión para el anticuerpo mono específico bivalente <ANGPT2> de tipo salvaje

Cada una de las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de CP y CL de <ANGPT2> se sintetizaron mediante síntesis química y posteriormente se clonaron en un vector de clonación pGA4 basado en pPCRScript (Stratagene) en Geneart (Regensburg, Alemania). El casete de expresión codificante de CP de <ANGPT2> se clonó en el plásmido de *E. coli* respectivo, resultando en el vector final SB04-pUC-CP-ANGPT2; el casete de expresión codificante de CL de <ANGPT2> respectivo se clonó en el plásmido de *E. coli* respectivo, resultando en el vector final SB06-pUC-CL-ANGPT2. Las secuencias subclonadas de ácidos nucleicos se verificaron mediante secuenciación del ADN. Para las transfecciones y estables transitorias, se prepararon cantidades mayores de los plásmidos mediante preparación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

### **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 constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro (abreviadamente en la presente memoria, anticuerpo de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1)

### **Ejemplo 3A**

Coexpresión transitoria y purificación del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 y del anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje en células HEK293 EBNA, que rinde el anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1

Con el fin de generar un anticuerpo biespecífico funcional que reconociese IGF-1R mediante la región Fab del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 en un lado y <ANGPT2> mediante la región Fab del anticuerpo de intercambio <ANGPT2> de tipo salvaje, por el otro lado, se coexpresaron los dos plásmidos de expresión codificantes del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 (Ejemplo 1A) con dos plásmidos de expresión codificantes del anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje (Ejemplo 2A). Bajo la premisa de una asociación estadística

entre las cadenas pesadas de tipo salvaje y las cadenas pesadas CP\*\* de intercambio CL-CH1, lo anterior resulta en la generación del anticuerpo biespecífico y bivalente de intercambio <IGF-1R-ANGPT2> CL-CH1. Bajo la premisa de que ambos anticuerpos se expresan igualmente bien y sin considerar productos secundarios, lo anterior debería resultar en una proporción 1:2:1 de los tres productos principales: A) anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <IGF-1R-ANGPT2> CL-CH1, y C) anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje. Pueden esperarse varios productos secundarios. Sin embargo, debido al intercambio de sólo los dominios CL-CH, la frecuencia de productos secundarios debería reducirse en comparación con el entrecruzamiento de Fab completo. Observar que, debido a que el anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje mostraba rendimientos de expresión transitoria significativamente más altos que los anticuerpos <IGF-1R> de tipo salvaje y de intercambio <IGF-1R> CL-CH1, la proporción de plásmidos de anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje y los plásmidos de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 se encontraba desplazada en favor de la expresión del anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje.

Para generar la mezcla de los productos principales A) anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1, y C) anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje, los cuatro plásmidos, pUC-CP\*\*-IGF-1R y pUC-CL\*\*-IGF-1R, y SB04-pUC-CP-ANGPT2 y SB06-pUC-CL-ANGPT2, se cotransfectaron transitoriamente en células HEK293-F en suspensión tal como se ha indicado anteriormente. El sobrenadante recolectado contenía una mezcla de los productos principales: A) anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1, y C) anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje y se indica como "mezcla biespecífica de intercambio CL-CH1". Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían la mezcla de anticuerpo biespecífico de intercambio CL-CH1 se recolectaron mediante centrifugación y posteriormente se centrifugaron tal como se ha indicado anteriormente. Figura 14

La integridad de la mezcla de anticuerpos se analizó mediante SDS-PAGE en presencia y en ausencia de un agente reductor y posterior tinción con azul de Coomassie brillante, tal como se ha indicado. El SDS-PAGE demostró la presencia de 2 cadenas pesada y ligera diferentes en la preparación, tal como se esperaba (gel reducido). Se confirmó el estado monomérico de la mezcla de anticuerpos mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño y se demostró que la especie de anticuerpo purificada se encontraba en estado monomérico. Se proporcionaron muestras caracterizadas para el análisis proteico y caracterización funcional posteriores.

### **Ejemplo 3B**

#### **Detección de anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> 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> CL-CH1 funcional en la mezcla biespecífica de intercambio CL-CH1 purificada de los productos principales A) anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1, B) anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 y C) anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje procedentes de la coexpresión transitoria indicada 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 figura 10. Un anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 que se encuentra presente en la mezcla de anticuerpos purificada 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 con las dos regiones Fab opuestas.

Brevemente, se incubaron  $5 \times 10^5$  células I24 por cada tubo de FACS con mezcla de anticuerpos purificada total y se incubaron sobre hielo durante 1 h (titulación: mezcla de 160 mg/ml). Los anticuerpos purificados respectivos <IGF-1R> y <ANGPT2> de tipo salvaje se aplicaron a las células I24 a modo de controles. Se lavó 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 ANGPT2 no ligada se eliminó mediante lavado una o dos veces con 4 ml de PBS helado (Gibco) + FCS al 2% (Gibco); las células se centrifugaron (5 min a 400g) y la ANGPT2 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 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 mono-específicos bivalentes IgG1 purificados <IGF1R> y <ANGPT2>.

Los resultados en la fig. 15 demuestran que la incubación con la mezcla purificada de anticuerpos entrecruzados (anticuerpo de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1) de la coexpresión de un anticuerpo entrecruzado (anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1) con un anticuerpo de tipo salvaje (anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje) resultó en un desplazamiento significativo de la fluorescencia, indicando la presencia de un anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 funcional que era capaz de unión a IGF-1R en células I24 y a ANGPT2 simultáneamente, y de esta manera establece un puente entre sus dos antígenos diana y las dos regiones Fab opuestas. En contraste con lo anterior, los anticuerpos de control respectivos <IGF-1R> y <Ang-2> no resultó en un desplazamiento de la fluorescencia en el ensayo FACS de puente.

Conjuntamente estos datos demuestran que, mediante la coexpresión de los plásmidos de tipo salvaje y entrecruzados respectivos, pueden generarse anticuerpos biespecíficos funcionales. Los rendimientos de anticuerpo biespecífico correcto pueden incrementarse forzando la correcta heterodimerización de las cadenas pesadas de tipo salvaje y entrecruzada modificada, por ejemplo utilizando la tecnología de botón en ojal, así como la estabilización con disulfuros (ver los Ejemplos 4).

#### **Ejemplo 4**

##### Expresión de anticuerpo biespecífico bivalente de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 con dominios CH3 modificados (botones-en-ojales)

Para mejorar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo biespecífico de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1, se aplicó la tecnología de botón en ojal a la coexpresión de los anticuerpos de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 y <ANGPT2> de tipo salvaje con el fin de obtener una preparación homogénea y funcional de anticuerpos biespecíficos. Con este fin se sustituyó el dominio CH3 en la cadena pesada\* CP\* del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1 por el dominio CH3 (botón) de SEC ID nº 8 con un intercambio T366W y el dominio CH3 en la cadena pesada del anticuerpo <ANGPT2> de tipo salvaje se sustituyó por el dominio CH3 (ojal) de SEC ID nº 9 con un intercambio T366S, L368A, Y407V, o viceversa. Además, puede incluirse un disulfuro para incrementar la estabilidad y los rendimientos, así como residuos adicionales que forman puentes iónicos e incrementar los rendimientos de heterodimerización (documento nº EP 1870459A1).

La coexpresión transitoria y la purificación del anticuerpo biespecífico bivalente de intercambio <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1 resultante con dominios CH3 modificados (botones en ojales) se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 3.

Debe indicarse que puede conseguirse una optimización de la heterodimerización por ejemplo mediante la utilización de tecnologías de botón en ojal diferentes, tal 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.

Análogamente al Ejemplo 4, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos bivalentes de intercambio CH1-CL con dominios CH3 modificados (botones en ojales) dirigidos contra ANGPT2 y otro antígeno diana (utilizando las cadenas pesada y ligera de ANGPT2 anteriormente indicadas y las cadenas pesada y ligera\*\* de intercambio CH1-CL CP\*\* y CL\*\* de un anticuerpo dirigido contra otra diana, de manera que ambas cadenas pesadas son modificadas mediante "botones en ojales"), o dirigidos contra IGF-1R y otra diana (utilizando las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo dirigido contra dicha otra diana y las cadenas pesada y ligera\*\* de intercambio de IGF-1R CH1-CL anteriormente indicadas CP\*\* y CL\*\*, en las que ambas cadenas pesadas se modifican mediante técnicas de "botón en ojal").

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Anticuerpos biespecíficos bivalentes

<130> 24679 EP

<150> EP 07024865

<151> 2007-12-21

<160> 10

ES 2 471 266 T3

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 467

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo <IGF-1R> de tipo salvaje

<400> 1

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 2 471 266 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 2 471 266 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

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

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

<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

ES 2 471 266 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> 471

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 3

ES 2 471 266 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

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

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

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

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

ES 2 471 266 T3

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

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

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

Arg Gly Glu 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  
 325 330 335

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

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

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

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

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

ES 2 471 266 T3

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 4

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 4

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

ES 2 471 266 T3

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 225 230

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

<220>  
 10 <223> secuencia de aminoácidos de la etiqueta péptido de unión His-estreptavidina del ectodominio de IGF-1R (IGF-1R-His-SBP ECD)

<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 2 471 266 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

ES 2 471 266 T3

			260						265							270
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	

ES 2 471 266 T3

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

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> secuencia 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

ES 2 471 266 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 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

ES 2 471 266 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 7  
 <211> 219  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de tipo salvaje de la angiopoyetina-2  
 <ANGPT2>

<400> 7

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

ES 2 471 266 T3

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

<210> 8  
 <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> 8

ES 2 471 266 T3

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

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> 9

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

10

<400> 9

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

ES 2 471 266 T3

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

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> 10

<211> 557

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

10

<400> 10

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

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

ES 2 471 266 T3

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

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

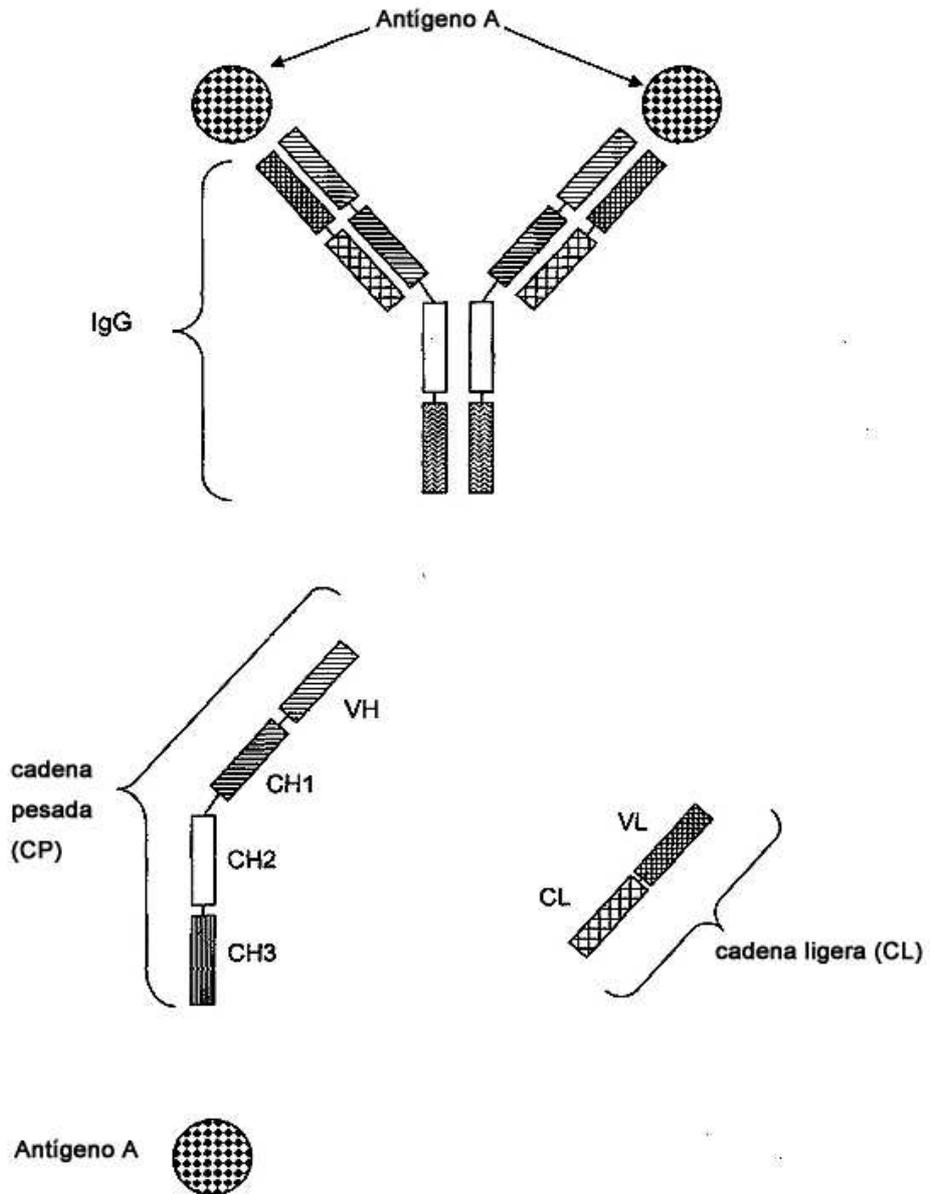
ES 2 471 266 T3

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  
 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

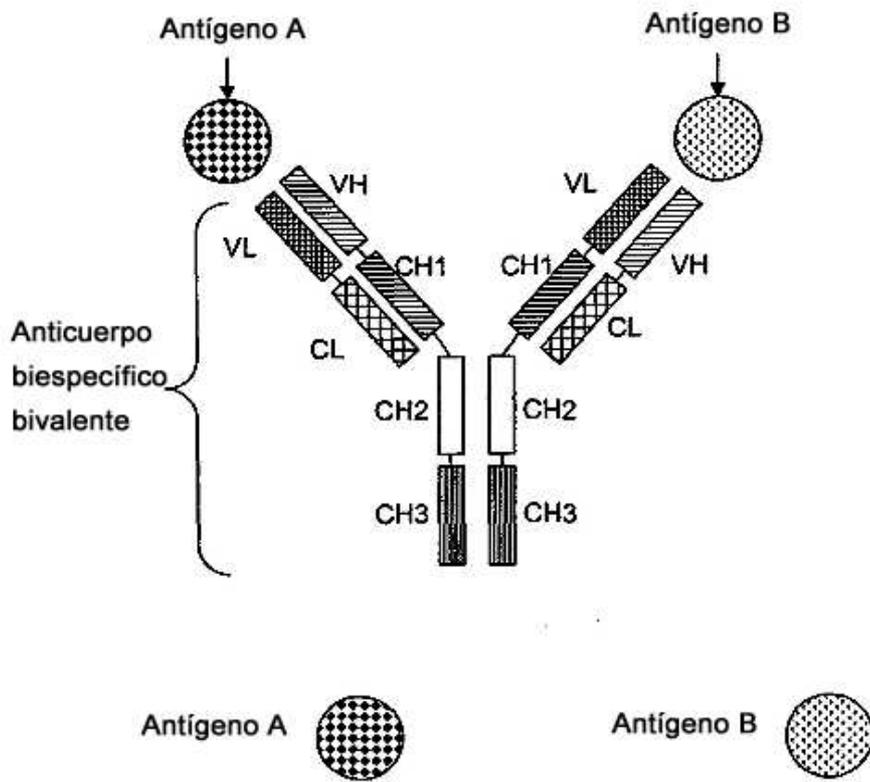
**REIVINDICACIONES**

1. 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 constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.
  
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se reúnen en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 del anticuerpo, en el que se altera dicha interfaz con el fin de estimular la formación del anticuerpo biespecífico bivalente, en el que la alteración se caracteriza porque:
  - a) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada, 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, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido con un volumen de cadena lateral mayor, 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
  - b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada, de manera que, dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico bivalente, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido con un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de esta manera una cavidad dentro de la interfaz del segundo dominio CH3 dentro de la cual puede posicionarse una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.
  
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).
  
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).
  
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: 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:
  - 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 de unión específica a un primer antígeno,
    - 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, 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.
  
8. Célula huésped que comprende:
  - vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de unión específica a un primer antígeno,
  - 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, en el que los dominios constantes CL y CH1 se sustituyen uno por otro.
  
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.

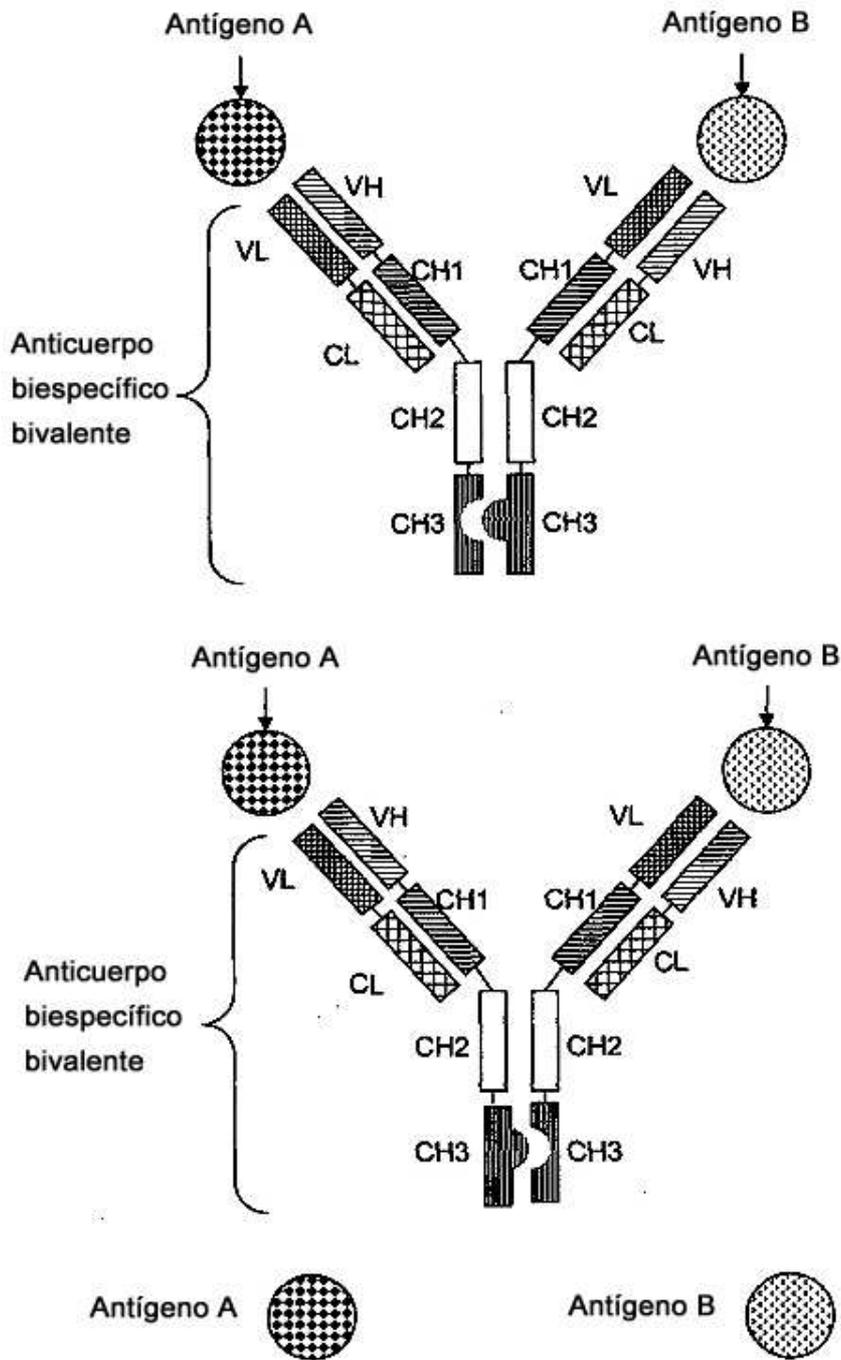
**Fig. 1**



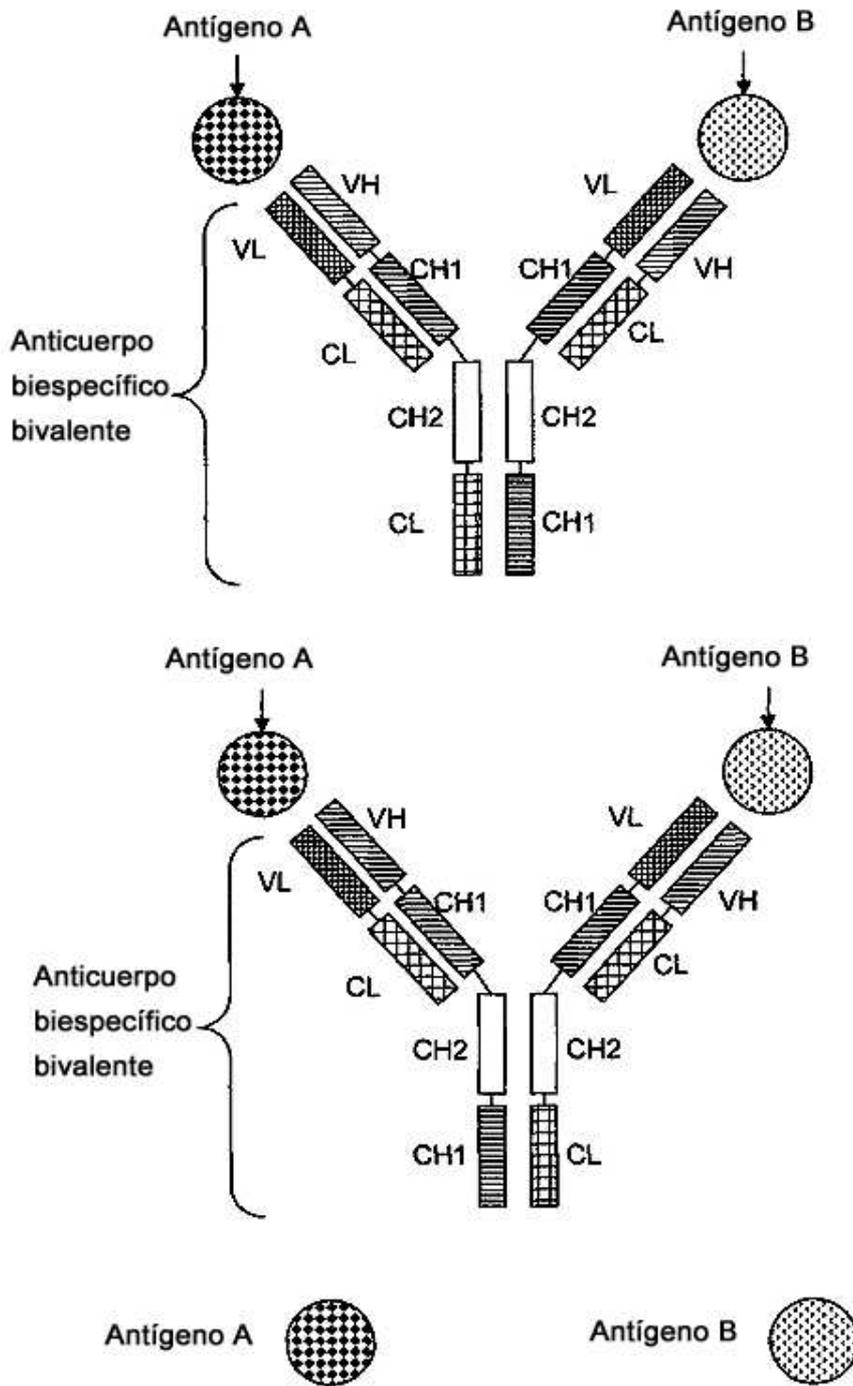
**Fig. 2**



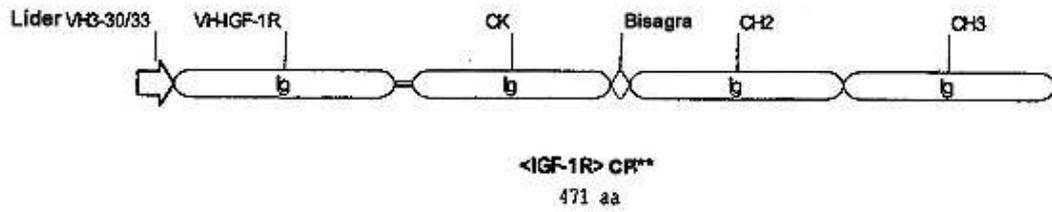
**Fig. 3**



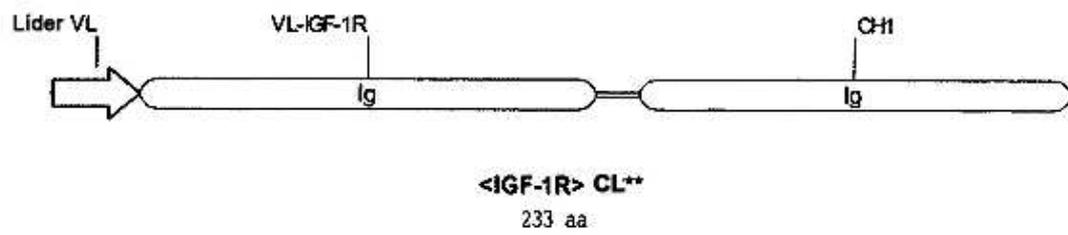
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



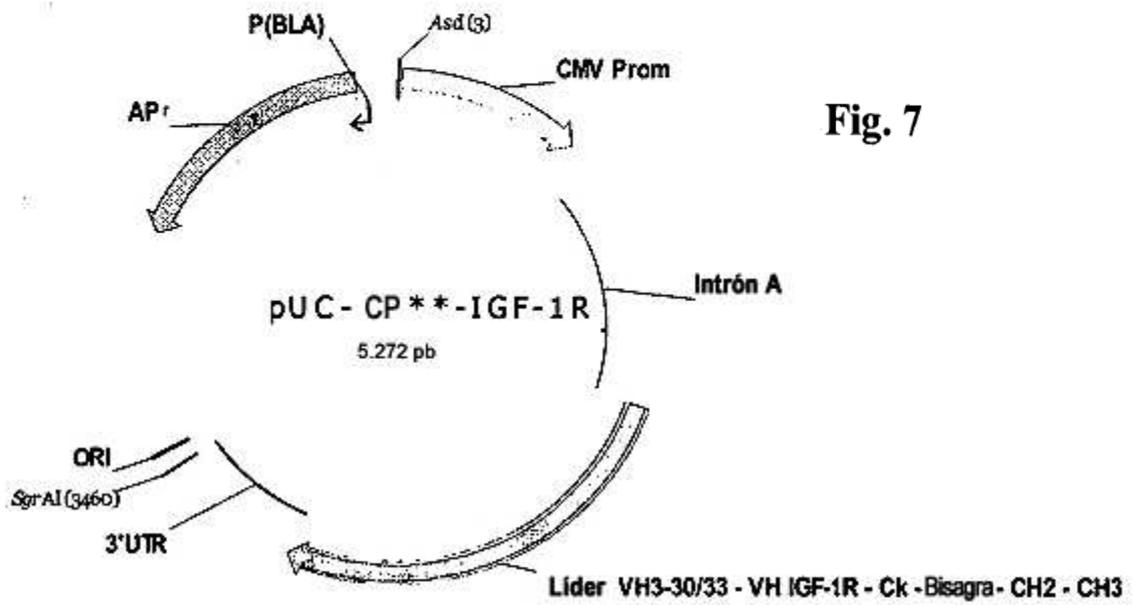


Fig. 7

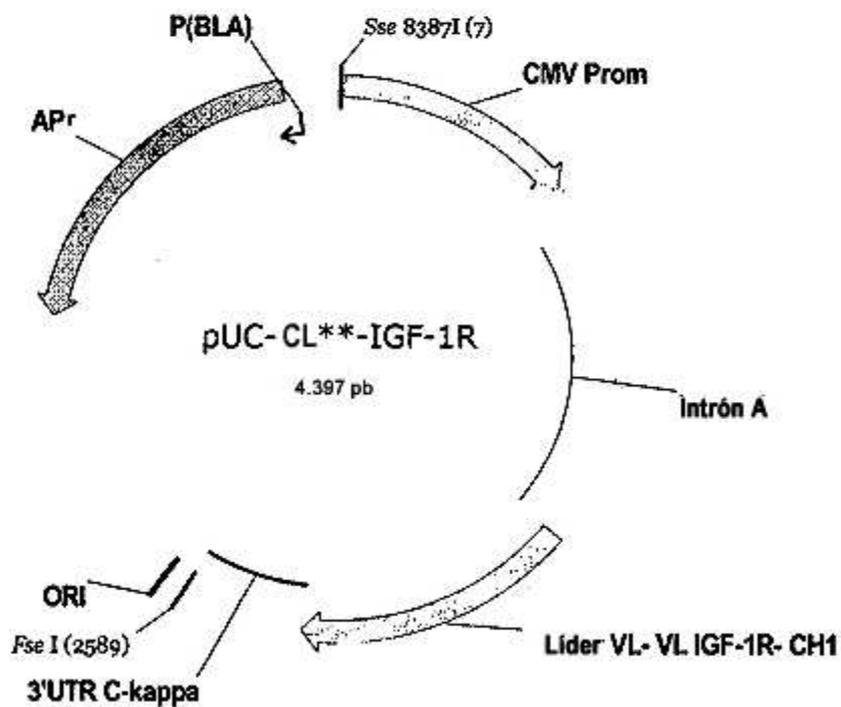
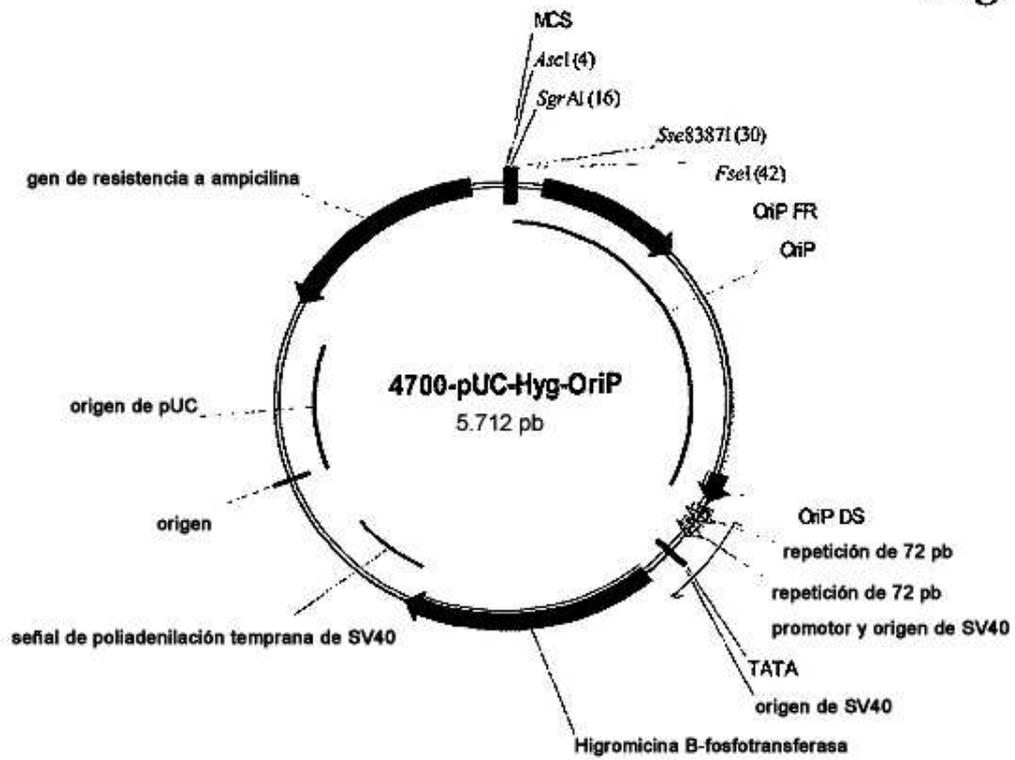


Fig. 8

**Fig. 9**



**Fig. 10**

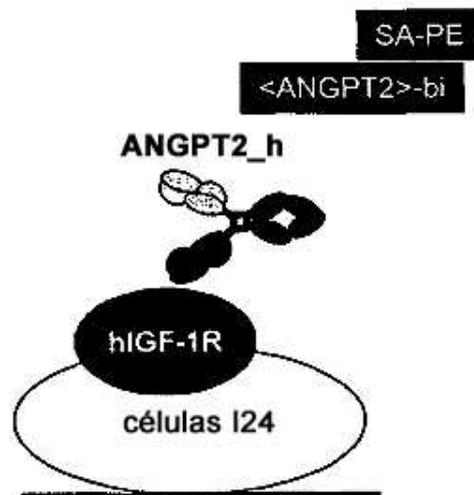


Fig. 11

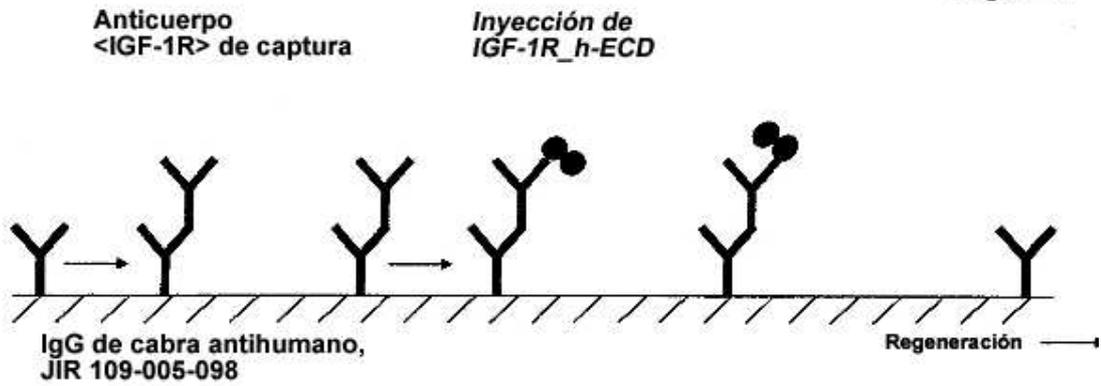
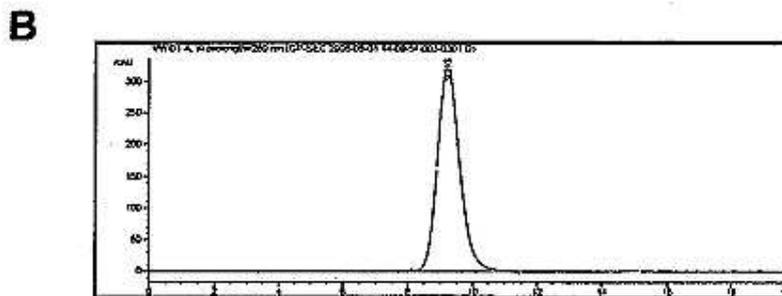
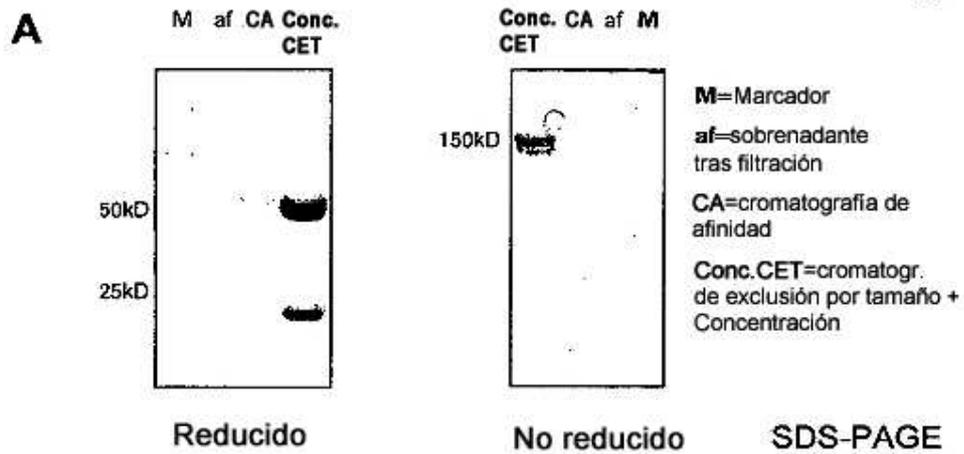
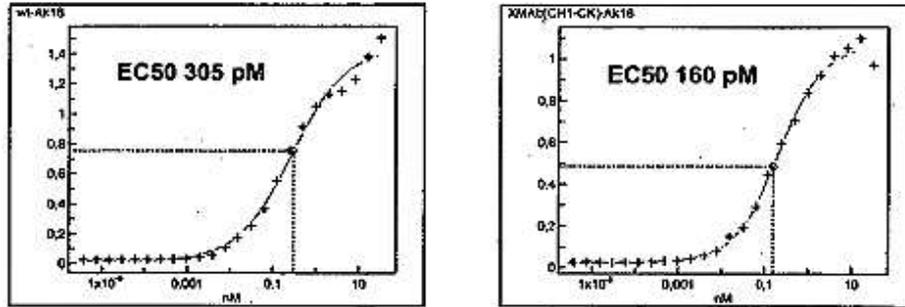


Fig. 12



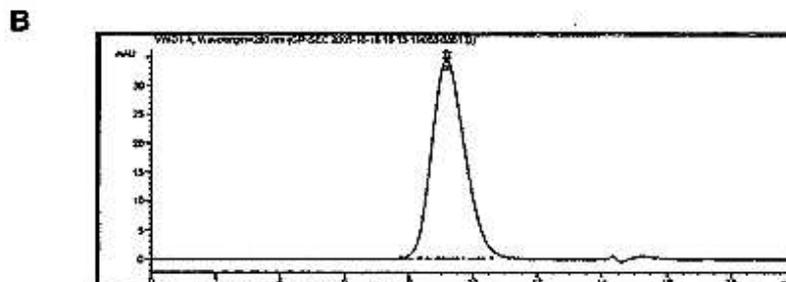
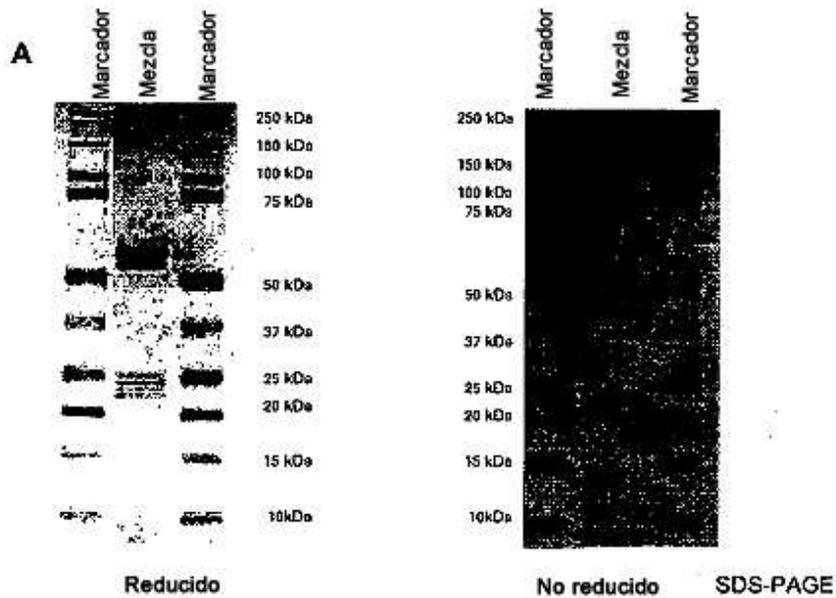
**Fig. 13**



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

Unión a IGF-1R-ECD del anticuerpo de intercambio <IGF-1R> CL-CH1

**Fig. 14**



**Fig. 15**

