

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 245**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/EP2012/004404**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13056851**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12780659 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2768855**

54 Título: **Anticuerpo estable de unión a antígenos múltiples**

30 Prioridad:
20.10.2011 US 201161549482 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2018

73 Titular/es:
**ESBATECH - A NOVARTIS COMPANY LLC
(100.0%)
Wagistrasse 21
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:
**RIEGLER, ASTRID C.;
BORRAS, LEONARDO y
SOMMAVILLA, ROBERTO**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 687 245 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

Anticuerpo estable de unión a antígenos múltiples

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un anticuerpo estable de unión a antígenos múltiples que tiene al menos dos dominios variables de cadena ligera de anticuerpo, dos dominios variables de cadena pesada de anticuerpo y carece de dominios constantes, en donde cada dominio variable de cadena ligera está unido a un dominio variable de cadena pesada para formar una construcción VH/VL, y donde al menos uno de los dominios VH comprende un aminoácido particular en la posición AHo 12, 103 y/o 144, y al menos uno de los dominios VL comprende un aminoácido particular en la posición AHo 47 y/o 50. La invención se refiere adicionalmente a métodos para producir tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que comprenden tales anticuerpos.

Antecedentes de la invención

15 Las moléculas de anticuerpo que son capaces de unirse a más de un antígeno son deseables como agentes terapéuticos potenciales para tratar enfermedades en las que participan múltiples proteínas. Por ejemplo, a menudo es deseable dirigir dos proteínas en la misma vía de señalización o modular la actividad de dos vías de señalización diferentes mediante el direccionamiento de una proteína en cada vía. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que se unen a moléculas diana diferentes) y anticuerpos multivalentes (por ejemplo, anticuerpos bivalentes que se unen a dos sitios de unión diferentes de una molécula diana). Se han desarrollado varios enfoques en el campo de anticuerpos terapéuticos para combinar dos anticuerpos terapéuticos en una molécula única para aprovechar los efectos aditivos o sinérgicos y al mismo tiempo mantener la estabilidad y otras propiedades deseables. Tales enfoques incluyen formatos recombinantes tales como el fragmento variable de cadena sencilla en tándem (TdscFv) (Hagemeyer et al., 2009, Thromb Haemost 101:1012-1019; Robinson et al., 2008, Br J Cancer 99:1415-1425), diacuerpos (Hudson et al., 1999, J Immunol Methods 231:177-189), diacuerpos en tándem (Kipriyanov, 2009, Methods Mol Biol 562:177-193), anticuerpos dos en uno (Bostrom et al., 2009, Science 323:1610-1614), y anticuerpos de dominio variable dual (Wu et al., 2007, Nat Biotechnol 25:1290-1297).

20 Un ejemplo de una enfermedad en la que un enfoque terapéutico de dos componentes es atractivo es la neovascularización coroidal. El componente vascular de la neovascularización coroidal está comprendido por células endoteliales vasculares, precursores celulares endoteliales y pericitos. El componente extravascular, que mediante histopatología parece ser ambos, la fuente del estímulo angiogénico y a menudo el componente más grande volumétricamente, está compuesto por células inflamatorias, gliales y del epitelio pigmentario retinal, y fibroblastos. Cualquiera de los componentes puede provocar daño tisular. Se puede direccionar cada uno de los componentes por separado a través de una variedad de monoterapias. Sin embargo, un anticuerpo biespecífico contra un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y un factor de necrosis tumoral (TNF) representan una oportunidad de atacar ambos componentes simultáneamente.

35 Un problema común asociado a los anticuerpos multiespecíficos y multivalentes es la poca estabilidad, así como también los problemas con el rendimiento de la producción, la pureza y la afinidad. Se han desarrollado varios enfoques para abordar estos problemas, incluyendo diseño racional y evolución dirigida (Mabry y Snavely, 2010, IDrugs 13:543-549). Tales enfoques, sin embargo, toman tiempo y todavía tienen que proporcionar resultados universalmente aplicables.

40 Como consecuencia, existe la necesidad en la técnica de un formato de anticuerpo multiespecífico y multivalente que sea estable y soluble, y no presente las deficiencias de los formatos de anticuerpos multiespecíficos y multivalentes. El documento WO2009/000099 divulga inmunoenlazantes modificados genéticamente, en particular scFvs, con sustituciones en los dominios variables con el fin de aumentar las propiedades particulares.

Resumen de la invención

45 La invención proporciona el asunto objeto tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona anticuerpos que se unen a múltiples antígenos, tales como anticuerpos biespecíficos y bivalentes, que comprenden algunos residuos de aminoácidos en posiciones particulares en una cadena variable pesada y/o variable ligera, que son moléculas altamente estables.

En un aspecto, la invención divulga moléculas de anticuerpo de unión a antígeno múltiples que comprenden:

- 50 a) dos dominios variables de cadena pesada, uno con especificidad para el antígeno A (VH-A) y uno con especificidad para el antígeno B (VH-B), y
- b) dos dominios variables de cadena ligera, uno con especificidad para el antígeno A (VL-A) y uno con especificidad para el antígeno B (VL-B),

en donde al menos uno de los dos dominios variables de cadena pesada comprende al menos uno de los siguientes: una Serina en la posición AHo 12, una Serina o Treonina en la posición AHo 103, y una Serina o Treonina en la posición AHo 144; y/o en donde al menos uno de los dos dominios variables de cadena ligera comprende una Arginina en la posición AHo 50.

5 En un aspecto, la invención divulga una molécula de anticuerpo de unión a antígenos múltiples que comprende: un dominio variable de cadena pesada con una especificidad para el antígeno A (VH-A) unido a un dominio variable de cadena ligera con una especificidad para el antígeno B (VL-B) mediante el enlazador peptídico 1 para formar una construcción VH-A/VL-B; un dominio variable de cadena pesada con una especificidad para el antígeno B (VH-B) unido a un dominio variable de cadena ligera con una especificidad para el antígeno A (VL-A) mediante el enlazador peptídico 2 para formar una construcción VH-B/VL-A; donde el anticuerpo de unión a antígenos múltiples carece de dominios constantes, al menos uno de VL-A y VL-B comprende una Arginina en la posición AHo 50, y al menos uno de VH-A y VH-B comprende al menos uno de los siguientes: una Serina en la posición AHo 12, a Serina o Treonina en la posición AHo 103, y una Serina o Treonina en la posición AHo 144.

10
15 En determinados aspectos, una construcción VH-A/VL-B está en una orientación VH-A-(enlazador 1)-VL-B u orientación VH-B-(enlazador 1)-VL-A. En otros aspectos, una construcción VH-B/VL-A está en una orientación VH-B-(enlazador 2)-VL-A u orientación VH-A-(enlazador 2)-VL-B.

En otro aspecto, al menos uno de VL-A o VL-B comprende una secuencia marco que tiene al menos 65 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

20 En otro aspecto, al menos uno de VH-A o VH-B comprende una secuencia marco que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, al menos una de las construcciones VL-A/VH-B y VH-B/VL-A comprende una región variable de cadena ligera de la familia V κ 1 humana, una región variable de cadena ligera de la familia V λ 1 humana o una región variable de cadena ligera de la familia V κ 3 humana.

25 En otro aspecto, al menos una de las construcciones VL-A/VH-B y VH-B/VL-A comprende una región variable de cadena pesada de la familia VH3 humana, una región variable de cadena pesada de la familia VH1a humana o una región variable de cadena pesada de la familia VH1b humana.

En otro aspecto, los dominios VH y los dominios VL comprenden las CDR de un lagomorfo.

30 En aun otro aspecto, la invención proporciona una molécula de anticuerpo de unión a antígenos múltiples que comprende: CDR de un lagomorfo; un dominio variable de cadena pesada con una especificidad para el antígeno A (VH-A) unido a un dominio variable de cadena ligera con una especificidad para el antígeno B (VL-B) mediante el enlazador peptídico 1 para formar una construcción VH-A/VL-B; un dominio variable de cadena pesada con una especificidad para el antígeno B (VH-B) unido a un dominio variable de cadena ligera con una especificidad para el antígeno A (VL-A) mediante el enlazador peptídico 2 para formar una construcción VH-B/VL-A; donde al menos uno de los dominios variables de cadena pesada comprende al menos tres de los siguientes: treonina (T) en la posición AHo 24, valina (V) en la posición AHo 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición AHo 56, lisina (K) en la posición AHo 82, treonina (T) en la posición AHo 84, valina (V) en la posición AHo 89 y arginina (R) en la posición AHo 108. En determinados aspectos, dichos anticuerpo comprenden adicionalmente ácido glutámico (E) en la posición AHo 1, valina (V) en la posición AHo 3, leucina (L) en la posición AHo 4, Serina (S) en la posición AHo 10; Arginina (R) en la posición AHo 47, Serina (S) en la posición AHo 57, fenilalanina (F) en la posición AHo 91 y/o Valina (V) en la posición AHo 103 en al menos uno de los dominios variables de cadena ligera.

40 Las realizaciones preferidas específicas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Descripción detallada

45 La información particular mostrada en la presente es a modo de ejemplo y con fines de describir de manera ilustrativa las realizaciones preferidas de la presente invención únicamente, y se presentan para proporcionar lo que se cree es la descripción más útil y fácil de entender de los principios y aspectos conceptuales de diversas realizaciones de la invención. En este sentido, no se intenta mostrar los detalles estructurales de la invención más detalladamente que lo necesario para el entendimiento fundamental de la invención, la descripción junto con los dibujos y/o los ejemplos harán evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las varias formas de la invención.

50 Para que la presente invención se entienda más fácilmente, se definen determinados términos de la siguiente manera y tal como se establecen a través de la descripción detallada. Las definiciones y explicaciones prevalecerán ante cualquier construcción futura a menos que se modifique de forma clara y inequívoca en los siguientes ejemplos o cuando la aplicación del significado hace que cualquier construcción resulte sin sentido o esencialmente sin

sentido. En los casos donde la construcción del término pueda hacer que este resulte sin sentido o esencialmente sin sentido, la definición deberá tomarse del Webster's Dictionary, 3.^a Edición o un diccionario conocido por el experto en la técnica, tal como el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

5 Es un objetivo general de la invención proporcionar anticuerpos capaces de unir antígenos múltiples que son adecuados para usos terapéuticos. Tal como se describe en la presente por primera vez, se pueden mejorar las propiedades de dichos anticuerpos cuando determinados anticuerpos están presentes en posiciones particulares en el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de cadena pesada. Tales propiedades mejoradas incluyen estabilidad, rendimiento de producción y pureza mejoradas, por ejemplo.

10 Por lo tanto, la invención divulga anticuerpos que unen antígenos múltiples, comprendiendo los anticuerpos:

a) un dominio variable de cadena pesada con una especificidad para el antígeno A (VH-A) unido a un dominio variable de cadena ligera con una especificidad para el antígeno B (VL-B) mediante el enlazador peptídico 1 para formar una construcción VH-A/VL-B;

15 b) un dominio variable de cadena pesada con una especificidad para el antígeno B (VH-B) unido a un dominio variable de cadena ligera con una especificidad para el antígeno A (VL-A) mediante el enlazador peptídico 2 para formar una construcción VH-B/VL-A;

20 en donde al menos uno de VL-A y VL-B comprende una Arginina en la posición AHo 47 y/o 50, y al menos uno de VH-A y VH-B comprende una Serina en la posición AHo 12, una Serina o Treonina en la posición AHo 103, y/o una Serina o Treonina en la posición AHo 144. En una realización, un VL comprende una Arginina en la posición AHo 50, y un VH comprende Serina en la posición AHo 12, Treonina en la posición AHo 103, y Treonina en la posición AHo 144.

En una realización preferida, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de unión a antígenos múltiples que carece de dominios constantes, tal como un anticuerpo scFv.

25 El término "scFv" se refiere a una molécula que comprende un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (o región; VH) y un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (o región; VL) conectado por un enlazador, y carece de dominios constantes. Dichas moléculas scFv pueden tener las estructuras generales: NH₂-VL-enlazador-VH-COOH o NH₂-VH-enlazador-VL-COOH. Los enlazadores adecuados se describen en la presente y son conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo los enlazadores descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 2010/006454.

30 Tal como se usa en la presente, un "anticuerpo de unión a antígenos múltiples" es un anticuerpo que tiene al menos cuatro dominios variables y puede unir dos o más antígenos de moléculas diana diferentes (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) o dos o más antígenos de la misma molécula diana (por ejemplo, un anticuerpo bivalente). Las formas de anticuerpos de unión a antígenos múltiples de la invención incluyen, de modo no taxativo, un diacuerpo, un diacuerpo de cadena simple y un anticuerpo en tándem, conocidos por los expertos en la técnica.

35 Un "anticuerpo biespecífico" tal como se usa en la presente es un anticuerpo que puede unir dos moléculas diana diferentes.

Un "anticuerpo bivalente" tal como se usa en la presente es un anticuerpo que puede unir dos sitios diferentes de una molécula diana.

40 En ciertos aspectos, un VL de un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención comprende al menos un aminoácido particular en al menos una posición particular que en la presente ha demostrado que mejora la estabilidad de un formato de anticuerpo de unión a antígenos múltiples, y el VH del anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención comprende al menos uno de tres aminoácidos particulares en al menos una de tres posiciones particulares que en la presente ha demostrado que mejora la estabilidad de un formato de anticuerpo de unión a antígenos múltiples. En una realización particular, la posición en el VL es la posición AHo 50 y/o posición AHo 47, y el aminoácido en dicha/s posición/es es una Arginina. En otra realización particular, las posiciones en el VH son las posiciones AHo 12, 103 y 144, y los aminoácidos preferidos en dichas posiciones son: Serina en la posición AHo 12, una Serina o Treonina en la posición AHo 103, y una Serina o Treonina en la posición AHo 144. En una realización preferida, los aminoácidos en el VH son Serina en la posición AHo 12, Treonina en la posición AHo 103, y Treonina en la posición AHo 144. En determinadas realizaciones, estos aminoácidos preferidos se pueden introducir en un VL y/o VH mediante sustitución del aminoácido de origen natural en la o las posiciones identificadas.

El sistema de numeración AHo se describe adicionalmente en Honegger, A. y Pluckthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 309:657-670). De manera alternativa, se puede usar el sistema de numeración Kabat tal como se describe adicionalmente en Kabat et al. (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EUA, Publicación NIH No. 91-3242). Las tablas de

conversión para los dos sistemas de numeración diferentes usados para identificar las posiciones de los residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena ligera y pesada de anticuerpo se proporcionan en A. Honegger, 2001, J.Mol.Biol. 309:657-670. El número Kabat correspondiente para la posición AHo 47 en el VL es 39. El número Kabat correspondiente para la posición AHo 50 en el VL es 42. El número Kabat correspondiente para la posición AHo 12 en el VH es 11. El número Kabat correspondiente para la posición AHo 103 en el VH es 89. El número Kabat correspondiente para la posición AHo 144 en el VH es 108.

En otro aspecto, la invención divulga anticuerpos de unión a antígenos múltiples que comprenden uno o más de los aminoácidos preferidos en las posiciones preferidas descritas en la presente, y que comprenden especificidades de unión de al menos dos anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de estos, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena simple. Dichos anticuerpos también pueden ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada o cualquier fragmento mínimo de este tal como un Fv o una construcción de cadena simple como se describe en Ladner et al. patente estadounidense No. 4,946,778 cuyo contenido se incorpora expresamente a la presente mediante esta referencia. En determinadas realizaciones, dichos anticuerpos de unión a antígenos múltiples comprenden al menos un VL que tiene una Arginina en la posición AHo 50, y al menos un VH que tiene una Serina en la posición AHo 12, una Serina o Treonina en la posición AHo 103, y una Serina o Treonina en la posición AHo 144.

Enlazadores y Construcciones VH/VL

Tal como se usa en la presente, "enlazador peptídico 1" y "enlazador peptídico 2" se refiere a péptidos enlazadores que conectan dominios variables en una construcción VH/VL entre sí, o una o más construcciones scFv juntas. Una "construcción VH/VL" puede ser: una construcción VH-A/VL-B o VH-B/VL-A, que comprende un dominio VH con CDR que se unen a un antígeno particular y un dominio VL con CDR que se unen a un antígeno diferente; o una construcción VH-A/VL-A o VH-B/VL-B, que comprende un dominio VH con CDR que se unen a un antígeno particular un dominio VL con CDR que se unen al mismo antígeno. La forma de dichas construcciones puede ser VH-L-VL o VL-L-VH, donde L es el enlazador peptídico 1 o 2. Dichos enlazadores peptídicos preferiblemente tienen una longitud menor o igual a alrededor de 20 aminoácidos. En particular, dichos enlazadores peptídicos tienen una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos. En determinadas realizaciones, los enlazadores peptídicos tienen una longitud de 3-7 aminoácidos. Una secuencia enlazadora preferida para el enlazador peptídico 1 y/o enlazador peptídico 2 es GGGGS (SEQ ID NO: 1). Otra secuencia enlazadora útil como un enlazador peptídico 1 y/o enlazador peptídico 2 en un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención incluyen: GGS y GGGGGGS (SEQ ID NO: 2). En determinadas realizaciones, una construcción VH/VL puede ser un anticuerpo de cadena simple. Los enlazadores en anticuerpos de cadena simple se conocen en la técnica. Preferiblemente, un enlazador para un anticuerpo de cadena simple que une un dominio VH y VL que se une a un antígeno preferido en un anticuerpo de la invención puede ser de hasta 20 aminoácidos, por ejemplo, que tiene la secuencia SEQ ID NO: 4 mostrada a continuación.

En determinadas realizaciones, una construcción VH/VL está conectada a otra construcción VH/VL mediante el enlazador peptídico 3. En otras realizaciones, los dominios variables en una construcción VH/VL están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico 3. El enlazador peptídico 3 preferiblemente tiene una longitud de más de alrededor de 10 aminoácidos y menos de alrededor de 30 aminoácidos. En particular, el enlazador peptídico 3 tiene una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. En determinadas realizaciones, el enlazador peptídico 3 tiene una longitud de 10-15 aminoácidos. Una secuencia enlazadora preferida para el enlazador peptídico 3 es GSDSNAGRASAGNTS (SEQ ID NO: 3). Otra secuencia enlazadora preferida para el enlazador peptídico 3 es (GGGGGS)₄ (SEQ ID NO: 4). Un experto en la técnica reconocerá que los cambios conservadores (por ejemplo, las sustituciones) se pueden realizar en las secuencias enlazadoras sin afectar la actividad y las propiedades preferidas de un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención.

En ciertos aspectos, una construcción VH/VL puede estar en uno de los siguientes formatos: VH-A-(enlazador 1 o 2)-VL-B; VH-B-(enlazador 1 o 2)-VL-A; VH-A-(enlazador 1 o 2)-VL-A; VH-B-(enlazador 1 o 2)-VL-B; VL-A-(enlazador 1 o 2)-VH-A; VL-B-(enlazador 1 o 2)-VH-B. Los expertos en la técnica pueden contemplar otras orientaciones de los dominios VH y VL en una construcción VH/VL. Por ejemplo, VL-A-(enlazador 1 o 2)-VH-B, VL-B-(enlazador 1 o 2)-VH-A, VL-A-(enlazador 1 o 2)-VH-A, VL-B-(enlazador 1 o 2)-VH-B. En realizaciones particulares, donde las construcciones VH/VL están conectadas por el enlazador peptídico 3, se puede crear uno de los siguientes formatos: VH-A-(enlazador-1)-VL-A-(enlazador 3)-VH-B-(enlazador 2)-VL-B; VH-A-(enlazador-1)-VL-B-(enlazador 3)-VH-B-(enlazador 2)-VL-A; VL-A-(enlazador-1)-VH-B.

En una realización, un formato preferido de un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención es: VH-A-SEQ ID NO: 1-VL-B-SEQ ID NO: 4-VH-B-SEQ ID NO: 1-VL-A.

De manera alternativa, las construcciones VH/VL de la invención pueden estar funcionalmente unidas (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) entre sí para formar un anticuerpo de unión a antígenos múltiples.

La invención proporciona anticuerpos que unen antígenos múltiples. Tal como se describe en la presente, dichos

anticuerpos se pueden unir a moléculas diana diferentes (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que tiene especificidad para al menos dos proteínas diferentes) o se unen a epítopos diferentes en la misma molécula diana (por ejemplo, un anticuerpo bivalente que tiene especificidad para la misma proteína pero que une dos o más sitios de unión en esa proteína). Un experto en la técnica puede seleccionar la o las moléculas diana particulares en función de la necesidad.

5

A modo de ejemplo, y de modo no taxativo, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que tiene una especificidad para VEGF y TNF α tal como se describe en los Ejemplos de la presente. Tal anticuerpo es útil para tratar enfermedades en las que es deseable inhibir VEGF y TNF α .

10

15

20

25

30

35

40

45

50

En determinadas realizaciones, se puede utilizar un anticuerpo anti-VEGF/TNF α en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización corooidal, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, fibroplasia retrolental, carcinomas de mama, carcinomas de pulmón, carcinomas gástricos, carcinomas esofágicos, carcinomas colorrectales, carcinomas de hígado, carcinomas de ovario, los comas, arrenoblastomas, carcinomas cervicales, carcinoma endometrial, hiperplasia endometrial, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma laríngeo, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de la piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas del páncreas, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilms, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como aquel asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, artritis rematoidea, psoriasis, aterosclerosis, estados crónicos y/o autoinmunes de inflamación en general, trastornos inflamatorios mediados por el sistema inmunitario en general, enfermedades inflamatorias del SNC, enfermedades inflamatorias que afectan el ojo, articulaciones, piel, membranas mucosas, sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, tracto urinario o pulmón, estados de uveítis en general, retinitis, uveítis HLA-B27+, enfermedad de Behcet, síndrome del ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus (que incluye la neuropatía diabética), resistencia a la insulina, estados de artritis en general, artritis reumatoidea, osteoartritis, artritis reactiva y síndrome de Reiter, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, miastenia gravis, esclerosis lateral amiotrófica, sarcoidosis, glomerulonefritis, enfermedad renal crónica, cistitis, psoriasis (que incluye artritis psoriática), hidradenitis supurativa, pioderma gangrenoso, síndrome de SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis y osteítis), acné, síndrome de Sweet, pénfigo, enfermedad de Crohn (que incluye manifestaciones extraintestinales), colitis ulcerativa, asma bronquial, neumonitis por hipersensibilidad, alergias generales, rinitis alérgica, sinusitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis del pulmón, granulomatosis de Wegener, síndrome de Kawasaki, arteritis de células gigantes, vasculitis de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa, quemaduras, enfermedad de injerto contra huésped, reacciones de huésped contra injerto, episodios de rechazo luego de trasplante de órgano o médula ósea, estados sistémicos y locales de vasculitis en general, lupus eritematoso sistémico y discoide, polimiositis y dermatomiositis, esclerodermia, preeclampsia, pancreatitis aguda y crónica, hepatitis viral, hepatitis alcohólica, inflamación postquirúrgica tal como luego de cirugía ocular (por ejemplo, catarata (reemplazo del cristalino) o cirugía por glaucoma), cirugía de articulaciones (que incluye cirugía artroscópica), cirugía en estructuras relacionadas con las articulaciones (por ejemplo, ligamentos), cirugía oral y/o dental, procedimientos cardiovasculares mínimamente invasivos (por ejemplo, PTCA, aterectomía, colocación de stent), procedimientos ginecológicos e intraabdominales laparoscópicos y/o endoscópicos, procedimientos urológicos endoscópicos (por ejemplo, cirugía de próstata, ureteroscopía, cistoscopia, cistitis intersticial), o inflamación perioperatoria (prevención) en general, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, parálisis de Bell, enfermedad de Creutzfeld-Jakob. La osteólisis relacionada al cáncer, inflamación relacionada al cáncer, dolor relacionado al cáncer, caquexia relacionada al cáncer, metástasis de hueso, formas de dolor agudas y crónicas, sin importar si estas son causadas por efectos centrales o periféricos de TNF α y si se clasifican como formas de dolor inflamatorio, nociceptivo o neuropático, ciática, dolor de espalda baja, síndrome del túnel carpiano, síndrome de dolor regional complejo (CRPS), gota, neuralgia posherpética, fibromialgia, estados de dolor local, síndromes de dolor crónico debido a tumor metastásico, dismenorrea. Sepsis bacteriana, viral o fúngica, tuberculosis, SIDA, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria, hipertensión, dislipidemia, insuficiencia cardíaca e insuficiencia cardíaca crónica.

55

60

La unión de anticuerpos de la invención a sus antígenos diana específicos se puede confirmar mediante, por ejemplo, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento), o mediante ensayo de inmunotransferencia. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular al emplear un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. De manera alternativa, los complejos se pueden detectar utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar marcado de forma radioactiva, y se puede utilizar en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Marzo, 1986, el cual se incorpora a la presente mediante referencia). El isótopo radioactivo se puede detectar mediante tales medios como el uso de un contador y o un contador de escintilación o mediante autorradiografía.

Los anticuerpos de la invención son útiles para una cantidad de propósitos, que incluyen propósitos terapéuticos y

diagnósticos.

Características de los dominios VL y VH.

5 En determinadas realizaciones, un VL y VH de un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención comprende CDR de un anticuerpo humano, un anticuerpo no humano (tal como un anticuerpo producido en un roedor, primate no humano, lagomorfo, o cualquier otro animal adecuado), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y similares. En una realización particular, las CDR provienen de un lagomorfo.

10 El término "lagomorfo" se refiere a miembros del orden taxonómico Lagomorfa, que comprende las familias Lepóridos (por ejemplo, liebres y conejos) y los Ocotónidos (pikas). En una realización más preferida, el lagomorfo es un conejo. El término "conejo" tal como se utiliza en la presente se refiere a un animal que pertenece a la familia de los lepóridos.

15 El término "CDR" se refiere a una de las seis regiones hipervariables dentro de los dominios variables de un anticuerpo que contribuye principalmente a la unión del antígeno. Una de las definiciones más comúnmente utilizada para las seis CDR fue proporcionada por Kabat E.A. et al. (1991, Sequences of proteins of immunological interest. Publicación NIH 91-3242). En algunos casos, la definición de Kabat de las CDR se puede aplicar solo para CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera (CDR L1, CDR L2, CDR L3, o L1, L2, L3), así como para CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena pesada (CDR H2, CDR H3, o H2, H3), mientras que el CDR1 del dominio variable de cadena pesada (CDR H1 o H1) se define mediante los siguientes residuos (numeración Kabat): CDR1 de la cadena pesada comienza con la posición 26 y termina antes de la posición 36. Esta definición es básicamente una fusión de CDR H1 tal como lo definió de forma diferente por Kabat y Chothia.

20 En una realización, un VL en un anticuerpo scFv de unión a antígenos múltiples de la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 65 % de identidad, más preferiblemente al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, más preferiblemente 99 % de identidad, con respecto a la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 5):

EIVMTQSPSTLSASVGRVITC (X)_{n=1-50} WYQQKPGRAPKLLIY (X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYC (X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

25 En otra realización, el VH en un anticuerpo scFv de unión a antígenos múltiples de la invención comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad, más preferiblemente al menos un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, más preferiblemente 99 % de identidad, con respecto a la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 6):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS (X)_{n=1-50} WVRQAPGKGLEWVG (X)_{n=1-50}
 RFTISRDTSKNTVYLMNSLR AEDTAVYYCAR (X)_{n=1-50} WGQGLTVTVSS

30 Tal como se utiliza en la presente, los residuos X son sitios de inserción CDR. X puede ser cualquier aminoácido de origen natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes. Se entiende que las secuencias marco de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6 son las secuencias sin los residuos X.

35 Los marcos de anticuerpos adecuados útiles en un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención incluyen, de modo no taxativo: una región variable de cadena ligera de la familia V κ 1 humana, una región variable de cadena ligera de la familia V λ 1 humana, una región variable de cadena ligera de la familia V κ 3 humana, una región variable de cadena pesada de la familia VH3 humana, una región variable de cadena pesada de la familia VH1a humana, y una región variable de cadena pesada de la familia VH1b humana, donde la región variable de cadena ligera tiene o se ha diseñado para que tenga (por ejemplo, mediante sustitución del aminoácido de origen natural) una Arginina en la posición AHo 47 y/o 50, y la región variable de cadena pesada tiene o se ha diseñado para que tenga (por ejemplo, mediante la sustitución del aminoácido de origen natural) una serina en la posición AHo 12, una serina o treonina en la posición AHo 103, y una serina o treonina en la posición AHo 144.

45 Ejemplos no limitativos de marcos que pueden ser utilizados para generar un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención incluye aquellos marcos descritos en la solicitud de patente internacional WO 2008/004834, solicitud de patente internacional WO 2009/155726, y la solicitud de patente internacional WO 03/097697, el contenido de las cuales se incorpora mediante referencia. En tales ejemplos, la región variable de cadena ligera se puede modificar para incluir una arginina en la posición AHo 47 y/o 50, y la región variable de cadena pesada se puede modificar para incluir una serina en la posición AHo 12, una serina o treonina en la posición AHo 103, y/o una serina o treonina en la posición AHo 144.

El término "marco de anticuerpo" o "marco", tal como se utiliza en la presente se refiere a la parte del dominio variable, ya sea VL o VH, que sirve como una estructura para los bucles de unión al antígeno (CDR) de este dominio variable. En resumen es el dominio variable sin las CDR.

5 Tal como se utiliza en la presente, la "identidad" se refiere a la secuencia coincidente entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en ambas de las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad de monómero de aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en cada uno de dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición. El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias concuerdan, entonces las dos secuencias tienen un 60 % de identidad. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten un 50% de identidad (3 de las 6 posiciones totales concuerdan). Generalmente, se realiza una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar una identidad máxima. Tal alineamiento se puede proporcionar utilizando, por ejemplo, el método de Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 10 443-453, implementado de forma conveniente mediante programas de computadora tales como el programa ALIGN (DNASTar, Inc.). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) el cual se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) utilizando una tabla de ponderación de residuos PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización de brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos 15 secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

25 En una realización, un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención comprende CDR de lagomorfos y uno o más dominios variables de cadena pesada que comprenden tres, cuatro, cinco, seis o siete de los siguientes: treonina (T) en la posición AHo 24, valina (V) en la posición AHo 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición AHo 56, lisina (K) en la posición AHo 82, treonina (T) en la posición AHo 84, valina (V) en la posición AHo 89 y arginina (R) en la posición AHo 108.

30 En otra realización, un anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la invención comprende CDR lagomorfos y ácido glutámico (E) en la posición AHo 1, valina (V) en la posición AHo 3, leucina (L) en la posición AHo 4, Serina (S) en la posición AHo 10; Arginina (R) en la posición AHo 47, Serina (S) en la posición AHo 57, fenilalanina (F) en la posición AHo 91 y/o Valina (V) en la posición AHo 103 en al menos uno de los dominios variables de cadena ligera.

Vectores y Moléculas de ácidos nucleicos

35 En una realización, la invención incluye moléculas de ácido nucleico para la producción de un anticuerpo scFv de unión a antígenos múltiples de la invención.

40 El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a moléculas de ADN y a moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de una sola cadena o de doble cadena, pero preferiblemente es ADN de doble cadena. El ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando se encuentra en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o estimulante está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción de la secuencia. En determinadas realizaciones, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo de la invención, una cadena ligera variable de la invención, y/o una cadena pesada variable de la invención.

45 En una realización, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica una o más construcciones VH/VL tal como se describe en la presente. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica una construcción VH/VL en uno de los siguientes formatos: VH-A-(enlazador 1 o 2)-VL-B; VH-B-(enlazador 1 o 2)-VL-A; VH-A-(enlazador-1)-VL-B-(enlazador 3)-VH-B-(enlazador 2)-VL-A; VH-A-(enlazador 1 o 2)-VL-A; VH-B-(enlazador 1 o 2)-VL-B; VH-A-(enlazador-1)-VL-A-(enlazador 3)-VH-B-(enlazador 2)-VL-B; VL-A-(enlazador 1 o 2)-VH-B, VL-B-(enlazador 1 o 2)-VH-A; VL-A-(enlazador-1)-VH-B-(enlazador 3)-VL-B-(enlazador 2)-VH-A; VL-A-(enlazador 1 o 2)-VH-A, VL-B-(enlazador 1 o 2)-VH-B; VL-A-(enlazador-1)-VH-A-(enlazador 3)-VL-B-(enlazador 2)-VH-B; o cualquier 50 otra orientación contemplada por aquellos expertos en la técnica.

En otra realización, la invención incluye un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

55 El término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido unida. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en la que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, los vectores bacterianos que contienen un origen

5 bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora luego de la introducción en la célula hospedadora, y desde allí se replican junto con el genoma del huésped. Tales vectores de expresión y métodos para aislar productos de expresión son generalmente conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook J. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook* 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

10 El término "célula hospedadora" hace referencia a una célula en la que se introdujo un vector de expresión. Las células hospedadoras pueden incluir células bacterianas, microbianas, de plantas o animales. Las bacterias, que son susceptibles a la transformación, incluyen miembros de enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; neumococo; estreptococo y *Haemophilus influenzae*. Microbios adecuados incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las líneas celulares hospedadoras adecuadas incluyen células CHO (líneas de ovario de hámster chino) y NS0.

15 Determinados métodos para preparar anticuerpos que unen antígenos múltiples se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense número 7,838,637 y patente estadounidense número 7,129,330, las cuales se incorporan a la presente mediante referencia.

Los anticuerpos de la invención se pueden generar utilizando técnicas de rutina en el campo de genética recombinante. Conociendo las secuencias de los polipéptidos, los ADNc que los codifican se pueden generar a través de síntesis genética mediante métodos conocidos en la técnica. Estos ADNc se pueden clonar en plásmidos vectores adecuados.

20 Se debe entender que los anticuerpos de la presente invención comprenden las secuencias descritas en vez de consistir en ellas. Por ejemplo, las estrategias de clonación pueden requerir que una construcción esté hecha de un anticuerpo en el cual uno o algunos residuos adicionales están presentes en el extremo N. Específicamente, la metionina derivada del codón de inicio puede estar presente en la proteína final en casos donde no ha sido escindida postraduccionalmente. La mayoría de las construcciones para anticuerpos scFv dan lugar a una alanina
25 adicional en el extremo terminal N.

Composiciones farmacéuticas

30 En determinadas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de unión a antígenos múltiples de la invención, junto con al menos un portador o excipiente fisiológicamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, uno o más de agua, reguladores (por ejemplo, solución salina amortiguada neutral o solución salina amortiguada con fosfato), etanol, aceite mineral, aceite vegetal, dimetilsulfóxido, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutationes y/o conservantes.

35 Un portador es una sustancia que puede asociarse con un anticuerpo antes de la administración a un paciente, generalmente con el fin de controlar la estabilidad o biodisponibilidad del compuesto. Los portadores para utilizar dentro de tales formulaciones son generalmente biocompatibles, y pueden también ser biodegradables. Los portadores incluyen, por ejemplo, moléculas monovalentes o multivalentes tales como albúmina de suero (por ejemplo, humana o bovina), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidoaminas. Los portadores también incluyen materiales de soporte sólidos tales como perlas y micropartículas
40 que comprenden, por ejemplo, poliglicolato de polilactato, poli(láctido-co-glicólico), poliacrilato, látex, almidón, celulosa o dextrano. Un portador puede contener los compuestos en una variedad de formas, que incluye el enlazamiento covalente (ya sea de forma directa o a través de un grupo enlazador), interacción o mezcla no covalente.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden estar formuladas para cualquier manera apropiada de administración que incluye, por ejemplo, administración ocular, intranasal, ótica, sublingual, transdérmica, tópica, oral, nasal, rectal o parenteral. En determinadas realizaciones, se prefieren las composiciones en una forma adecuada para uso oral. Tales formas incluyen, por ejemplo, píldoras, comprimidos, pastillas, grageas, suspensiones acuosas o aceitosas, polvos dispersables o gránulos, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Dentro de aun otras realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente pueden estar formuladas como un liofilizado. El
50 término parenteral, tal como se usa en la presente, incluye inyecciones subcutáneas, intradérmicas, intravasculares (por ejemplo, intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal e intraperitoneal, así como cualquier inyección o técnicas de infusión similares.

55 En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención se puede administrar directamente en el ojo mediante inyección de tejido ocular tal como inyecciones perioculares, conjuntivales, subtenones, intracamerales, intravítreas, intraoculares, subretinianas, subconjuntivales, retrobulbares o intracanaliculares; mediante aplicación directa al ojo utilizando un catéter u otro dispositivo de colocación tal como un pellet retiniano, inserción intraocular, supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso; mediante gotas oculares tópicas o

ungüentos; o mediante un dispositivo de liberación lenta en el fondo de saco o adyacente implantado a la esclera (transescleral) o en la esclera (intraescleral) o dentro del ojo. La inyección intracameral puede realizarse a través de la córnea en la cámara anterior para permitir que el agente alcance la red trabecular. La inyección intracanalicular puede estar en los canales colectores venosos que drenan el canal de Schlemm o hacia el canal de Schlemm.

5 Para una administración oftálmica, un anticuerpo de la invención se puede combinar con conservantes oftalmológicamente aceptables, cosolventes, tensioactivos, potenciadores de viscosidad, potenciadores de la penetración, reguladores, cloruro de sodio, o agua para formar una suspensión o solución acuosa, estéril y oftálmica. Los productos oftálmicos tópicos se pueden empaquetar, por ejemplo, en forma de dosis múltiples. Por lo tanto, pueden ser necesarios conservantes para prevenir la contaminación microbiana durante el uso. Conservantes
10 adecuados incluyen: clorobutanol, parabeno de metilo, parabeno de propilo, alcohol feniletílico, edetato de disodio, ácido sórbico, policuaternio 1, u otros agentes conocidos para los expertos en la técnica. Tales conservantes se emplean típicamente a un nivel de desde 0,001 a 1,0 % p/v. Las composiciones de dosis unitarias de la presente invención serán estériles, pero típicamente no conservadas. Tales composiciones, por lo tanto, generalmente no contendrán conservantes.

15 En determinadas realizaciones, las composiciones que se pretenden administrar tópicamente en el ojo están formuladas como gotas para los ojos o ungüentos para ojos, donde la cantidad total del anticuerpo será de alrededor de 0,001 a 1,0 % (p/p), preferiblemente de alrededor de 0,01 a alrededor de 1,0 % (p/p).

Las composiciones farmacéuticas de la invención en determinadas circunstancias serán administradas como soluciones para administración tópica. Las soluciones acuosas son generalmente preferidas, en función de la
20 facilidad de la formulación, así como la capacidad de un paciente de administrarse fácilmente tales composiciones mediante la instilación de uno a dos gotas de las soluciones en los ojos afectados. Sin embargo, las composiciones también pueden ser suspensiones, geles viscosos o semiviscosos, u otros tipos de composiciones sólidas o semisólidas.

Las composiciones farmacéuticas que se pretenden utilizar para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y pueden contener uno
25 o más agentes, tales como agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar preparaciones llamativas y agradables al paladar. Los comprimidos contienen el ingrediente activo mezclado con excipientes fisiológicamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Tales excipientes incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes (por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio), agentes desintegrantes y de granulación (por ejemplo, almidón de maíz o ácido alginico), agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón, gelatina o acacia) y
30 agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco). Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden estar recubiertos mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionan así una acción sostenida durante un período de tiempo más prolongado. Por ejemplo, se puede usar un material de acción retardada, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.
35

Las suspensiones oleosas pueden formularse mediante la suspensión de los ingredientes activos en un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden agregar agentes edulcorantes, tales como los establecidos
40 anteriormente, y/o agentes saborizantes para proporcionar preparaciones orales agradables al paladar. Tales suspensiones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante, tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo mezclado con un agente dispersante o humectante, agente de
45 suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados se ejemplifican mediante los mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de oliva o aceite de arachis), un aceite mineral (por ejemplo, parafina líquida) o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural (por ejemplo, goma acacia o goma tragacanto), fosfátidos de origen natural (por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol), anhídridos (por ejemplo, monooleato de sorbitán) y productos de condensación de ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol con óxido de etileno (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietileno). Una emulsión también puede comprender uno o más agentes
50 endulzantes y/o saborizantes.
55

La composición farmacéutica se puede preparar como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril donde el modulador, dependiendo del vehículo y concentración utilizados, se suspende o disuelve en el vehículo. Dicha composición se puede formular de acuerdo con la técnica conocida, usando los agentes de suspensión y/o agentes

humectantes dispersantes adecuados, como los que se mencionaron anteriormente. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites estériles fijos se pueden emplear como un solvente o medio de suspensión. A tales efectos, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de composiciones inyectables se pueden usar ácidos grasos, tal como ácido oleico, y se pueden disolver en el vehículo, adyuvantes, tales como anestésicos locales, conservantes y/o agentes reguladores.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como formulaciones de liberación sostenida (es decir, una formulación, como una cápsula, que afecta una liberación lenta del modulador luego de la administración). En general, dichas formulaciones se pueden preparar usando la tecnología conocida y se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral, rectal o implante subcutáneo, o mediante implante en el sitio diana deseado. Los portadores para su uso dentro de dichas formulaciones son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables; preferiblemente, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del modulador. La cantidad de anticuerpo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende, por ejemplo, del sitio de implante, de la velocidad y duración esperada de liberación y de la naturaleza de la enfermedad/trastorno que se va a tratar o prevenir.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente se administran preferiblemente en una cantidad que alcanza una concentración en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, plasma, suero, LCR, líquido sinovial, linfa, líquido intersticial celular, lágrimas u orina) que es suficiente para unirse de forma detectable a una o más moléculas diana y para prevenir o inhibir enfermedades/trastornos asociados a una o más moléculas diana. Se considera que una dosis es eficaz si da como resultado un beneficio perceptible para el paciente.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de un anticuerpo de la invención dependerá, por ejemplo, de la afección que se va a tratar, de la gravedad y progreso de la afección, ya sea que el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia anterior, historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, tipo de anticuerpo utilizado y criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra al paciente de forma adecuada en un momento o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo se puede administrar como el único tratamiento o junto con otros fármacos o terapias útiles para tratar la afección en cuestión.

Como propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo administrado estará en el intervalo de alrededor de 0,1 y alrededor de 100 mg/kg del peso corporal del paciente, ya sea mediante una o más administraciones, donde el intervalo típico de anticuerpo utilizado es de alrededor de 0,3 y alrededor de 20 mg/kg, más preferiblemente, alrededor de 0,3 y alrededor de 15 mg/kg, que se administran diariamente, por ejemplo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. La evolución de esta terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas convencionales.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene una formulación farmacéutica acuosa de una composición farmacéutica de la invención y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos y jeringas. El recipiente puede estar fabricado de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. Un ejemplo de recipiente es un frasco de vidrio de 3-20 cc para un único uso. De manera alternativa, para una formulación de múltiples dosis, el recipiente puede ser un frasco de vidrio de 3-100 cc. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta sobre, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones de uso. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Ejemplos

La presente divulgación se ilustra asimismo mediante los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como más restrictivos. El contenido de todas las figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas en la solicitud se incorporan expresamente a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

Ejemplo 1

Diseño, clonación y expresión molecular de anticuerpos biespecíficos y bivalentes derivados de anticuerpos de conejo.

Se generaron secuencias de ADN biespecíficas y bivalentes mediante síntesis de oligonucleótidos a partir de secuencias genéticas digitales y posterior fusión de los fragmentos resultantes usando técnicas de extensión de superposición. Todas las secuencias se optimizaron para determinar el uso del codón de E. coli, contenido de GC, estructura secundaria del ARNm, repeticiones de codones y motivos y sitios de restricción. Se utilizaron distintos enlazadores de aminoácidos, véase la Tabla 1, para conectar los dominios VL y VH humanizados a partir de anticuerpos de conejo con distintas especificidades.

Tabla 1

Enlazador 1 y 2	
3aa	GGG
5aa	GGGGS (SEQ ID NO: 1)
7aa	GGGGGS (SEQ ID NO: 2)
Enlazador 3	
15aa	GSDSNAGRASAGNTS (SEQ ID NO: 3)
20aa	(GGGGS) ₄ (SEQ ID NO: 4)

5 Las moléculas de anticuerpo de unión a antígenos múltiples se prepararon para que se unieran biespecífica y bivalentemente a las moléculas diana. Todas las moléculas se clonaron en vectores de expresión para la expresión de E. Coli insoluble, que contiene un promotor T7lac, un sitio de unión al ribosoma bacteriano, seguido de la molécula de anticuerpo. E. coli BL21(DE3) transformado con los plásmidos de expresión de los cuerpos de inclusión correspondientes se cultivaron a 37 °C en medio dYT que contenía los antibióticos apropiados. Se inició la expresión de la proteína mediante la adición de 1-tio-D-galactopiranosida de isopropilo 1 mM (concentración final) a una absorbancia (A600) de alrededor de 2,0. Tres horas después de la inducción, se cultivaron células E. coli y se alteraron por sonicación, y se aislaron los cuerpos de inclusión mediante pasos de lavado y centrifugación repetidos.

10 Se solubilizaron los cuerpos de inclusión a una concentración de 10 mg/ml en presencia de Gdn-HCl 6 M y se redujeron mediante adición de ditioneol 20 mM. Se realizaron análisis de replegamiento básico para seleccionar el mejor pH, sistema rédox (cistina/cisteína) y concentraciones de sal del rango de condiciones analizadas. Las mejores condiciones para cada anticuerpo individual se utilizaron para un proceso de replegamiento a escala de laboratorio. Las proteínas de anticuerpo biespecífico o bivalente se volvieron a naturalizar mediante dilución rápida en un volumen de 50 veces de regulador de replegamiento. Luego de aumentar la concentración y realizar diálisis contra el regulador de PBS, pH 6,0, se purificaron las proteínas usando cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo 2

Generación de anticuerpos bivalentes

20 Se generaron anticuerpos bivalentes que se unen a interleucina 23 (IL-23) en función de los dominios variables del marco rFW1.4, una matriz humana para el injerto genérico de anticuerpos de conejo (como se describe en la Solicitud Internacional No. WO 2009/155726), y que es básicamente compatible con todos los anticuerpos de conejo. Se produjeron tres formatos, incluyendo diacuerpos, diacuerpos de cadena simple, y anticuerpos de cadena simple en tándem. Las CDR se tomaron de un anticuerpo que demostró unirse a IL-23 humana. Los diacuerpos (Db) se obtuvieron mediante expresión de dos fragmentos del formato VHA- enlazador 1-VLB y VHB-enlazador 2-VLA en la misma célula, dando como resultado la formación de heterodímeros, estando cada una de las secuencias de codificación precedida por un sitio de unión al ribosoma (RBS). En estas moléculas, el enlazador 1 y 2 tenía 5 aminoácidos (GGGGS, SEQ ID NO: 1). En otro formato, las dos cadenas de polipéptidos se fusionaron mediante un enlazador medio adicional (enlazador 3), generando un único gen que codifica un diacuerpo de cadena simple (scDb): VHA-Enlazador 1-VLB-Enlazador 3 -VHB-Enlazador2-VLA, donde el enlazador 3 consistía en 15 aminoácidos (GSDSNAGRASAGNTS, SEQ ID NO: 3) (Völkel et al., 2001, Protein Eng 14:815-823). Un tercer formato, scFv en tándem (TdscFv) se produjo conectando dos scFv mediante un enlazador medio corto (GGGGS, SEQ ID NO: 1) y un enlazador 3 largo ((GGGGS)₄, SEQ ID NO: 4, que da como resultado un orden de dominio de VL-A-enlazador 3-VH-A-enlazador 1-VL-B -enlazador3-VH-B, para generar una molécula bivalente donde VH-A y VH-B eran idénticos, así como VL-A y VL-B.

35 Se evaluaron los efectos de las distintas características en las regiones marco, en el formato scDb, para determinar la capacidad de producción, estabilidad y tendencia a formar oligómeros. Los formatos se describen en la Tabla 2. En resumen, la molécula #1 consistía en dominios variables de rFW1.4 en un scDb sin sustituciones adicionales. La molécula #2 era una variante de #1, donde se introdujo Arginina en la posición AHo 50 en ambos dominios VL (VL-A/B). La molécula #3 también estaba basada en #1, pero tenía tres sustituciones que se introdujeron en ambos dominios VH (VH-A/B), específicamente Serina en la posición AHo 12, Treonina en la posición AHo 103, y Treonina en la posición AHo 144. La molécula #14 consistía en la molécula #1 con las sustituciones de la Arginina en la posición AHo 50 en ambos dominios VL (VL-A/B), y Serina en la posición AHo 12, Treonina en la posición AHo 103, y Treonina en la posición AHo 144 en ambos dominios VH (VH-A/B). A efectos de comparación, se generó un scDb (#5) adicional usando las secuencias de consenso del repertorio de anticuerpo de la línea germinal humana

(Knappik et al., 2000, J. Mol. Biol. 296:57-86). Las regiones marco corresponden a la secuencia de consenso de los subtipos VH3 y VL kappa 1, designados HuCal. Este scDb humanizado se generó con las mismas CDR usadas en el otro scDb bivalente descrito en la presente, por lo tanto, las diferencias se ubican únicamente en las regiones marco.

Tabla 2

#1	rFW1.4
#2	rFW1.4, VL-A/-B: arginina en la posición AHo 50
#3	rFW1.4,VH-A/-B: serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, treonina en la posición AHo 144
#4	rFW1.4, VL-A/-B: arginina en la posición AHo 50, serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, treonina en la posición AHo 144
#5	injerto de HuCal FW de CDR

5

Ejemplo 3

Generación de anticuerpos biespecíficos

10 Los diacuerpos de cadena simple biespecíficos fueron diseñados para vincular en una molécula única dos especificidades diferentes. Los dominios VH y VL de dos anticuerpos scFv diferentes generados originalmente mediante la humanización de anticuerpos de conejo contra VEGF₁₆₅ y TNF α se usaron como fuente de los genes de región variable para construir un único fragmento del formato VHA-Enlazador1-VLB -Enlazador3-VHB-Enlazador2-VLA, donde los dominios variables etiquetados con A se unen a VEGF₁₆₅ y los etiquetados con B se unen a TNF α . El anticuerpo que une VEGF₁₆₅ tuvo una secuencia VL de:

EIVMTQSPSTLSASVGRVITTCQASEI IHSWLAWYQQKPKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTI
SSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG, SEQ ID NO: 7;

15 y una VH que tiene la secuencia de:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS, SEQ ID NO: 8.

La secuencia del dominio VH que tiene la serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, y treonina en la posición AHo 144 fue:

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLTVTVSS, SEQ ID NO: 9.

20 El anticuerpo que se une TNF α tuvo una secuencia VL de:

EIVMTQSPSTLSASVGRVITTCQSSQSVYGNIMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTL
TISLQPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLG, SEQ ID NO: 10;

y una VH que tiene la secuencia de:

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFTRSYWICWVRQAPGKGLEWVGCYGDNDITPLYANWAKG
RFTISRDTSKNTVYLYLQMNSLRAEDTATYYCARLGYADYAYDLWGQGLTVTVSS, SEQ ID
NO: 11.

Los anticuerpos biespecíficos se diseñaron y construyeron usando técnicas de manipulación de ADN estándares descritas en el Ejemplo 1. Los efectos de las características diferentes de marco introducidas en las regiones marco así como también diferentes combinaciones de enlazadores se evaluaron en diferentes scDb biespecíficos, descritos en la Tabla 3.

5

Tabla 3

#6	FW1.4, enlazador(5aa-15aa-5aa)
#7	rFW1.4, enlazador (5aa-15aa-5aa)
#8	rFW1.4, enlazador (5aa-15aa-5aa), VL-A: arginina en la posición AHo 50
#9	rFW1.4, enlazador (5aa-15aa-5aa), VL-A: arginina en la posición AHo 50, VH-B: serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, treonina en la posición AHo 144
#10	rFW1.4, enlazador (5aa-15aa-5aa), VL-A: arginina en la posición AHo 50, VH-A/-B: serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, treonina en la posición AHo 144
#11	rFW1.4, enlazador (5aa-20aa-5aa), VL-A: arginina en la posición AHo 50, VH-A/-B: serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, treonina en la posición AHo 144
#12	rFW1.4, enlazador (7aa-20aa-7aa), VL-A: arginina en la posición AHo 50, VH-A/-B: serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, treonina en la posición AHo 144
#13	rFW1.4, enlazador (3aa-20aa-3aa), VL-A: arginina en la posición AHo 50, VH-A/-B: serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, treonina en la posición AHo 144

La secuencia de la construcción expresada que tiene una combinación de enlazador 5-20-5 y serina en la posición AHo 12, treonina en la posición AHo 103, treonina en la posición AHo 114 fue:

```
MEVQLVESGGGVSQPGGSLRSLCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWQGQTTVTVSSGGGGSEIVMTQSPSTLSASVGD RVIITCQ
SSQSVYGNIMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQGNFNTGDR
YAFGQGTCLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVSQPGGSLRSLCTASGFTISRSYWICWVRQAP
GKGLEWVGCYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARLGYADYAYDLWGQGT'TV
TVSSGGGGSEIVMTQSPSTLSASVGD RVIITCQASEI IHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSG
SGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTCLTVLG (SEQ ID NO: 12).
```

10 Ejemplo 4

Caracterización de anticuerpos bivalentes y biespecíficos

Capacidad de producción

15 Las proteínas expresadas insolubles se replegaron y purificaron mediante cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC). La proteína resultante se caracterizó de acuerdo con su rendimiento de proteína purificada, en mg por litro de medio de cultivo. Este valor proporcionó una medida característica de la capacidad de producción de las moléculas respectivas. La pureza se definió en el contenido de monómero, excluyendo los agregados solubles, de muestras luego de la purificación de las proteínas replegadas. La pureza se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Los picos de monómeros y agregados solubles se resolvieron de especies no monoméricas usando columna TSKgel Super SW2000 (TOSOH Bioscience).

20 El porcentaje de proteína monomérica se calculó como el área del pico de monómero dividido por el área total de todos los picos del producto.

Medidas de termoestabilidad (FT-IR, DSC)

Las moléculas se concentraron hasta 3 mg/ml y el flujo se recolectó para la medida vacía. La lectura de FT-IR

(Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier) y la DSC (Calorimetría diferencial de barrido capilar) se realizaron para medir la estabilidad térmica. Los espectros de FT-IR se obtuvieron usando la célula Bio-ATR (reflexión total atenuada) de FT-IR en una máquina Tensor Bruker. Los perfiles de desnaturalización, que muestran cambios en la estructura secundaria se obtuvieron sometiendo las moléculas a prueba térmica con un gradiente de temperatura en etapas de 5 °C (25 °C a 95 °C). Todas las manipulaciones de espectros se realizaron usando el software OPUS. La normalización se realizó contra el fondo atmosférico (CO₂ y H₂O) transitorio y las muestras vacías. El espectro de proteína resultante fue corregido según el punto de referencia y el espectro de amida I se determinó del ancho del pico resuelto en la región esperada. Los segundos espectros derivados se obtuvieron para el espectro de banda de amida I usando una función polinómica de tercer grado con una función regularizadora. Los cambios en la estructura de proteína se estimaron mediante el segundo análisis de los derivados de amida I usando una curva de calibración lineal para los cálculos iniciales ajustados a la curva suponiendo la proteína desnaturalizada al 0 % para las 3 mediciones de temperatura baja y la proteína desnaturalizada al 100 % para las 3 mediciones de temperatura alta. Los perfiles de desnaturalización se usaron en puntos intermedios aproximados de las transiciones térmicas de desplegamiento (T_m) para cada variación aplicando un modelo sigmoidal de Boltzmann. Las mediciones de DSC también desplegaron térmicamente las muestras. El calorímetro diferencial de barrido (MicroCal capilar VP-DSC) usó un gradiente de temperatura de 200 °C/h. Se realizaron análisis de datos haciendo una reducción de referencia de la señal de regulador y normalización a la concentración de proteína respectiva en µM con una corrección del punto de referencia posterior, todas las manipulaciones se realizaron con el software MicroCal de la DSC. La T_m es la temperatura igualando el punto en el que se produce la mayor absorción de energía, que representó la temperatura de desplegamiento.

Prueba de estabilidad a corto plazo

Se examinó la proteína antes y después de dos semanas de incubación a 40 °C, para determinar la presencia de agregados solubles y productos de degradación. Las proteínas se concentraron en las siguientes concentraciones deseadas: 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, y 60 mg/ml. En el caso en que la proteína no sea lo suficientemente soluble para alcanzar las concentraciones deseadas, se analizaron las concentraciones posibles más altas. Se alcanzó la concentración más alta cuando la concentración adicional solo causó la precipitación sin aumento de concentración. Estas muestras se analizaron el día 0 y el día 14. Se realizaron análisis de pureza y bandas de degradación que surjan posiblemente en ambos momentos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12,5 %. Se evaluaron agregados y oligomeraciones solubles mediante cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño (SE)-HPLC, antes y después del período de incubación. Se resolvieron monómeros a partir de especies no monoméricas en una columna TSKgel Super SW2000 (TOSOH Bioscience) y el porcentaje de proteína monomérica se calculó como el área del pico de monómero dividido por el área total de todos los picos de productos. La concentración total se determinó por la medición de absorción de UV con 280 nm de longitud de onda usando un dispositivo de nanogotas. De esta manera, esta prueba de estabilidad a corto plazo evaluó propiedades como la solubilidad, estabilidad, agregación y oligomerización.

Resultados

Moléculas bivalentes que se unen a IL23:

Se analizaron formatos tipo scFv diferentes que se unen de forma bivalente a IL-23. Estas moléculas comprenden los dominios VH y VL que se unen a IL-23 como se describe en el Ejemplo 2, anterior. Todas las moléculas se caracterizaron de acuerdo con sus propiedades de producción, estabilidad térmica y estabilidad a corto plazo como se describió en los métodos.

Los formatos analizados incluyeron en particular:

Molécula #14: Diacuerpo (Db): VHA-Enlazador 1-VLB y VHB-Enlazador 2-VLA; (enlazador 1 y 2 = SEQ ID NO: 1);

Molécula #15: Diacuerpo de cadena simple (scDb): VHA-Enlazador 1-VLB-Enlazador3-VHB-Enlazador2-VLA; (enlazador 1 y 2 = SEQ ID NO: 1; enlazador 3 = SEQ ID NO: 4);

Molécula #16: scFv en tándem (TdscFv): VLA-Enlazador 3-VHA-Enlazador 1-VLB-Enlazador3-VHB; (enlazador 3 = SEQ ID NO: 4; enlazador 1 = SEQ ID NO: 1).

En todos estos formatos, VL -A y -B son idénticos, y la VH-A y -B son idénticos, produciendo de esta manera un anticuerpo bivalente que se une a IL-23.

La capacidad de producción de anticuerpos scDb y TdscFv en sistemas bacterianos está frecuentemente limitado por su rendimiento relativamente bajo y su tendencia a formar agregados. Sin embargo, todos los formatos evaluados se produjeron de manera eficiente mediante el replegamiento de cuerpos de inclusión purificados. Las proteínas replegadas fueron en su mayoría monoméricas luego de la purificación posterior mediante cromatografía preparativa de exclusión por tamaño, véase la Tabla 4. El TdscFv #16, mostró el rendimiento más alto pero la menor pureza de 89 %. Los Db #15 y scDb #14 tuvieron un rendimiento similar, y el scDb mostró la pureza más alta medida

ES 2 687 245 T3

como contenido monomérico por SE-HPLC.

Tabla 4

#	Rendimiento [mg/L]	pureza SE-HPLC [%]
#14	83,5	98
#15	88	92
#16	158	89

5 Todos los tres formatos mostraron una T_m similar, de aproximadamente 73 °C, cuando se midieron con la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

#	Apl. de T_m [°C]
#14	73,8
#15	73,1
#16	73,2

Se observaron diferencias sutiles en la T_m medida por FT-IR, véase la Tabla 6. De acuerdo con las medidas de DSC estos resultados confirmaron que los tres formatos son térmicamente estables.

10

Tabla 6

#	T_m [°C]
#14	70,3
#15	68,9
#16	67,1

15

Se analizaron la solubilidad y la estabilidad en una prueba de estabilidad a corto plazo, cuando las muestras se incubaron a 40 °C por un período de 14 días, véase la Tabla 7. Los Db #15 y los scDb #14 solo fueron solubles a una concentración de hasta aproximadamente 20 mg/ml, pero se mantuvieron con un alto contenido de monómero de aproximadamente 95 %, el día 14. Esto reflejó una estabilidad alta en este corto período de tiempo. El TDscFv #16 se disolvió en hasta 40 mg/ml, pero perdió contenido de monómero durante el período de 14 días, lo que resultó en un contenido de monómero del 66,6 %. Por lo tanto, este experimento demostró que los scDb #14 y Db #15 tendieron de manera reducida a la agregación en comparación con TdscFv #16 en estas condiciones.

Tabla 7

#	pureza SE-HPLC [%]	Conc. [mg/ml]
#14	95,6	23
#15	93,3	26
#16	66,1	40

20

Moléculas bivalentes que se unen a IL23, formato de scDb con característica marco:

Luego se analizaron variantes de scDb diferentes descritas en la Tabla 2, se unen de forma bivalente a IL-23. Todas las moléculas se caracterizaron de acuerdo con sus propiedades de producción, estabilidad térmica y estabilidad a corto plazo como se describió en los métodos.

- 5 Todas las moléculas scDb bivalentes se produjeron en este orden de dominio: VHA –Enlazador1-VLB-Enlazador3-VHB-enlazador2-VLA (enlazador 1 y 2 = SEQ ID NO: 1; y enlazador 3 = SEQ ID NO: 4), mientras que VL-A y -B eran idénticas, y VH-A y –B eran idénticas, con las sustituciones específicas resumidas en el Ejemplo 2, Tabla 2.

- 10 Todas las moléculas bivalentes basadas en el marco rFW1.4 fueron capaces de producirse bien, y las muestras fueron en su mayoría monoméricas luego de la purificación mediante cromatografía preparativa de exclusión por tamaño, véase la Tabla 8. El scDb #5 basado en el marco de consenso de línea germinal mostró un rendimiento de producción menor y contenido de monómero de la muestra purificada.

Tabla 8

#	Rendimiento [mg/L]	pureza SE-HPLC [%]
#5	19	61,6
#1	65	98
#3	65	99
#2	101	98
#4	40	98

- 15 Todas las moléculas bivalentes basadas en el marco rFW1.4 mostraron un Tm alto, de aproximadamente 73 °C, en la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) El scDb basado en el marco de consenso de línea germinal mostró el Tm más bajo, de 66 °C, véase la Tabla 9.

Tabla 9

#	Apl. de Tm [°C]
#5	66
#1	74,5
#3	73,6
#2	73,2
#4	73,4

- 20 Se observaron claras diferencias en la estabilidad y concentración máxima alcanzada entre las diferentes versiones de moléculas bivalentes de unión a IL-23, véase la Tabla 10. El scDb #5 basado en el consenso de línea germinal mostró un contenido de monómero disminuido de 44 %, luego de dos semanas de incubación a 40 °C. Las moléculas basadas en el marco rFW1.4 permanecieron en su mayoría monoméricas luego de dos semanas de incubación a 40 °C, y mostraron contenidos de monómero de 87-95 %.

- 25 La variante # 2, en la que la arginina se introdujo en la posición de residuo AHo 50 en ambos dominios VL, mostraron el mayor contenido de monómero luego de dos semanas de incubación a 40 °C en comparación con el #1, que tuvo una Lisina en ambos dominios VL en la posición de residuo 50. También, la variante #3, que contenía Serina en la posición AHo 12, la Treonina en la posición AHo 103, y la Treonina en la posición AHo 144 en ambos dominios VH mostraron mayor contenido de monómero, en comparación con el #1 luego de dos semanas de incubación a 40 °C. También, la combinación de estas sustituciones, scDb #4, resultó en una capacidad aumentada de concentración de proteína, lo que significó un aumento adicional de la solubilidad, véase la Tabla 10.
- 30

Tabla 10

#	pureza SE-HPLC [%]	Conc. [mg/ml]
#5	44,4	2
#1	87,5	2,1
#3	95,7	1,9
#2	90,1	35
#4	94,9	41

Moléculas biespecíficas que se unen a VEGF y TNF α :

5 Se analizaron las diferentes variantes de scDb que se unen biespecíficamente a VEGF y TNF α . Véase Ejemplo 3, Tabla 3 para estas diferencias entre las moléculas. Todas las moléculas se caracterizaron de acuerdo con sus propiedades de producción, estabilidad térmica y estabilidad a corto plazo.

10 Todas las moléculas scDb bivalentes fueron en este orden: VHA-enlazador 1-VLB-Enlazador3-VHB-enlazador2-VL-A. Los dominios VL-A y VH-A ensamblaron el fragmento de anticuerpo de unión a TNF α . Los dominios VL-B y VH-B ensamblaron el fragmento de anticuerpo de unión a VEGF. Las sustituciones y cambios introducidos en la secuencia de enlazador se resumieron específicamente en el Ejemplo 3, Tabla 3.

15 Es posible hacer todas las moléculas biespecíficas, pero alcanzaron diferentes rendimientos y contenidos de monómeros, véase la Tabla 11. Comparando la versión scDb #11, que contenía el enlazador 3 que consistía de 20 aa (SEQ ID NO: 4) a la versión #9, que contenía las mismas sustituciones pero solo diferían en el enlazador 3, (que es la SEQ ID NO: 3). La versión de ScDb #11 mostró un rendimiento y pureza aumentada, de 61 mg/ml con 75 %, mientras que scDb #9 solo tuvo un rendimiento de 7 mg/ml con una pureza de 34 %. Sustituciones adicionales en #10 aumentaron la pureza de manera significativa, cuando se compararon con la versión scDb sin ninguna sustitución #6.

Tabla 11

#	Rendimiento [mg/L]	pureza SE-HPLC [%]
#6	13	19
#7	6	72
#8	25	71
#9	7	34
#10	4	96
#11	62	75
#12	34	74
#13	11	69

20 Todas las moléculas scDb biespecíficas con sustituciones mostraron una T_m alta, de más de 72 °C, en la medición de DSC para la estabilidad térmica. Especialmente, cuando se compara con #6, la versión sin sustituciones, que solo alcanzó una T_m de 57,2 °C, véase la Tabla 12. El intercambio de estructuras de enlazador no cambiaron la estabilidad térmica. Estas variaciones scDb, #11, #12, y #13 también tuvieron una T_m de 74 °C.

Tabla 12

#	Apl. de Tm [°C]
#6	57,2
#7	72,1
#8	72,5
#9	74,2
#10	74,8
#11	74,8
#12	74,6
#13	75,4

5 Las variantes scDb biespecíficas, #11, #12, y #13, que tuvieron un enlazador 3 que consiste de 20aa (SEQ ID NO: 4), mostró una Tm de aproximadamente 69 °C, cuando se midió con FT-IR. Estos valores se compararon con la Tm de #9, de 66,2 °C, que contenían el enlazador 3 15aa (SEQ ID NO: 3). Estos resultados de estabilidad térmica mostraron que intercambiar el enlazador 3, de 15aa a 20aa aumentó la Tm de la molécula scDb, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13

#	Apl. de Tm [°C]
#9	66,2
#11	69,8
#12	68,9
#13	69,5

10 Se observaron diferencias claras en la solubilidad y estabilidad durante el proceso de concentración y luego de la incubación durante 14 días a 40 °C para las versiones scDb biespecíficas. Las sustituciones introducidas en las regiones FW aumentaron la solubilidad y estabilidad de las proteínas scDb, véase la Tabla 14. La versión #10, que tuvo sustituciones adicionales en VH-B, tuvo un contenido de monómero de 88 %, el día 14. Estos valores se comparan con #9 con 53 % de contenido de monómero y #6 con 19 % de contenido de monómero, el día 14. Estos resultados mostraron que la estabilidad se mejoró con estas sustituciones. Las moléculas se excluyeron de esta comparación, cuando la pureza fue mayor en el día 14 que en el día 0.

20 Intercambiar el enlazador 3 de la secuencia 15aa (SEQ ID NO: 3) a 20aa (SEQ ID NO: 4) llevó a una solubilidad y estabilidad aumentada de la molécula scDb, véase la Tabla 14. Las diferencias en la solubilidad y en la estabilidad de las moléculas #9 comparadas con #11, #12, y #13 respaldan esta conclusión. Las variantes de scDb, #9 y #11, #12, y #13 contenían las mismas sustituciones, pero diferentes secuencias de enlazador 3, véase Ejemplo 3, Tabla 3. La versión #11 de scDb con enlazador 3, 20aa (SEQ ID NO: 4) y enlazador 1 y 2, 5aa (SEQ ID NO: 1), mostraron un contenido de monómero de 81 % en una concentración de 40 mg/ml, mientras que, #9 solo alcanzaron 10 mg/ml con un contenido de monómero de 53 %, véase la Tabla 14.

Tabla 14

#	pureza SE-HPLC [%]	Conc. [mg/ml]
#6	19,3	5,5
#7	99,1	1,5 *
#8	92,5	8,7 *
#9	53,2	10 *
#10	88,8	1,5 +
#11	81,2	40
#12	83,7	40
#13	43,0	40

Listado de secuencias

<110> ESBATech - A Novartis Company GmbH

5 Riegler, Astrid

Borras, Leonardo

Sommavilla, Roberto

<120> ANTICUERPO ESTABLE DE UNIÓN A ANTÍGENOS MÚLTIPLES

<130> PCT84487FZ210

10 <150> US 61/549,482

<151> 2011-10-20

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> enlazador de péptidos sintéticos

20 <400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 2

<211> 7

- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> enlazador de péptidos sintéticos
- 5 <400> 2
- Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
- <210> 3
- <211> 15
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> enlazador de péptidos sintéticos
- <400> 3
- Gly Ser Asp Ser Asn Ala Gly Arg Ala Ser Ala Gly Asn Thr Ser
 1 5 10 15
- 15 <210> 4
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> enlazador de péptidos sintéticos
- <400> 4
- Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
- Gly Gly Gly Ser
 20
- <210> 5
- <211> 231
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> secuencia marco de anticuerpo sintético
- <220>
- 30 <221> CARACTERÍSTICAS_MISC
- <222> (24)..(73)

ES 2 687 245 T3

<223> Sitio de inserción de CDR de 1 a 50 aminoácidos; X cuando está presente puede ser cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (89)..(138)

5 <223> Sitio de inserción de CDR de 1 a 50 aminoácidos; X cuando está presente puede ser cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (171)..(220)

<223> Sitio de inserción de CDR de 1 a 50 aminoácidos; X cuando está presente puede ser cualquier aminoácido

10 <400> 5

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa
20 25 30

Xaa
35 40 45

Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa
100 105 110

Xaa Xaa

ES 2 687 245 T3

115 120 125

Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa
 180 185 190

Xaa
 195 200 205

Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230

<210> 6

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia marco de anticuerpo sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

10 <222> (26)..(75)

<223> Sitio de inserción de CDR de 1 a 50 aminoácidos; X cuando está presente puede ser cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (90)..(139)

15 <223> Sitio de inserción de CDR de 1 a 50 aminoácidos; X cuando está presente puede ser cualquier aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (172)..(221)

<223> Sitio de inserción de CDR de 1 a 50 aminoácidos; X cuando está presente puede ser cualquier aminoácido

20 <400> 6

ES 2 687 245 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa
 35 40 45
 Xaa
 50 55 60
 Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa
 100 105 110
 Xaa
 115 120 125
 Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa
 180 185 190
 Xaa
 195 200 205
 Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 7

5 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera sintética

10 <400> 7

ES 2 687 245 T3

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 8

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada sintética

10 <400> 8

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

ES 2 687 245 T3

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> cadena pesada sintética

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 112

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera sintética

<400> 10

ES 2 687 245 T3

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

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

Ile Trp Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
85 90 95

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

<210> 11

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada sintética

10 <400> 11

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

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

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

Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro Leu Tyr Ala Asn
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 495

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> construcción de anticuerpo sintético

<400> 12

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

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

ES 2 687 245 T3

Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp
 50 55 60
 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile
 115 120 125
 Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 130 135 140
 Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn Ile Trp
 145 150 155 160
 Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 165 170 175
 Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 180 185 190
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 195 200 205
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr Gly Asp
 210 215 220
 Arg Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro
 260 265 270
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser
 275 280 285
 Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 290 295 300

ES 2 687 245 T3

Glu Trp Val Gly Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 325 330 335
 Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 340 345 350
 Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr Asp Leu
 355 360 365
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 370 375 380
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 385 390 395 400
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 405 410 415
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 420 425 430
 Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 435 440 445
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 450 455 460
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
 465 470 475 480
 Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 485 490 495

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo de unión a antígenos múltiples que comprende:
- a) dos dominios variables de cadena pesada, uno con especificidad para el antígeno A (VH-A) y uno con especificidad para el antígeno B (VH-B), y
- 5 b) dos dominios variables de cadena ligera, uno con especificidad para el antígeno A (VL-A) y uno con especificidad para el antígeno B (VL-B),
- 10 en donde el anticuerpo de unión a antígenos múltiples carece de dominios constantes, los dos dominios variables de cadena pesada comprenden: una Serina en la posición AHo 12, una Serina o Treonina en la posición AHo 103, y una Serina o Treonina en la posición AHo 144; y en donde los dos dominios variables de cadena ligera comprenden una Arginina en la posición AHo 50, en donde VH-A está unido a VL-B por el enlazador peptídico 1 para formar una construcción VH-A/VL-B y VH-B se une a VL-A mediante un enlazador peptídico 2 para formar una construcción VH-B/VL-A, en donde los dos dominios variables de la cadena ligera son regiones variables de la cadena ligera de la familia Vkappa1 humana, y en donde los dos dominios variables de cadena pesada son regiones variables de la cadena pesada de la familia VH3 humana.
- 15 2. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, en donde la construcción VH-A/VL-B está en una orientación VH-A-(enlazador 1)-VL-B.
3. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, en donde la construcción VH-B/VL-A está en una orientación VH-B-(enlazador 2)-VL-A.
- 20 4. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, en donde el enlazador peptídico 1 y el enlazador peptídico 2 tienen cada uno de 1-10 aminoácidos, preferiblemente el enlazador peptídico 1 tiene la secuencia de GGGGS (SEQ ID NO: 1) y el enlazador peptídico 2 tiene la secuencia de GGGGS (SEQ ID NO: 1).
5. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, en donde la construcción VH-A/VL-B se une adicionalmente a la construcción VH-B/VL-A mediante el enlazador peptídico 3.
- 25 6. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 5, en donde el enlazador peptídico 3 tiene 10-30 aminoácidos, preferiblemente el enlazador peptídico 3 tiene la secuencia de (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 4).
7. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, que tiene el formato VH-A-SEQ ID NO: 1-VL-B-SEQ ID NO: 4-VH-B-SEQ ID NO: 1-VL-A.
8. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, en donde los dominios VH y los dominios VL comprenden las CDR de un lagomorfo.
- 30 9. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, en donde la Arginina en la posición AHo 50 de VL-A y/o VL-B se introduce por sustitución.
10. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, en donde al menos uno de Serina en la posición AHo 12, Serina o Treonina en la posición AHo 103 y Serina o Treonina en la posición AHo 144 de VH-A y/o VH-B se introducen por sustitución.
- 35 11. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1, en donde al menos uno de los dominios variables de cadena pesada comprende al menos tres de los siguientes: treonina (T) en la posición AHo 24, valina (V) en la posición AHo 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición AHo 56, lisina (K) en la posición AHo 82, treonina (T) en la posición AHo 84, valina (V) en la posición AHo 89 y arginina (R) en la posición AHo 108.
- 40 12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1.
13. El anticuerpo de unión a antígenos múltiples de la reivindicación 1 para uso en diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad.