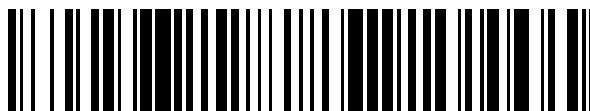


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 038**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/US2012/039469**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12162561**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12726532 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2714738**

54 Título: **Complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes y sus usos**

30 Prioridad:

24.05.2011 US 201161489249 P

10.02.2012 US 201261597714 P

14.03.2012 US 201261610831 P

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

13.03.2019

73 Titular/es:

**ZYNGENIA, INC. (100.0%)
21 First Field Road, Suite 200
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**ROSCHKE, VIKTOR;
LAFLEUR, DAVID;
HILBERT, DAVID M. y
KIENER, PETER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 704 038 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

Complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes y sus usos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a composiciones que contiene complejos multiespecíficos multivalentes y a composiciones que contienen complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes que tienen armazones, tales como anticuerpos, que soportan dichas funcionalidades de unión. La invención también se refiere, en general, a métodos para producir estas composiciones multiespecíficas y a los usos diagnósticos y terapéuticos de estas composiciones.

15 Antecedentes

En los últimos años, los esfuerzos para el descubrimiento de fármacos se han centrado en identificar agentes que modulan dianas individuales preseleccionadas. Sin embargo, los agentes dirigidos a dianas individuales normalmente muestran una eficacia limitada y malos perfiles de seguridad y resistencia, como resultado de la robustez, redundancia, comunicación cruzada, redes de señalización compensatorias y actividades de red de anti y contraseñalización asociadas con la diana terapéutica. Por consiguiente, se han dedicado cada vez más esfuerzos de descubrimiento de fármacos hacia el descubrimiento de nuevas terapias basadas en múltiples componentes.

25 El desarrollo de moléculas biespecíficas o multiespecíficas que actúan de manera selectiva simultáneamente sobre dos o más dianas ofrece una solución novedosa y prometedora para descubrir nuevos agentes multidiana orientados a sistemas que demuestren una eficacia y propiedades farmacológicas mejoradas frente a las monoterapias convencionales. Varios intentos para desarrollar moléculas multiespecíficas se han basado en dominios o subdominios similares a inmunoglobulinas. Por ejemplo, tradicionalmente, los anticuerpos biespecíficos se han preparado por unión química de dos anticuerpos monoclonales diferentes o por fusión de dos líneas celulares de hibridoma para producir un hibridoma híbrido. Otras tecnologías a base de dominios de tipo inmunoglobulina que han creado moléculas multiespecíficas y/o multivalentes incluyen dAb, diabodies, TandAbs, nanobodies, BiTEs, SMIPs, DNLs, Affibodies, Fynomer, dominios Kunitz, Albu-dabs, DARTs, DVD-IG, Covx-bodies, peptidocuerpos, scFv-Ig, SVD-Ig, dAb-Ig, botón en ojal, DuoBodies™ y triomAbs. Aunque cada una de estas moléculas puede unirse a una o más dianas, cada una presenta retos respecto de la retención de la función de Ig típica (por ejemplo, semivida, función efectora), la producción (por ejemplo, rendimiento, pureza), valencia, reconocimiento simultáneo de dianas y biodisponibilidad.

40 Otros intentos de generar moléculas multiespecíficas y multivalentes se han basado en armazones alternativos, basados en polipéptidos VASP, polipéptido pancreático de ave (aPP), tetranectina (basada en CTLD3), aflina (basada en γ B-cristalina/ubiquitina), knottinas, dominios SH3, dominios PDZ, tendamistat, transferrina, un dominio de repetición consenso de anquirina (por ejemplo, DARPIn), pliegues de proteína de lipocalina (por ejemplo, duocalinas), fibronectina (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2003/0170753 y 20090155275), un dominio de proteína A (por ejemplo, Affibodies), tiorredoxina. Otros intentos se han basado en armazones alternativos fusionados o asociados a polipéptidos de interés con albúmina (por ejemplo, ALBUdAb (Domantis/GSK) y ALB-Kunitz (Dyax)), secuencias de repetición no estructuradas de 3 o 6 aminoácidos (por ejemplo, la tecnología PASylation® y a tecnología XTEN®) y secuencias que contienen dominio de repetición similares a elastina (véase, por ejemplo, el documento WO2012/109624). Hasta la fecha, estas tecnologías han demostrado un potencial clínico limitado como plataformas robustas para desarrollar diversas composiciones terapéuticas multiespecíficas y multivalentes. El documento WO2009/08805 describe anticuerpos que contienen uno o más dominios de reconocimiento modular (MRD) usados para dirigir los anticuerpos a sitios específicos. También se describen el uso de los anticuerpos que contienen uno o más dominios de reconocimiento modular para tratar enfermedades y métodos para producir anticuerpos que contienen uno o más dominios de reconocimiento modular. En el documento US2003/236193 se describen péptidos que se unen a Ang-2, así como peptidocuerpos que comprenden los péptidos, métodos para producir dichos péptidos y peptidocuerpos y métodos de tratamiento que usan dichos péptidos y peptidocuerpos.

60 La complejidad genética de la mayoría de neoplasias malignas humanas y otros trastornos indican claramente que es improbable que la interferencia con una sola diana o vía asociada con estos trastornos produzca un beneficio terapéutico óptimo o sostenido. Por lo tanto, hay una gran necesidad de desarrollar agentes terapéuticos multiespecíficos y multivalentes, tales como anticuerpos multiespecíficos, que sean capaces de interferir con la actividad de múltiples dianas y/o mecanismos de señalización a fin de optimizar los beneficios terapéuticos de los tratamientos dirigidos hacia estos trastornos.

Breve resumen de la invención

La divulgación se refiere a composiciones que contienen complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes que tienen armazones, tales como anticuerpos, que soportan dichas funcionalidades de unión. Esto se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que las composiciones de unión multiespecíficas y multivalentes, tales como aquellas generadas usando la plataforma ZYBODY™ (Zyngenia, Inc.; véase, por ejemplo, la Publicación Internacional n.º WO 2009/088805) demuestran una actividad biológica sinérgica dramática en comparación con las combinaciones de monoterapia convencionales. Se espera que esta actividad sinérgica se extienda a nuevas terapias, para tratar o prevenir el cáncer, enfermedades o trastornos del sistema inmunitario (por ejemplo, enfermedades autoinflamatorias, tales como, artritis reumatoide e IBD), el sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular (por ejemplo, apoplejía, enfermedad cardíaca), el sistema nervioso (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), enfermedades infecciosas (por ejemplo, VIH) y otras enfermedades o trastornos descritos en el presente documento o de otro modo conocidos en la técnica.

La presente invención se refiere a un dominio de reconocimiento modular (MRD), en donde el MRD es un péptido capaz de unirse a ANG2 y en donde el MRD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16.

Preferentemente, el MRD está unido operablemente a un anticuerpo. El anticuerpo puede unirse a VEGF (es decir, VEGFA), VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IMC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TNF, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL1, IL1beta, IL6, IL8, IL18, HGF, PDGFA, PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Notch 1, DLL4, EGFL7, $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha v\beta 3$ integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAU, VCAM1, PDGFRA o PDGFRB. Preferentemente, el anticuerpo se une a TNF. El anticuerpo puede ser adalimumab. El anticuerpo puede competir con adalimumab por la unión a TNF.

La invención también proporciona una composición farmacológica que comprende el complejo de la invención. También se proporcionan complejos de la invención que comprenden un MRD unido operablemente a un anticuerpo para su uso en un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria. La enfermedad autoinmunitaria puede seleccionarse entre tratamiento de la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, diabetes, colitis ulcerosa o esclerosis múltiple. También se proporcionan complejos de la invención que comprenden un MRD unido operablemente a un anticuerpo que se une a TNF para su uso en un método para tratar la artritis. Los complejos pueden usarse con un inhibidor de proteína cinasa.

La divulgación describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente a un paciente que lo necesite. La divulgación también describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo multivalente y multiespecífico que contiene MRD a un paciente que lo necesite.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para tres o más dianas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para cuatro o más dianas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para cinco o más dianas. AL menos 1, 2, 3, 4 o más de las dianas pueden estar ubicadas en una superficie celular. Al menos 1, 2, 3, 4 o más de las dianas pueden ser dianas solubles (por ejemplo, quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a 1, 2, 3, 4 o más de las dianas descritas en el presente documento.

Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con el cáncer. Las dianas a las que puede unirse la composición multiespecífica monovalente y multivalente están asociadas con 1, 2, 3, 4 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con el cáncer.

Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. Las dianas a las que puede unirse la composición multiespecífica monovalente y multivalente están asociadas con 1, 2, 3, 4 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario.

Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa. Las dianas a las que se une la composición multiespecífica monovalente y multivalente pueden estar asociadas con 1, 2, 3, 4, 5 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas descritas en el presente documento.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para tres o más dianas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para cuatro o más

dianas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para cinco o más dianas.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para tres o más dianas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para cuatro o más dianas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para cinco o más dianas. AL menos 1, 2, 3, 4 o más de las dianas pueden estar asociadas con la membrana celular. Al menos 1, 2, 3, 4 o más de las dianas pueden ser dianas solubles (por ejemplo, quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a 1, 2, 3, 4 o más de las dianas descritas en el presente documento.

Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con el cáncer. Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con 1, 2, 3, 4 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con el cáncer.

Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. Las dianas a las que se une la composición multiespecífica monovalente y multivalente pueden estar asociadas con 1, 2, 3, 4 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a (1) una diana en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno asociado con tumores en una célula tumoral, una célula inmunitaria, una célula enferma o un agente infeccioso) y a (2) una diana en una célula efectora. La unión a una o más dianas por parte de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede dirigir una respuesta inmunitaria hacia una célula, tejido, agente infeccioso u otra ubicación de interés en un paciente. La célula efectora puede ser un leucocito, tal como un linfocito T o un linfocito citolítico natural. La célula efectora puede ser una célula accesoria, tal como una célula mieloide o una célula dendrítica.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a (1) una diana en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno asociado con tumores en una célula tumoral, una célula inmunitaria, una célula enferma o un agente infeccioso) y a (2) una diana en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T. La unión a una o más dianas por parte de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede dirigir una respuesta inmunitaria hacia un agente infeccioso, célula, tejido u otra ubicación de interés en un paciente. Por ejemplo, la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana en la superficie de un linfocito T. La composición puede unirse a una diana de CD3 seleccionada entre CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD3 zeta, TCR alfa, TCR beta y multímeros de proteínas en el complejo CD3 (TCR). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD2. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana expresada en un linfocito citolítico natural. Por lo tanto, la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana seleccionada entre: CD2, CD56 y CD161.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana expresada en una célula accesoria (por ejemplo, mieloide). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana seleccionada entre: CD64 (es decir, Fc gamma RI), una clase 2 del MHC y su cadena invariante, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede tener un solo sitio de unión (es decir, es monovalente) para una diana. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para una diana en un leucocito, tal como un linfocito T (por ejemplo, CD3) y múltiples sitios de unión (es decir, es multivalente) para una diana en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno asociado a tumores en una célula tumoral, tal como una diana divulgada en el presente documento). La composición multiespecífica puede contener sitios de unión individuales para 2 dianas diferentes (es decir, se une de manera monovalente a más de una diana diferente). La célula o el tejido de interés puede ser una célula cancerosa, célula inmunitaria, célula enferma o un agente infeccioso.

Una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede tener un solo sitio de unión para CD3. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para CD3 y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes (por ejemplo, un antígeno tumoral u otra diana divulgada en el presente documento). La composición multiespecífica puede tener un solo sitio de unión para CD3 y un solo sitio de unión para una diana diferente (es decir, se une de manera monovalente a CD3 y a una diana diferente). Una composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para CD3. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para CD3 épsilon y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes (por ejemplo, un antígeno tumoral u otra diana divulgada en el presente documento). La composición multiespecífica puede tener un solo sitio de unión para CD3 épsilon y un solo sitio de unión para una diana diferente (es decir, se une de manera monovalente a CD3 épsilon y a una diana diferente). La composición multiespecífica multivalente y

monovalente puede tener múltiples sitios de unión para una diana en una célula cancerosa seleccionada entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer de tiroides.

5 La divulgación describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente que tiene un solo sitio de unión para una diana (es decir, que se une de manera monovalente a una diana) a un paciente que lo necesite. La composición multiespecífica multivalente y monovalente administrada puede tener un solo sitio de unión para una
10 diana en un leucocito, tal como un linfocito T (por ejemplo, CD3). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para una diana en un leucocito, tal como un linfocito T (por ejemplo, CD3) y múltiples sitios de unión para (es decir, es capaz de unirse de manera multivalente a) una diana ubicada en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral). La composición multiespecífica puede tener un solo sitio de unión para una diana en un leucocito (por ejemplo, CD3) y un solo sitio
15 de unión para una diana diferente. La célula de interés puede ser una célula tumoral de un cáncer seleccionado entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer de tiroides. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener múltiples sitios de unión para una diana en un tumor neurológico. El tumor neurológico puede ser un glioma (por ejemplo, un glioblastoma, glioblastoma multiforme (GBM) y astrocitoma), ependimoma, oligodendroglioma, neurofibroma, sarcoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo, adenoma hipofisario, neuroblastoma o cáncer de las meninges (por ejemplo, meningioma, meningiosarcoma y gliomatosis).

La divulgación describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno administrando a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) que tiene un solo sitio de unión para una diana (es decir, que se une de manera monovalente a una diana) y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener sitios de unión individuales para 2 dianas diferentes. La
25 composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener múltiples sitios de unión para una diana en una célula cancerosa seleccionada entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer de tiroides.

La divulgación describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno administrando a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) que tiene un solo sitio de unión para CD3 (por ejemplo, CD3 épsilon) que se une de manera monovalente a CD3 y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes ubicadas en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral). La composición multiespecífica multivalente y monovalente administrada puede tener un solo sitio de unión para CD3 (por ejemplo, CD3 épsilon) y
35 un solo sitio de unión para una diana diferente y también tiene múltiples sitios de unión para una diana ubicada en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener múltiples sitios de unión para una diana en una célula cancerosa seleccionada entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer de tiroides.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede tener un solo sitio de unión para (es decir, se une de manera monovalente a) una diana de la superficie celular que requiera de multimerización para la señalización. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para un receptor de factor de crecimiento. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. La composición multiespecífica puede tener adicionalmente un solo sitio de unión para una diana diferente (es decir, se une de manera monovalente a más de una diana diferente).

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a una diana asociada con un sistema de transporte mediado por receptores de la barrera hematoencefálica (BBB) y es capaz de cruzarla hasta el lado cerebral (fluido cefalorraquídeo) de la BBB. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener dos o más sitios de unión para un antígeno diana asociado con un sistema de transporte mediado por receptores de la BBB endógenos. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para una diana asociada con un sistema de transporte mediado por receptores de la BBB (por ejemplo, los sistemas de transporte mediados por el receptor de insulina, el receptor de transferrina, el receptor de leptina, el receptor de lipoproteína y el receptor de IGF). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse además a 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas ubicadas en el lado cerebral de la BBB. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas asociadas con una enfermedad o trastorno neurológico. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar un cáncer cerebral, un cáncer metastásico del cerebro o un cáncer primario del cerebro. La

composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar una lesión cerebral, apoplejía, lesión de la médula espinal o para controlar el dolor.

Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa. La diana a la que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede estar asociada con 1, 2, 3, 4, 5 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con una o más de las enfermedades o trastornos anteriores. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas descritas en el presente documento.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede ser un ZYBODY™ (citado en el presente documento como un "anticuerpo que contiene MRD", o similares). El anticuerpo que contiene MRD puede contener sitios de unión para tres o más dianas. El anticuerpo que contiene MRD puede contener 2 sitios de unión para cuatro o más dianas. El anticuerpo que contiene MRD puede contener 2 sitios de unión para cinco o más dianas.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener 2 sitios de unión para tres o más dianas. La composición multiespecífica (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener 2 sitios de unión para cuatro o más dianas. La composición multiespecífica (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener 2 sitios de unión para cinco o más dianas. Al menos 1, 2, 3, 4 o más de las dianas pueden estar ubicadas en una superficie celular. Al menos 1, 2, 3, 4 o más de las dianas pueden ser dianas solubles (por ejemplo, quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas descritas en el presente documento.

Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) pueden estar asociadas con el cáncer. Las dianas a las que se une un anticuerpo que contiene MRD pueden estar asociadas con 1, 2, 3, 4 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con el cáncer.

Una diana a la que se une una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede estar asociada con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. Las dianas a las que se une el anticuerpo que contiene MRD pueden estar asociadas con 1, 2, 3, 4, 5 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario.

Una diana a la que se une una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede estar asociada con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa. Una diana a la que se une el anticuerpo que contiene MRD puede estar asociada con 1, 2, 3, 4 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con una o más de las enfermedades o trastornos anteriores. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 1, 2, 3, 4 o más de las dianas descritas en el presente documento.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la divulgación (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) proporcionan la capacidad de actuar de manera específica sobre múltiples dianas (por ejemplo, receptores y dianas asociadas con el microambiente) que tienen, por ejemplo, mecanismos de acción diferentes, solapantes o redundantes asociados con la etiología o la fisiopatología de una enfermedad o trastorno.

La divulgación abarca una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) que se asocia de manera covalente o de otro modo a un agente citotóxico. El agente citotóxico puede estar unido covalentemente a un anticuerpo que contiene MRD por medio de un enlazador. El agente citotóxico puede ser un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de la misma), un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado) o un profármaco. Las composiciones de la divulgación están unidas opcionalmente al agente citotóxico por medio de un enlazador. Un enlazador que une la composición multiespecífica multivalente y monovalente y el agente citotóxico puede ser escindible por una proteasa. Un enlazador que une la composición multiespecífica multivalente y monovalente y el agente citotóxico puede ser escindible en condiciones de bajo pH o reductoras. Los métodos para usar las composiciones de composición-agente citotóxico de la divulgación (por ejemplo, conjugados de anticuerpo que contiene MRD-fármaco) también se encuentran abarcados por la divulgación.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas pueden asociarse de manera covalente o de otro modo con un agente citotóxico seleccionado entre, por ejemplo, una toxina, un agente quimioterapéutico, un resto de fármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico o profármaco), un antibiótico, un isótopo radiactivo, un ligando quelante (por ejemplo, DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA) y una enzima nucleolítica. El agente citotóxico puede seleccionarse entre auristatina y dolostatina, MMAE, MMAF y un derivado de maitansinoide (por ejemplo, DM1 (N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina), DM3 (N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina) y DM4 (N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina).

Puede administrarse una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) en combinación con un agente terapéutico multidiana. Puede administrarse una composición multiespecífica multivalente y monovalente en combinación con un inhibidor de proteína cinasa multidiana. Puede administrarse una composición multiespecífica multivalente y monovalente en combinación con un inhibidor de NFκB. Puede administrarse una composición multiespecífica multivalente y monovalente en combinación con un inhibidor de HDAC. Puede administrarse una composición multiespecífica multivalente y monovalente en combinación con un inhibidor de HSP70 o HSP90. Puede administrarse una composición multiespecífica multivalente y monovalente en combinación con quimioterapia.

Puede administrarse una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) en combinación con un agente terapéutico monoespecífico (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal).

Una composición multiespecífica multivalente y monovalente de la divulgación puede ser un anticuerpo de longitud completa que comprende al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD). El anticuerpo de longitud completa puede comprender múltiples MRD. El anticuerpo de longitud completa puede comprender más de un tipo de MRD (es decir, múltiples MRD que tienen especificidades iguales o diferentes). También se describen en la presente divulgación variantes y derivados de dichos complejos de anticuerpo.

Los MRD de los anticuerpos que contienen MRD pueden unirse operablemente a los anticuerpos en cualquier ubicación en el anticuerpo (por ejemplo, el extremo amino de la cadena pesada o la cadena ligera o el extremo carboxilo de la cadena pesada o la cadena ligera), puede unirse a los mismos extremos u otros diferentes y opcionalmente, están unidos entre sí o al anticuerpo por medio de un enlazador.

Los anticuerpos de los anticuerpos que contienen MRD pueden ser cualquier molécula de inmunoglobulina que se une a un antígeno y pueden ser de cualquier tipo, clase o subclase. El anticuerpo puede ser humanizado o humano. Los anticuerpos también pueden incluir modificaciones que no interfieren con su capacidad para unirse a antígenos. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden incluir modificaciones que aumentan la ADCC, reducen la ADCC, aumentan la CDC o reducen la CDC, que aumentan la semivida del anticuerpo o que reducen la semivida del anticuerpo, en comparación con el anticuerpo sin la modificación.

Los anticuerpos de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) de la divulgación pueden ser cualquier anticuerpo que se una a una diana con valor terapéutico o diagnóstico. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana validada. Los anticuerpos correspondientes a los anticuerpos que contienen MRD pueden encontrarse en ensayos clínicos para su aprobación regulatoria. Los anticuerpos correspondientes a los anticuerpos que contienen MRD pueden estar comercializados.

El anticuerpo puede unirse a un antígeno de superficie celular. El anticuerpo puede unirse a un factor angiogénico. El anticuerpo puede unirse a un receptor angiogénico.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana seleccionada entre: EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor de factor I de crecimiento de tipo insulina, VEGF, VEGF-R y antígeno de membrana específico de próstata. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF, VEGFR1, EGFR, ErbB2, IGF-IR, cMET, FGFR1, FGFR2 y CD20.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a EGFR. El anticuerpo puede ser Erbitux®, nimotuzumab o zalutumumab (por ejemplo, Genmab). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo Erbitux® o inhibir de manera competitiva la unión del anticuerpo Erbitux® a EGFR. El anticuerpo puede ser el anticuerpo Erbitux®. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo Erbitux®, nimotuzumab, zalutumumab (por ejemplo, Genmab). El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede inhibir de manera competitiva la unión del anticuerpo Erbitux®, nimotuzumab, zalutumumab a EGFR.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a EGFR y a una diana seleccionada entre: HGF, CD64, CDCP1, RON, cMET, ErbB2, ErbB3, IGF1R, PLGF, RGMa, PDGFRa, PDGFRb, VEGFR1, VEGFR2, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), IGF1.2, IGF2, CD3, CD4, NKG2D y toxoide tetánico. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a EGFR. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse ser nimotuzumab, zalutumumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse ser Erbitux®.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2. El anticuerpo puede ser el anticuerpo HERCEPTIN® (trastuzumab) o inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo HERCEPTIN® (trastuzumab) a ErbB2.

El anticuerpo puede unirse a VEGF. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo AVASTIN® (bevacizumab) o inhibe de manera competitiva al anticuerpo AVASTIN®. El anticuerpo puede ser el anticuerpo AVASTIN®.

El anticuerpo puede unirse a una diana que está asociada con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. El anticuerpo puede unirse a TNF. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo HUMIRA® (adalimumab) o inhibe de manera competitiva al anticuerpo HUMIRA®. El anticuerpo puede ser el anticuerpo HUMIRA®. El anticuerpo puede unirse a TNF. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo SIMPONI™ (golimumab) o inhibe de manera competitiva al anticuerpo SIMPONI™. El anticuerpo puede ser el anticuerpo SIMPONI™.

El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana que está asociada con una enfermedad o trastorno del sistema metabólico, cardiovascular, musculoesquelético, neurológico o esquelético. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana que está asociada con una infección o enfermedad por levaduras, fúngica, vírica o bacteriana.

El MRD puede tener de aproximadamente 2 a 150 aminoácidos. El MRD puede tener de aproximadamente 2 a 60 aminoácidos. Los MRD pueden unirse a un anticuerpo u otros MRD directamente o a través de un enlazador. Los MRD pueden ser cualquier péptido de unión a dianas. La diana del MRD puede ser un factor soluble. La diana del MRD puede ser una proteína transmembrana, tal como un receptor de la superficie celular. La diana del MRD puede ser un antígeno celular. La diana del MRD puede ser CD20.

La diana del MRD puede ser una integrina. La secuencia peptídica del MRD que actúa de manera selectiva sobre la integrina puede ser YCRGDCT (SEQ ID NO: 3). La secuencia peptídica del MRD que actúa de manera selectiva sobre la integrina puede ser PCRGDCL (SEQ ID NO: 4). La secuencia peptídica del MRD que actúa de manera selectiva sobre la integrina puede ser TCRGDCY (SEQ ID NO: 5). La secuencia peptídica del MRD que actúa de manera selectiva sobre la integrina puede ser LCRGDCF (SEQ ID NO: 6).

La diana del MRD puede ser una citocina angiogénica. La secuencia peptídica del MRD que actúa de manera selectiva (es decir, unión) sobre la citocina angiogénica puede ser MGAQTNFMPMDLEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO: 7).

La diana del MRD puede ser ErbB2. La diana a la que se une el MRD puede ser ErbB3. La diana a la que se une el MRD puede ser un antígeno superficial asociado con tumores o una molécula de adhesión a células epiteliales (Ep-CAM).

La diana a la que se une el MRD puede ser VEGF. La secuencia de péptido del MRD que actúa de manera selectiva sobre el VEGF puede ser VEPNCDIHVMWEWECFERL (SEQ ID NO: 13).

La diana a la que se une el MRD puede ser un receptor de factor I de crecimiento de tipo insulina (IGF1R). Un MRD que actúa de manera selectiva sobre IGF1R incluye, por ejemplo, una secuencia de péptido que tiene la fórmula: NFYQCIDLLMAYPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 37);

La diana del MRD puede ser un antígeno tumoral. El "antígeno tumoral", tal como se usa en el presente documento, puede entenderse tanto como aquellos antígenos (que incluyen mutaciones) expresados exclusivamente en células tumorales (es decir, antígenos específicos de tumores) y aquellos antígenos expresados en células tumorales y células normales (por ejemplo, antígenos sobreexpresados en células tumorales).

La diana del MRD puede ser un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La diana del MRD puede ser un factor angiogénico. La diana del MRD puede ser un receptor de factor angiogénico.

El MRD puede ser un péptido de migración vascular.

La diana del MRD puede ser un factor de crecimiento nervioso.

El anticuerpo y/o MRD puede unirse a EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor del factor I de crecimiento insulínico o el antígeno de membrana específico de próstata.

La divulgación también se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo que contiene MRD. Un vector puede comprender una secuencia de polinucleótido que codifica un anticuerpo que contiene MRD. La secuencia de polinucleótido que codifica un anticuerpo que contiene MRD puede estar unida operablemente a una secuencia reguladora que controla la expresión en el polinucleótido. Una célula hospedadora puede comprender la secuencia de polinucleótido que codifica un anticuerpo que contiene MRD.

También se describen métodos para producir composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD), así como el uso de estas fusiones de MRD-anticuerpo en aplicaciones diagnósticas.

y terapéuticas. La presente divulgación también describe métodos para diseñar y producir composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen un anticuerpo de longitud completa que comprende un MRD. El MRD puede proceder de una biblioteca de presentación en fagos. El MRD puede proceder de ligandos naturales. El MRD puede proceder de la tecnología de presentación en levaduras o presentación de ARN.

La presente divulgación también describe un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto (paciente) que lo necesite, que comprende administrar un anticuerpo que comprende un MRD al sujeto (paciente). La enfermedad puede ser cáncer. Puede inhibirse la angiogénesis no deseada. Puede modularse la angiogénesis. Puede inhibirse el crecimiento tumoral.

La presente divulgación también describe métodos para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multispecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) a un paciente que lo necesite. La enfermedad, trastorno o lesión puede ser cáncer. La enfermedad, trastorno o lesión puede ser un trastorno del sistema inmunitario. El trastorno del sistema inmunitario puede ser inflamación. La enfermedad del sistema inmunitario puede ser una enfermedad autoinmunitaria. La enfermedad del sistema inmunitaria puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, diabetes, colitis ulcerosa y esclerosis múltiple. La enfermedad, trastorno o lesión puede ser una enfermedad metabólica. La enfermedad, trastorno o lesión puede ser una enfermedad infecciosa. La enfermedad infecciosa puede ser infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o SIDA, botulismo, ántrax o *Clostridium difficile*. La enfermedad, trastorno o lesión puede ser neurológica. La enfermedad, trastorno o lesión neurológica puede ser dolor. El dolor puede ser, dolor agudo o dolor crónico.

Se describe un método de tratamiento o prevención que comprende administrar un agente terapéutico adicional junto con un anticuerpo que comprende un MRD. Los métodos de tratamiento o prevención pueden comprender administrar un anticuerpo que comprende más de un tipo de MRD.

Breve descripción de los dibujos/figuras

La FIG. 1 muestra la representación esquemática de diferentes diseños de moléculas multispecíficas y multivalentes. Los MRD se representan como triángulos, círculos, rombos y cuadrados.

La FIG. 2A muestra un peptidocuerpo típico en forma de una fusión C-terminal con la cadena pesada de Fc.

La FIG. 2B muestra un anticuerpo que contiene MRD con una fusión de MRD C-terminal con la cadena ligera del anticuerpo.

La FIG. 2C muestra un anticuerpo que contiene MRD con una fusión de MRD N-terminal con la cadena ligera del anticuerpo.

La FIG. 2D muestra un anticuerpo que contiene MRD con péptidos MRD únicos fusionados a cada extremo del anticuerpo.

La FIG. 3 representa los resultados de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en el que se unió a integrina y a Ang2 un anticuerpo anti-integrina (JC7U) fusionado a un MRD que se dirige a Ang2 (2xCon4).

La FIG. 4 representa los resultados de un ELISA en el que se unió a integrina y a Ang2 un anticuerpo anti-integrina (JC7U) fusionado a un MRD que se dirige a Ang2 (2xCon4).

La FIG. 5 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un anticuerpo anti-ErbB2 a un MRD que está dirigido a Ang2.

La FIG. 6 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a Ang2 a un anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (cMET).

La FIG. 7 de referencia representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 8 de referencia representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina a un anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.

La FIG. 9 de referencia representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 10 de referencia representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a VEGF a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 11 de referencia representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina a un anticuerpo catalítico.

La FIG. 12 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a Ang2 a un anticuerpo catalítico.

La FIG. 13 representa los resultados de un ELISA en el que se fusionaron un MRD que se dirigía a integrina y un MRD que se dirigía a Ang2 a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 14 de referencia representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 15 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina, a Ang2 o al receptor del factor I de crecimiento I de tipo insulina a un anticuerpo de unión a ErbB2 o al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos con un péptido enlazador largo.

La FIG. 16 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina, a Ang2 o al receptor del factor de crecimiento I de tipo insulina a un anticuerpo de unión a ErbB2 o al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos con un péptido enlazador largo.

La FIG. 17A representa las curvas de respuesta a la dosis de fusiones de MRD-proteína de unión a maltosa (MBP) evaluadas para dirigir la unión a Ang2.

La FIG. 17B indica las proteínas de fusión MRD-MBP ensayadas, la secuencia de aminoácidos del MRD y los valores de CE50 (calculada usando un ajuste de 4 parámetros). El motivo de secuencia MXD en los componentes MRD de las fusiones MRD-MBP se encuentra subrayado y los restos mutados se encuentran en **negrita y cursiva**.

La FIG. 18A representa los resultados de un ensayo para dirigir la unión de un zybody basado en el anticuerpo HERCEPTIN® (es decir, un MRD que contiene secuencias del anticuerpo HERCEPTIN®) anticuerpo-MRD y un anticuerpo HERCEPTIN® contra Her2 (ErbB2) Fc en presencia de Ang2 biotinilada. La unión se detectó con mAb anti-cadena kappa humana conjugado con HRP.

La FIG. 18B representa los resultados de un ensayo para la unión directa de un zybody basado en HERCEPTIN® (es decir, un MRD que contiene secuencias del anticuerpo HERCEPTIN®) y un anticuerpo HERCEPTIN® contra Her2 Fc en presencia de Ang2 biotinilada. La unión se detectó con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP).

La FIG. 19A representa los resultados de un ensayo para la unión directa de los anticuerpo-MRD y un anticuerpo AVASTIN® contra VEGF en presencia de Ang2 biotinilada. La unión se detectó con mAb anti-cadena kappa humana conjugado con HRP.

La FIG. 19B representa los resultados de un ensayo para la unión directa de los anticuerpo-MRD y un anticuerpo AVASTIN® contra VEGF en presencia de Ang2 biotinilada. La unión se detectó con estreptavidina conjugada a HRP.

La FIG. 20A representa los resultados de un ensayo de citometría de flujo que demuestra que los anticuerpo-MRD se unen simultáneamente a Her2 y a Ang2 en células de cáncer de mama BT-474.

La FIG. 20B representa la unión de anticuerpo-MRD contra HER2 en células de cáncer de mama BT-474.

La FIG. 21 representa los resultados de un ensayo ELISA que demuestra el efecto inhibitorio de los anticuerpo-MRD en la unión de TIE-2 a Ang2 inmovilizado en placa.

La FIG. 22 representa los resultados de un ensayo de unión competitiva que demuestra la inhibición de la unión de anticuerpo biotinilado mediante un anticuerpo-MRD y anticuerpo no marcado.

La FIG. 23 representa los resultados de un ensayo de unión competitiva que ilustra la inhibición de la unión del anticuerpo marcado a células BT-474 por medio de anticuerpo-MRD y anticuerpo no marcado.

La FIG. 24A representa curvas de dosis ajustadas que ilustran la inhibición de la proliferación de células BT-474 mediante HERCEPTIN® con el MRD Im32 (SEQ ID NO: 8) fusionado a la cadena pesada y HERCEPTIN®.

La FIG. 24B representa curvas de dosis ajustadas que ilustran la inhibición de la proliferación de células BT-474 mediante HERCEPTIN® con el MRD Im32 fusionado a la cadena ligera y HERCEPTIN®.

La FIG. 24C representa curvas de dosis ajustadas que ilustran la inhibición de la proliferación de células BT-474 mediante HERCEPTIN® con el MRD 2xcon4 fusionado a la cadena pesada y HERCEPTIN®.

La FIG. 25A representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad que ilustra la eliminación mediada por ADCC de células BT-474 mediante HERCEPTIN® con el MRD Im32 fusionado a la cadena pesada, HERCEPTIN® con el MRD Im32 fusionado a la cadena ligera y HERCEPTIN®.

La FIG. 25B representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad que ilustra la eliminación mediada por ADCC de células BT-474 mediante HERCEPTIN® con el MRD 2xcon4 fusionado a la cadena pesada y HERCEPTIN®.

La FIG. 26A representa la proliferación de HUVEC mediante AVASTIN® con el MRD Im32 fusionado a la cadena pesada y AVASTIN® usando HUVEC obtenidas de GlycoTech (Gaithersburg, MD).

La FIG. 26B representa la proliferación de HUVEC mediante AVASTIN® con el MRD Im32 fusionado a la cadena pesada y AVASTIN® usando HUVEC obtenidas de Lonza.

La FIG. 27 representa el efecto de RITUXIMAB®, HERCEPTIN® y un anticuerpo que contiene MRD en el volumen tumoral *in vivo*.

La FIG. 28 representa el efecto aumentado de un anticuerpo que contiene MRD en la fosforilación de receptores y la activación de AKT, en comparación con el efecto de un anticuerpo en combinación con el MRD.

La FIG. 29A representa el efecto aumentado de un anticuerpo que contiene MRD biespecífico en la proliferación celular, en comparación con el efecto del anticuerpo en combinación con el MRD.

La FIG. 29B representa el efecto aumentado de un anticuerpo que contiene MRD pentaespecífico en la proliferación celular, en comparación con el efecto del anticuerpo en combinación con el MRD.

La FIG. 30 representa la eficacia aumentada de un anticuerpo HUMIRA que contiene un MRD de unión a Ang2 en un modelo de artritis, en comparación con HUMIRA.

La FIG. 31 muestra la inhibición de la señalización inducida por EGF en células SK-BR3 mediante zybodyes.

La FIG. 32 muestra la inhibición de la señalización inducida por herregulina en SK-BR3 mediante zybodyes.

La FIG. 33 muestra la inhibición de la señalización inducida por EGF y herregulina en células SK-BR3 mediante zybodyes.

La figura 34 muestra un diagrama de barras (A) y resultados de citometría de flujo (B) que representan la regulación negativa de la expresión de EGFR en células SK-BR3 mediante zybodyes.

La FIG. 35 muestra la regulación negativa de EGFR en células SKBR3 mediante zybodyes.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se proporciona una descripción de anticuerpos que contienen al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD). La unión de uno o más MRD a un anticuerpo da como resultado una molécula multiespecífica de la invención que conserva propiedades estructurales y funcionales de los anticuerpos tradicionales o de los anticuerpos con Fc optimizado y pueden sintetizarse fácilmente usando sistemas y técnicas de expresión de anticuerpos convencionales. El anticuerpo puede ser cualquier inmunoglobulina de unión a antígeno adecuada y los MRD pueden ser cualquier péptido de unión a diana adecuado. Los MRD pueden unirse operablemente en cualquier ubicación del anticuerpo y la unión puede ser directa o indirecta (por ejemplo, a través de un enlazador químico o polipeptídico). Las composiciones de anticuerpos que comprenden un MRD, los métodos para fabricar anticuerpos que comprenden un MRD y los métodos para usar anticuerpos que comprenden MRD también se describen en las secciones a continuación.

Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente, y no deben considerarse en modo alguno como limitantes de la materia objeto descrita.

Pueden usarse técnicas convencionales para la producción de moléculas de ADN recombinante, proteínas y anticuerpos, así como para el cultivo de tejidos y la transformación de células. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo normalmente de acuerdo con las especificaciones del fabricante o del modo que se llevan a cabo comúnmente en la técnica usando procedimientos convencionales, tales como los expuestos en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988) y Sambrook et al., *(Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)) o como se describe en el presente documento. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas conocidas y usadas en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación, el suministro y el tratamiento de pacientes.

I. Definiciones

Las expresiones "complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes", "complejos multivalentes y multiespecíficos", "anticuerpos que contienen MRD", "moléculas de anticuerpo-MRD", "moléculas de MRD-anticuerpo", "anticuerpos que comprenden un MRD" y "Zybodyes" se usan de manera indistinta en el presente documento y no abarcan un peptidocuerpo. Cada una de estas expresiones puede usarse en el presente documento para referirse a un "complejo" de la invención. Los complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes pueden contener MRD, anticuerpos, agentes citotóxicos y motivos de unión, además de MRD que se unen a una o más dianas. Por ejemplo, un complejo multiespecífico multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede contener una parte de o un derivado de, una secuencia de unión contenida en un anticuerpo (por ejemplo, un dominio de unión individual, un scFv, una región CDR) y/o también puede incluir un agente citotóxico (por ejemplo, un agente terapéutico). Dichas moléculas también se describen en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/481.063. Las expresiones "complejo(s) multiespecífico(s) multivalente(s) y monovalente(s)" y "complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes", tal como se usan en el presente documento, se refieren por tanto a composiciones que son capaces de unirse a 2 o más dianas y que contienen un sitio de unión y/o múltiples sitios de unión para diferentes epítopos. Por lo tanto, se pretende que este término incluya complejos que contienen múltiples sitios de unión para cada epítipo diferente al que se une el complejo o como alternativa, complejos que contienen al menos un solo sitio de unión para un epítipo diferente. Los diferentes epítopos pueden encontrarse en dianas iguales o diferentes. Los complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes pueden ser multivalentes y multiespecíficos y por lo tanto, pueden unirse a dos o más dianas y tener dos o más sitios de unión para cada una de las dianas a las que se une el complejo. Los complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes también pueden tener uno (o más) sitios de unión individuales para una (o más) diana(s) y múltiples sitios de unión para otras dianas y por consiguiente, estos complejos son monovalentes (con respecto a los sitios de unión individuales), multivalentes y multiespecíficos. Además, los complejos multiespecíficos multivalentes y monovalentes pueden ser monovalentes y multiespecíficos y por lo tanto, contener únicamente sitios de unión individuales para dos o más dianas diferentes.

La expresión "complejo de fármaco-complejo multiespecífico multivalente y monovalente" o "anticuerpo que contiene MRD-agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un complejo multiespecífico multivalente y monovalente que contiene uno o más agentes citotóxicos.

La expresión "agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células, incluyendo, por ejemplo, una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o que provoca la destrucción de células. Se pretende que este término incluya un agente quimioterapéutico, un resto de fármaco (por ejemplo, una citocina o profármaco), un antibiótico, un isótopo radiactivo, un ligando quelante (por ejemplo, DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA), una enzima nucleolítica, una toxina, tal como una toxina de molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de estas toxinas. El agente citotóxico puede ser un miembro seleccionado entre: auristatina,

dolastatina, MMAE, MMAF, un derivado de maitansinoide (por ejemplo, DM1 (N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina), DM3 (N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina) y DM4 (N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina).

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento para referirse a moléculas de inmunoglobulina que pueden unirse a antígenos a través de un dominio de unión a antígeno (es decir, sitio de combinación de anticuerpo). El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, oligoclonales (mezclas de anticuerpos) y monoclonales, anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados. El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos humanos. Un anticuerpo puede comprender al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está formada por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está formada por una región variable de cadena ligera (en el presente documento abreviada como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena pesada homomérica (por ejemplo, anticuerpos de camélido) que carece del primer dominio de región constante (CH1) pero que conserva una cadena pesada por lo demás intacta y es capaz de unirse a antígenos a través de un dominio de unión a antígeno. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera en las fusiones de anticuerpo-MRD de la invención contienen un dominio de unión funcional que interactúa con un antígeno.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere normalmente a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de reaccionar inmunológicamente con un epítipo particular. Un anticuerpo monoclonal, por tanto, presenta típicamente una única afinidad de unión por cualquier epítipo con el que inmunorreacciona. Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo monoclonal" también puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo (es decir, una pluralidad de dominios variables), cada uno inmunoespecífico para un epítipo diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos implicados en el reconocimiento altamente específico y la unión de un determinante antigénico o epítipo o dos (en el caso de un anticuerpo monoclonal biespecífico). Esto contrasta con los anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a dichos anticuerpos preparados de diversos modos, incluyendo, pero sin limitación, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, levaduras y animales transgénicos.

Un "anticuerpo de doble especificidad" se usa en este documento para hacer referencia a una molécula de inmunoglobulina que contiene inmunoglobulinas de doble dominio variable, donde el dominio doble variable puede diseñarse a partir de dos anticuerpos monoclonales cualesquiera.

La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina procede de dos o más especies. Normalmente, la región variable de las cadenas tanto pesadas como ligeras corresponde a la región variable de anticuerpos procedentes de otras especies de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad y/o afinidad deseada, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos procedentes de otras especies (normalmente humanos) para evitar generar una respuesta inmunitaria en dicha especie.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias no humanas mínimas (por ejemplo, murinas). Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que se reemplazan los restos de la región determinante de la complementariedad (CDR) por restos de las CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la especificidad y/o afinidad deseadas (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)). En algunos casos, se reemplazan los restos de la región marco (FR) de Fv de una inmunoglobulina humana por los restos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad y/o afinidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de restos adicionales, ya sea en la región marco de Fv y/o dentro de los restos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno y normalmente dos o tres dominios variables que contienen la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana, mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.225.539, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi et al.,

BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly et al., Taniguchi *et al.*, documento EP 171496; Morrison et al., documento EP 173494, documento WO86/01533; documento WO8702671; Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); y Neuberger et al., Nature 314:268 (1985).

Como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana o una o más líneas germinales humanas e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo en, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.939.598 de Kucherlapati et al., Un anticuerpo humano se seguirá considerando "humano" incluso en caso de que se efectúen sustituciones de aminoácidos en el anticuerpo. Los ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanos se describen en: las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO98/24893, WO92/01047, WO96/34096 y WO96/33735; la Patente Europea n.º 0 598 877; las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318, 5.885.793, 5.916.771 y 5.939.598; y Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995).

Un "sitio de combinación de anticuerpo" es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo formada por regiones variables e hipervariables de cadena pesada y ligera que se une de manera específica a (reacciona inmunológicamente con) un antígeno. La expresión "reaccionar inmunológicamente" en sus diversas formas significa unión específica entre una molécula que contiene determinante antigénico y una molécula que contiene un sitio de combinación de anticuerpo, tal como una molécula de anticuerpo completo o una parte de la misma.

En los anticuerpos de origen natural, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias de aminoácidos cortas no contiguas que se posicionan de manera específica para formar el dominio de unión a antígeno a medida que el anticuerpo adopta su configuración tridimensional en un ambiente acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión a antígeno, denominados regiones "marco", muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β . Por lo tanto, las regiones marco actúan formando un armazón que posibilita el posicionamiento de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercadena no covalentes. El dominio de unión a antígeno (es decir, sitio de combinación de anticuerpo) formado por medio de las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo afín. Los aminoácidos que forman las CDR y las regiones marco, respectivamente, pueden identificarse fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera por un experto habitual en la materia, ya que se han definido de manera precisa (véase "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). "Anticuerpo humanizado" o "anticuerpo quimérico" incluye anticuerpos en que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas.

Las expresiones "linfocito T", "célula T", "células T" y "población de células T", se usan de manera indistinta en el presente documento para hacer referencia a una célula o células que presentan en su superficie uno o más antígenos característicos de los linfocitos T, por ejemplo, CD3 y CD11b. El término incluye la descendencia de un linfocito T o una población de linfocitos T. Un "linfocito T" o "célula T" incluye una célula que expresa CD3 en su superficie y un receptor de antígeno de linfocito T (TCR) capaz de reconocer antígenos cuando se presentan en la superficie de células autólogas o cualquier matriz presentadora de antígenos, junto con una o más moléculas del MHC o, una o más moléculas no clásicas del MHC. La expresión "linfocitos T" puede referirse a cualquiera de los linfocitos T, incluyendo, por ejemplo, linfocitos que tienen el fenotipo CD3⁺ (es decir, que expresan CD3 en la superficie celular).

Como se usa en el presente documento, CD3, se usa para referirse de manera individual o colectiva a una molécula expresada como parte del receptor de linfocitos T y que tiene un significado normalmente adscrito a la misma en la técnica. En los seres humanos, el término CD3 abarca todas las subunidades de CD3 conocidas, por ejemplo, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma y CD3 zeta (TCR zeta), así como CD3 alfa (TCR alfa) y CD3 beta (TCR beta) en forma individual o combinada de manera independiente.

El término "peptidocuerpo" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de un anticuerpo intacto completo. Un peptidocuerpo puede ser un dominio Fc de anticuerpo unido a al menos un péptido. Un peptidocuerpo no incluye las regiones variables de anticuerpo, un sitio de combinación de anticuerpo, dominios CH1 o dominios de región constante de cadena ligera de Ig.

La expresión "de origen natural" cuando se usa en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras y similares se refiere a aquellos que se encuentran en la naturaleza y no están modificados por el ser humano.

El término "dominio", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una parte de una molécula o estructura que comparte características físicas o químicas comunes, por ejemplo, dominios o propiedades hidrófobas, polares,

globulares o helicoidales, por ejemplo, un dominio de unión a proteína, un dominio de unión a ADN o un dominio de unión a ATP. Los dominios pueden identificarse según su homología con motivos estructurales o funcionales conservados.

5 Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que se reemplaza un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una tirosina por una fenilalanina es una sustitución conservativa. Las sustituciones conservativas en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la divulgación pueden no suprimir la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de anticuerpo a los antígenos a los que se une el polipéptido o anticuerpo. Los métodos para identificar sustituciones de nucleótidos y aminoácidos conservativas y sustituciones no conservativas que no eliminan la unión de polipéptido o antígeno se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem. 32*:1180-1187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng. 12*(10):879-884 (1999); y Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94*:412-417 (1997)).

20 Un "dominio de reconocimiento modular" (MRD) o "péptido de unión a diana" es una molécula, tal como una proteína, glucoproteína y similares, que puede unirse de forma específica (no aleatoria) a una molécula diana. La secuencia de aminoácidos de un MRD puede tolerar normalmente cierto grado de variabilidad y aun así conservar un grado de capacidad de unión a la molécula diana. Además, los cambios en la secuencia pueden provocar cambios en la especificidad de unión y en la constante de unión entre una molécula diana preseleccionada y el sitio de unión. El MRD puede ser un agonista de la diana a la que se une. Un MRD agonista se refiere a un MRD que en cierto modo, aumenta o potencia la actividad biológica de la proteína diana del MRD o tiene una actividad biológica comparable con un agonista conocido de la proteína diana del MRD. El MRD puede ser un antagonista de la diana a la que se une. Un antagonista de MRD se refiere a un MRD que bloquea o de cierto modo interfiere con la actividad biológica de la proteína diana del MRD o tiene una actividad biológica comparable con la de un antagonista o inhibidor conocido de la proteína diana del MRD.

35 "Receptor de superficie celular" se refiere a moléculas y complejos de moléculas que pueden recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un receptor de superficie celular de la presente divulgación es un receptor de integrina activado, por ejemplo, un receptor de integrina $\alpha v \beta 3$ activado en una célula metastásica. Como se usa en el presente documento, "receptor de superficie celular" también incluye una molécula expresada en una superficie celular que tiene la capacidad de unirse a un anticuerpo que contiene MRD de la invención.

40 Como se usa en el presente documento, un "sitio de unión a diana" o "sitio diana" es cualquier secuencia de aminoácidos conocida o aún por definir, que tiene la capacidad de unirse selectivamente a un agente preseleccionado. Los sitios diana de referencia ejemplares se obtienen de los ligandos de integrina dependientes de RGD, concretamente, fibronectina, fibrinógeno, vitronectina, factor de von Willebrand y similares, de receptores celulares, tales como ErbB2, VEGF, péptido de migración vascular o citocinas angiogénicas, de receptores de hormonas proteínicas, tales como receptor del factor I del crecimiento de tipo insulina, receptor del factor de crecimiento epidérmico y similares y de antígenos tumorales.

50 Los términos "epítipo" o "determinante antigénico" se usan de manera indistinta en el presente documento y se refieren a la porción de cualquier molécula que pueda reconocerse y unirse de manera específica a un agente de unión particular (por ejemplo, un anticuerpo o un MRD). Cuando la molécula reconocida es un polipéptido, pueden formarse epítipos a partir de aminoácidos contiguos y aminoácidos no contiguos y/u otros grupos de moléculas superficie químicamente activos (tales como carbohidratos) yuxtapuestos debido al plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan tras la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítipos formados mediante el plegamiento terciario normalmente se pierden tras la desnaturalización de la proteína. Un epítipo incluye normalmente al menos 3 y normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

60 Se dice que un anticuerpo, MRD, anticuerpo que contiene MRD u otra molécula "inhibe de manera competitiva" la unión de una molécula de referencia a un epítipo dado en caso de que se una a ese epítipo hasta tal punto que bloquea, en cierto modo, la unión de la molécula de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competición. Como se usa en el presente documento, puede decirse que un anticuerpo, MRD, anticuerpo que contiene MRD u otra molécula inhibe de manera competitiva la unión de la molécula de referencia a un epítipo dado, por ejemplo, en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 % o al menos un 50 %.

65 El término "proteína" se define como un polímero biológico que comprende unidades derivadas de aminoácidos ligados mediante enlaces peptídicos; una proteína puede estar compuesta de dos o más cadenas.

Un "polipéptido de fusión" es un polipéptido compuesto de al menos dos polipéptidos y opcionalmente una secuencia de unión para unir de forma funcional los dos polipéptidos en un polipéptido continuo. Los dos polipéptidos unidos en un polipéptido de fusión típicamente se obtienen de dos fuentes independientes y, por lo tanto, un polipéptido de fusión comprende dos polipéptidos unidos no encontrados normalmente unidos en la naturaleza. Los dos polipéptidos pueden estar unidos operablemente de manera directa mediante un enlace peptídico o pueden estar unidos indirectamente a través de un enlazador descrito en el presente documento o de otro modo conocido en la técnica.

La expresión "unido operablemente", como se usa en el presente documento, indica que dos moléculas están unidas de tal modo que cada una conserva actividad funcional. Dos moléculas están "unidas operablemente" ya se encuentren unidas directamente (por ejemplo, una proteína de fusión) o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlazador).

El término "enlazador" se refiere a un péptido ubicado entre el anticuerpo y el MRD o entre dos MRD. Los enlazadores pueden tener de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos o de aproximadamente 4 a 15 aminoácidos. Uno o más de estos aminoácidos pueden estar glucosilados, como se entiende bien por los expertos en la materia. Los 1 a 20 aminoácidos pueden seleccionarse entre glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. Un enlazador puede estar formado por una mayoría de aminoácidos que no presentan impedancia estérica, tales como glicina y alanina. Por lo tanto, el enlazador puede seleccionarse entre poliglicinas (tales como (Gly)₅, y (Gly)₈), poli(Gly-Ala) y polialaninas. El enlazador también puede ser un enlazador no peptídico, tal como un enlazador de alquilo o un enlazador de PEG. Por ejemplo, pueden usarse enlazadores de alquilo, tales como --NH--(CH₂)_s-C(O)--, en donde s=2-20. Estos enlazadores de alquilo pueden estar sustituidos además por un grupo que no aporta impedancia estérica, tal como alquilo inferior (por ejemplo, C₁-C₆), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH₂, fenilo, etc. Un enlazador no peptídico ilustrativo es un enlazador de PEG. El enlazador de PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 100 a 5000 kDa o de aproximadamente 100 a 500 kDa. Los enlazadores peptídicos pueden alterarse para formar derivados. El enlazador puede ser un enlazador no peptídico, tal como un enlazador de alquilo o un enlazador de PEG. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un MRD o agente citotóxico dentro de una célula o próximo a la célula.

"Célula diana" se refiere a cualquier célula en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un animal) que puede usarse como diana de una composición multiespecífica y multivalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) o un MRD de la invención. La célula diana puede ser una célula que expresa o sobreexpresa el sitio de unión diana, tal como un receptor de integrina activado.

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complemento) que da como resultado un daño selectivo sobre, la destrucción de o la eliminación en el cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en contraposición con las fases innata y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T, incluyendo linfocitos T citolíticos (CTL)), células citolíticas, células citolíticas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos). Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. Una célula efectora puede ser capaz de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos y macrófagos, que expresan FcR, están implicados en la eliminación específica de células diana y la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario o de la unión a células que presentan antígenos. Una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede estar regulada por factores humorales, tales como citocinas. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de Fc alfa RI está regulada positivamente por G-CSF o GM-CSF. Esta expresión potenciada aumenta la función efectora de las células que portan Fc alfa RI contra las dianas. Las funciones ejemplares de una célula efectora incluyen la fagocitosis o lisis de un antígeno diana o una célula diana.

"Célula diana" se refiere a cualquier célula o patógeno cuya eliminación podría ser beneficiosa en un paciente (por ejemplo, un ser humano o animal) y que puede usarse como diana por una composición (por ejemplo, anticuerpo) de la invención.

"Paciente", "sujeto", "animal" o "mamífero" se usan indistintamente y hacen referencia a mamíferos, tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales experimentales, tales como conejos, ratas y ratones y otros animales. Los animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles. El paciente puede ser un ser humano.

"Tratar" o "tratamiento" incluye la administración del anticuerpo que comprende un MRD de la presente invención para evitar o retardar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, afección o trastorno, aliviar los síntomas o detener o inhibir el desarrollo adicional de la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retardar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o supresión terapéutica o alivio de los síntomas después de la manifestación de la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento puede ser únicamente con la composición de anticuerpo-MRD, solo con el MRD o en combinación de cualquiera de los dos con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", o "fisiológicamente tolerable" y las variaciones gramaticales de las mismas, que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales tienen capacidad de administración en o sobre un ser humano sin la producción de efectos fisiológicos indeseables que impidan su uso terapéutico, tales como náuseas, mareos, molestias gástricas y similares.

"Modular" significa el ajuste o regulación de la amplitud, frecuencia, grado o actividad. En otro aspecto relacionado, dicha modulación puede estar modulada positivamente (por ejemplo, un aumento en la frecuencia, grado o actividad) o modulada negativamente (por ejemplo, una disminución en la frecuencia, grado o actividad).

"Cáncer," "tumor," o "neoplasia" se usan como términos sinónimos y se refieren a cualquiera de varias enfermedades que se caracterizan por una proliferación incontrolada y anómala de células, la capacidad de las células afectadas de propagarse de forma local o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del organismo (metastatizar), así como cualquiera de varios rasgos estructurales y/o moleculares característicos. Un "tumor canceroso" o "célula maligna" se entiende como una célula que tiene propiedades estructurales específicas, que carece de diferenciación y que tiene capacidad de invasión y metástasis. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse usando las fusiones de anticuerpo-MRD de la invención incluyen tumores sólidos y cánceres hematológicos. Los ejemplos adicionales de cánceres que pueden tratarse usando las fusiones de anticuerpo-MRD de la invención incluyen cáncer de mama, pulmón, cerebro, hueso, hígado, riñón, colon, cabeza y cuello, ovario, hematopoyético (por ejemplo, leucemia) y próstata. Los ejemplos adicionales de cánceres que pueden tratarse usando las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Entre los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cánceres de cabeza y cuello. Otros tipos de cáncer y tumores que pueden tratarse usando composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se describen en el presente documento o se conocen de otro modo en la técnica.

Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo, MRD o anticuerpo que contiene MRD, como se divulga en el presente documento, es una cantidad suficiente para lograr un fin indicado de manera específica a fin de provocar un cambio observable en el nivel de una o más actividades biológicas relacionadas con la célula diana a la que se une el anticuerpo, el MRD o el anticuerpo que contiene MRD. El cambio puede aumentar el nivel de actividad de la diana. El cambio puede reducir el nivel de actividad de la diana. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria, en relación con el fin indicado.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, MRD, anticuerpo que contiene MRD, otro fármaco multivalente y multispecífico de la invención u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un paciente o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir la angiogénesis y la neovascularización; reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto o detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral o la incidencia de tumores; estimular respuestas inmunitarias contra células cancerosas y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición en el presente documento de "tratar". Una "cantidad terapéuticamente eficaz" también puede referirse a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención puede variar dependiendo de factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo y de la capacidad de la composición para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales de la composición terapéutica se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado.

Normalmente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos (pacientes) antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

En los casos descritos en términos de un grupo de Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente invención abarca no solo el grupo completo listado como un todo, sino también cada miembro del grupo de manera individual y todos los subgrupos del grupo principal y también el grupo principal en el que faltan uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención divulgada y/o reivindicada.

II. Dominios de reconocimiento modular (MRD)

La presente divulgación describe una estrategia basada en la adaptación de péptidos de unión diana o dominios de reconocimiento modular (MRD) en forma de fusiones a anticuerpos catalíticos o no catalíticos.

En los casos donde el componente de anticuerpo de la fusión de MRD-anticuerpo sea un anticuerpo catalítico, las fusiones de MRD-anticuerpo pueden posibilitar un direccionamiento eficaz a células tumorales o a moléculas solubles, a la vez que se conserva intacta la capacidad de activación de profármaco del anticuerpo catalítico. Los MRD también pueden ampliar la capacidad de unión de anticuerpos no catalíticos proporcionando una estrategia eficaz para ampliar la funcionalidad de unión de los anticuerpos, particularmente con fines terapéuticos.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere al desarrollo de un anticuerpo de longitud completa que comprende al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD). El anticuerpo de longitud completa puede comprender más de un MRD, en donde los MRD tienen especificidades iguales o diferentes. Además, un solo MRD puede estar formado por una repetición en tándem de la misma secuencia de aminoácidos u otra diferente que puede permitir la unión de un solo MRD a múltiples dianas y/o a un epítipo repetitivo en una diana dada.

La interacción entre un ligando proteínico y su sitio de receptor diana a menudo tiene lugar en una superficie de contacto relativamente grande. Sin embargo, únicamente unos pocos restos clave en la superficie de contacto contribuyen a la mayor parte de la unión. Los MRD pueden imitar la unión del ligando. El MRD puede imitar la actividad biológica de un ligando (un MRD agonista) o mediante unión competitiva, inhibir la bioactividad del ligando (un MRD antagonista). Los MRD en las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) también pueden afectar a las dianas de otras maneras, por ejemplo, neutralizando, bloqueando, estabilizando, agregando o entrecruzando la diana del MRD.

Se contempla que los MRD de la presente invención contendrán por lo general una secuencia de péptido que se une a sitios diana de interés y tienen una longitud de aproximadamente 2 a 150 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 125 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 100 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 90 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 80 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 70 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 60 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 50 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 40 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 30 aminoácidos o de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos. También se contempla que los MRD tengan una longitud de aproximadamente 10 a 150 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 125 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 100 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 90 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 80 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 70 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 60 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 50 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 40 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 30 aminoácidos o de aproximadamente 10 a 20 aminoácidos. Además, se contempla que los MRD tengan una longitud de aproximadamente 20 a 150 aminoácidos, de aproximadamente 20 a 125 aminoácidos, de aproximadamente 20 a 100 aminoácidos, de aproximadamente 20 a 90 aminoácidos, de aproximadamente 20 a 80 aminoácidos, de aproximadamente 20 a 70 aminoácidos, de aproximadamente 20 a 60 aminoácidos, de aproximadamente 20 a 50 aminoácidos, de aproximadamente 20 a 40 aminoácidos o de aproximadamente 20 a 30 aminoácidos. Los MRD pueden tener una longitud de aproximadamente 2 a 60 aminoácidos. Los MRD pueden tener una longitud de aproximadamente 10 a 60 aminoácidos. Los MRD pueden tener una longitud de aproximadamente 10 a 50 aminoácidos. Los MRD pueden tener una longitud de aproximadamente 10 a 40 aminoácidos. Los MRD pueden tener una longitud de aproximadamente 10 a 30 aminoácidos.

Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden tener una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden tener una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-5} M. Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden tener una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-8} M. Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden tener una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-9} M. Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que

contienen MRD) pueden tener una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-10} M. Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden tener una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-11} M. Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que

5 contienen MRD) pueden tener una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-12} M.

Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a sus dianas con una velocidad de disociación (k_{off}) de menos de $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-3} s^{-1} . Más preferentemente, uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se unen a sus dianas con una velocidad de disociación (k_{off}) de menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-7} s^{-1} .

10

Uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a sus dianas con una velocidad de asociación (k_{on}) de menos de $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Más preferentemente, uno o más de los componentes de MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se une a sus dianas con una velocidad de asociación (k_{on}) de menos de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

15

Los MRD pueden ser affibodies. Los affibodies representan una clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de proteína de 58 restos de aminoácidos procedente de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Este dominio de ovillo de tres hélices se ha usado como armazón para la construcción de bibliotecas de fagémidos combinatorias, a partir de las cuales pueden seleccionarse de manera rutinaria variantes de affibody que se unen a una molécula diana deseada, tal como una o más de las dianas divulgadas en el presente documento, usando tecnología de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Nord et al., Nat. Biotechnol. 15:772-7 (1997) y Ronmark et al., A, Eur. J. Biochem. 2002; 269:2647-55). Se proporcionan detalles adicionales de Affibodies y métodos de producción de los mismos por referencia a la Patente de los Estados Unidos n.º 5.831.012.

20

Un MRD de la invención (por ejemplo, un MRD en un anticuerpo que contiene MRD) puede contener uno o más restos de aminoácidos o secuencias de restos de aminoácidos (incluyendo derivados, análogos y miméticos de las mismas) que se dirigen preferencialmente mediante químicas u otros procesos que unen de manera covalente o no covalente una entidad molecular al MRD, en comparación con, el MRD sin las secuencias dirigidas de manera preferencial o el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del MRD puede contener uno o más restos que tienen una cadena lateral reactiva (por ejemplo, cisteína o lisina) que permite el enlace selectivo o preferencial del MRD a agentes citotóxicos (por ejemplo, conjugados de fármaco y profármaco, toxinas y ligandos bioactivos) o agentes de obtención de imágenes.

30

El uso de estos MRD de "enlace" para armar un anticuerpo que comprende MRD con una "carga" supera varios de los problemas asociados con la desestabilización del anticuerpo y la reducción de la actividad del anticuerpo que se han observado frecuentemente usando métodos convencionales para generar inmunotoxinas. El componente de "carga" de un complejo de anticuerpo que comprende MRD de la invención puede ser cualquier composición que confiera un efecto terapéutico, diagnóstico o pronóstico beneficioso o que demuestre una ventaja en la fabricación, purificación o formulación de un anticuerpo que contiene MRD. La carga puede ser un fármaco quimioterapéutico o un profármaco, tal como, doxorubicina o un fármaco de tipo maitansinoide. La carga puede ser otro MRD, una toxina, un fármaco quimioterapéutico, una enzima catalítica, un profármaco, un núclido radiactivo, un quelante (por ejemplo, para el acoplamiento de lantánidos) u otro componente de las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención como se describen en el presente documento.

40

El MRD puede no contener un dominio de unión a antígeno u otro dominio de anticuerpo, tal como una región constante, una región variable, una región determinante de la complementariedad (CDR), una región marco, un dominio Fc o una región bisagra. El MRD puede no contener un dominio de unión a antígeno. El MRD puede no contener tres CDR. El MRD puede no contener la CDR1 y la CDR2. El MRD puede no contener la CDR1. El MRD puede no proceder de un ligando celular natural. El MRD puede no ser un radioisótopo. El MRD puede no ser un marcador de expresión de proteínas, tal como glutatión S-transferasa (GST), marcador His, Flag, hemaglutinina (HA), MYC o una proteína fluorescente (por ejemplo, GFP o RFP). El MRD puede no unirse a albúmina sérica. El MRD puede no ser una molécula pequeña que sea una citotoxina. El MRD puede no tener actividad enzimática. El MRD puede tener un efecto terapéutico cuando se administra solo y/o cuando se fusiona a un Fc en un paciente o modelo animal. El MRD puede tener un efecto terapéutico cuando se administra de manera repetida solo y/o cuando se fusiona a un Fc en un paciente o modelo animal (por ejemplo, 3 o más veces a lo largo de al menos seis meses).

50

El MRD puede estar restringido conformacionalmente. El MRD puede no estar restringido conformacionalmente. El MRD puede contener un resto de cisteína. El resto de cisteína en el MRD puede formar un enlace intercadena (por ejemplo, entre cisteínas dentro del mismo MRD, diferentes MRD unidos a péptidos y un MRD y un péptido unido a inmunoglobulina). Los MRD que participan en el enlace intercadena pueden estar asociados con un solo dominio de unión a diana de núcleo. Los MRD que participan en el enlace intercadena pueden estar asociados con múltiples

65

dominios de unión a diana de núcleo. El resto de cisteína en el MRD puede formar un enlace intercadena (por ejemplo, entre cisteínas de MRD no unidos a péptido o un MRD y una inmunoglobulina que no están unidos mediante un enlace peptídico). Los MRD asociados con el enlace intercadena pueden estar asociados con un solo dominio de unión a diana de núcleo (es decir, 2 MRD ubicados en diferentes cadenas polipeptídicas forman uno o más enlaces intercadena y de manera colectiva forman un sitio de unión a diana). Por lo tanto, por ejemplo, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD, en donde los MRD ubicados en el extremo carboxilo de la cadena pesada interactúan (por ejemplo, mediante enlace disulfuro) a fin de formar un solo sitio de unión a diana. Los MRD asociados con el enlace intercadena pueden estar asociados con múltiples dominios de unión a diana. Como alternativa, como se describe en el presente documento, el MRD puede contener uno o más restos de cisteína (u otro resto que tenga una cadena lateral reactiva (por ejemplo, lisina)) que permita el enlace selectivo o preferencial del MRD a un agente citotóxico.

El MRD puede contener dos restos de cisteína fuera del dominio de unión a diana de núcleo. El MRD puede contener dos restos de cisteína ubicados dentro del dominio de unión a diana de núcleo en cada extremo del dominio de unión a diana. Puede ubicarse una primera cisteína próxima al extremo de la molécula (es decir, en el extremo C-terminal de un MRD en el extremo C-terminal de una cadena de enlazador o anticuerpo o en el extremo N-terminal de un MRD en el extremo N-terminal de una cadena de enlazador o anticuerpo). Por lo tanto, una primera cisteína puede estar ubicada a una distancia de un aminoácido, a una distancia de dos aminoácidos, a una distancia de tres aminoácidos, a una distancia de cuatro aminoácidos, a una distancia de cinco aminoácidos o a una distancia de seis aminoácidos del extremo de la molécula. Puede ubicarse una segunda cisteína próxima a la ubicación de fusión de MRD (es decir, en el extremo N-terminal de un MRD en el extremo C-terminal de una cadena de enlazador o anticuerpo o en el extremo C-terminal de un MRD en el extremo N-terminal de una cadena de enlazador o anticuerpo). Por lo tanto, una segunda cisteína puede estar ubicada a una distancia de un aminoácido, a una distancia de dos aminoácidos, a una distancia de tres aminoácidos, a una distancia de cuatro aminoácidos, a una distancia de cinco aminoácidos, a una distancia de 10 aminoácidos o a una distancia de 15 aminoácidos de la fusión de MRD.

El MRD puede estar rematado con restos estables. El MRD puede estar rematado con disulfuro. El MRD puede no contener sitios de escisión.

El MRD puede seleccionarse para que no contenga epítopos de linfocitos T humanos potenciales.

El MRD puede tener una hidrofobia particular. Por ejemplo, puede compararse la hidrofobia de los MRD basándose en los tiempos de retención determinados usando cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía líquida en fase reversa.

La diana del MRD puede ser cualquier molécula que sea deseable para que interactúe con un anticuerpo que contiene MRD. Por ejemplo, la diana del MRD puede ser un factor soluble o una proteína transmembrana, tal como un recepto de superficie celular. La diana del MRD también puede ser un componente extracelular o un componente intracelular. La diana del MRD puede ser un factor que regula la proliferación, la diferenciación o la supervivencia celular. La diana del MRD puede ser una citocina. La diana del MRD puede ser un factor que regula la angiogénesis. La diana del MRD puede ser un factor que regula la adhesión celular y/o la interacción célula-célula. La diana del MRD puede ser una molécula de señalización celular. La diana del MRD puede ser un factor que regula una o más respuestas inmunitarias, tales como, autoinmunidad, inflamación y respuestas inmunitarias contra células cancerosas. La diana del MRD puede ser un factor que regula la adhesión celular y/o la interacción célula-célula. La diana del MRD puede ser una molécula de señalización celular. Un MRD puede unirse a una diana que en sí, es un MRD. La capacidad de los MRD para unirse a una diana y bloquear, aumentar o interferir con la actividad biológica de la diana del MRD pueden determinarse usando o modificando de manera rutinaria ensayos, bioensayos y/o modelos animales conocidos en la técnica para evaluar dicha actividad.

Los MRD son capaces de unirse a su diana respectiva cuando los MRD están unidos a un anticuerpo. Los MRD pueden ser capaces de unirse a su diana cuando no están unidos a un anticuerpo. El MRD puede ser un agonista de la diana. El MRD puede ser un antagonista de la diana. El MRD puede usarse para localizar un anticuerpo que contiene MRD en un área donde está ubicada la diana del MRD.

La secuencia del MRD puede determinarse de varias maneras. Por ejemplo, las secuencias del MRD pueden proceder de ligandos naturales o de secuencias conocidas que se unen a un sitio de unión a diana específico. Adicionalmente, la tecnología de presentación en fagos ha surgido como un método potente en la identificación de péptidos que se unen a receptores y ligandos diana. En colecciones de presentación en fagos de péptidos, pueden presentarse secuencias de origen natural y de origen no natural (por ejemplo, péptido aleatorio) mediante fusión con proteínas de la envuelta de fago filamentoso. Los métodos para averiguar los sitios de unión en polipéptidos usando vectores de presentación en fagos se ha descrito previamente, en particular, en el documento WO94/18221. Los métodos implican, en general, el uso de un sistema de expresión superficial de fago filamentoso (fagémido) para la clonación y la expresión de polipéptidos que se unen al sitio diana preseleccionado de interés.

Los métodos de la presente divulgación para preparar MRD incluyen el uso de vectores de presentación en fagos por su ventaja particular de proporcionar un medio para cribar una población muy grande de proteínas de presentación expresadas y de ese modo ubicar uno o más clones específicos que codifican una reactividad de unión a diana deseada. Puede determinarse la capacidad de los polipéptidos codificados por los clones para unirse a una diana y/o alterar la actividad biológica de la diana usando o modificando de manera rutinaria ensayos y otras metodologías descritas en el presente documento o de otro modo conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse la tecnología de presentación en fagos para identificar y mejorar las propiedades de unión de los MRD. Véase, por ejemplo, Scott et al., Science 249:386 (1990); Devlin et al., Science 249:404 (1990); Patentes de los Estados Unidos n.º 5.223.409, 5.733.731, 5.498.530, 5.432.018, 5.338.665, 5.922.545; y Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO96/40987 y WO98/15833. En colecciones de presentación en fagos de péptidos, pueden presentarse secuencias de péptido de origen natural y/o no natural mediante fusión con proteínas de la envuelta o fago filamentoso. Los péptidos presentados pueden eluirse por afinidad contra una diana de interés, en caso deseado. El fago retenido puede enriquecerse mediante rondas sucesivas de purificación por afinidad y repropagación. Pueden secuenciarse los péptidos con mejor unión para identificar restos clave en una o más familias de péptidos relacionadas estructuralmente. Véase, por ejemplo, Cwirla et al., Science 276:1696-9 (1997), en el que se identificaron dos familias distintas. Las secuencias de péptido también pueden sugerir qué restos pueden reemplazarse de manera segura mediante barrido de alanina o mediante mutagénesis a nivel del ADN. Pueden crearse y explorarse bibliotecas de mutagénesis para optimizar adicionalmente la secuencia de las mejores moléculas de unión. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-424 (1997).

También puede usarse análisis estructural de la interacción de proteína para sugerir péptidos que imitan la actividad de unión de los ligandos de proteínas grandes. En dicho análisis, la estructura cristalina puede sugerir la identidad y la orientación relativa del ligando de proteína diana, a partir del cual puede diseñarse un péptido, tal como un MRD. Véase, por ejemplo, Takasaki et al., Nature Biotech. 15:1266-1270 (1997). También pueden usarse estos métodos analíticos para investigar la interacción entre una diana y un MRD seleccionado mediante presentación en fagos, lo que puede sugerir una modificación adicional de los MRD para aumentar la afinidad de unión.

Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica para identificar MRD. Por ejemplo, puede fusionarse una biblioteca de péptidos al extremo carboxilo del represor lac y expresión en *E. coli*. Otro método basado en *E. coli* permite la presentación en la membrana celular externa mediante fusión con una lipoproteína asociada con peptidoglucano (PAL). Estos métodos y otros relacionados se citan de manera colectiva como "presentación en *E. coli*". En otro método, se detiene la traducción de ARN aleatorio antes de la liberación en ribosoma, dando como resultado bibliotecas de polipéptidos con su ARN asociado todavía unido. Estos métodos y otros relacionados se citan de manera colectiva como "presentación en ribosomas". Otros métodos conocidos emplean el enlace químico de péptidos a ARN. Véase, por ejemplo, Roberts y Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12303 (1997). Estos métodos y otros relacionados se citan de manera colectiva como "exploración de ARN-péptido, presentación de ARN y presentación de ARNm". Se han desarrollado bibliotecas de péptidos derivados químicamente en las que los péptidos se inmovilizan sobre materiales no biológicos y estables, tales como varillas de polietileno y resinas permeables al disolvente. Otra biblioteca derivada químicamente usa fotolitografía para escanear péptidos inmovilizados sobre portaobjetos de vidrio. Estos métodos y otros relacionados se citan de manera colectiva como "exploración de químico-péptido". La exploración de químico-péptido puede ser ventajosa, ya que permite el uso de D-aminoácidos y otros análogos no naturales, así como elementos no peptídicos. Los métodos tanto biológicos como químicos se revisan en Wells y Lowman, Curr. Opin. Biotechnol. 3:355-362 (1992). Además, para identificar, caracterizar y modificar MRD pueden usarse bibliotecas restringidas, bibliotecas lineales y/o bibliotecas enfocadas (formadas por dominios estructuralmente relacionados que comparten una homología de secuencia primaria significativa).

También puede prepararse un MRD mejorado que se une principalmente a una diana deseada basándose en una secuencia de MRD conocida. Por ejemplo, pueden introducirse al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones conservativas o no conservativas), eliminaciones o inserciones de aminoácidos en una secuencia de MRD conocida y puede explorarse la unión a la diana deseada y la actividad biológica del MRD resultante, tal como la capacidad para antagonizar la actividad biológica diana o para agonizar la actividad biológica diana. Los sitios seleccionados para la modificación pueden madurarse por afinidad usando técnicas de presentación en fagos conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-424 (1997).

Puede usarse cualquier técnica de mutagénesis conocida en la técnica para modificar nucleótidos individuales en una secuencia de ADN, a fin de producir adiciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo o para crear/eliminar sitios de restricción y secuencias que codifican aminoácidos deseados (por ejemplo, cisteína) para facilitar manipulaciones adicionales. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, mutagénesis química, mutagénesis de sitio dirigido *in vitro* (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985); Hutchinson et al., J. Biol. Chem. 253:6551 (1978)), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos (Smith, Ann. Rev. Genet. 19:423-463 (1985); Hill et al., Methods Enzymol. 155:558-568 (1987)), extensión de solape basada en la PCR (Ho et al., Gene 77:51-59 (1989)), mutagénesis de megacebador basada en la PCR (Sarkar et al., Biotechniques 8:404-407 (1990)), etc. Las modificaciones pueden confirmarse mediante secuenciación de ADN.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de reordenamiento de genes, reordenamiento de motivos, reordenamiento de exones y/o reordenamiento de codones (citadas colectivamente como "reordenamiento de ADN"). Puede usarse reordenamiento de ADN para alterar las actividades de SYNAGIS® o fragmentos del mismo (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo con mayores afinidades y menores velocidades de disociación). Véase, *en general*, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458 y Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 (1997); Harayama et al., Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998); Hansson et al., J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999); Lorenzo et al., Biotechniques 24(2):308-313 (1998); Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos n.º 20030118592 y 200330133939; y la Publicación de Solicitud Internacional n.º WO02/056910.

Adicionalmente, pueden identificarse MRD basándose en sus efectos en ensayos que miden vías o actividades particulares. Por ejemplo, los ensayos que miden las vías de señalización (por ejemplo, estudios de fosforilación o multimerización), flujos de canales de iones, niveles de AMPc intracelular, actividades celulares, tales como migración, adherencia, proliferación o apoptosis y entrada viral, replicación, gemación o integración pueden usarse para identificar, caracterizar y mejorar los MRD.

Se incluyen dentro del alcance de la presente invención variantes y derivados de los MRD que conservan la capacidad de unirse al antígeno diana. Entre las variantes se incluyen variantes de inserción, de eliminación y de sustitución, así como variantes que incluyen MRD presentados en el presente documento con aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C, incluyendo de aproximadamente 0 a 50, 0 a 40, 0 a 30, 0 a 20 aminoácidos y similares. Se entiende que puede modificarse el MRD de la presente invención para que contenga uno, dos o los tres tipos de variantes. Las variantes de inserción o de sustitución pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no convencionales o ambos. El MRD puede contener una secuencia con no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 diferencias de aminoácidos cuando se compara con una secuencia de MRD descrita en el presente documento. Las diferencias de aminoácidos pueden ser sustituciones. Estas sustituciones pueden ser de naturaleza conservativa o no conservativa y pueden incluir aminoácidos no convencionales o no naturales. El MRD contiene una secuencia que inhibe de manera competitiva la capacidad de una secuencia que contiene MRD descrita en el presente documento para unirse a con una molécula diana. Puede determinarse la capacidad de un MRD para inhibir de manera competitiva otra secuencia que contiene MRD usando técnicas conocidas en la materia, incluyendo ensayos ELISA y BIAcore.

Puede evaluarse la capacidad de un MRD para unirse a su diana usando cualquier técnica que evalúe la interacción molecular. Por ejemplo, puede evaluarse la interacción de MRD-diana como se describe en los ejemplos más adelante o como alternativa, usando ensayos de unión *in vitro* o *in vivo*, tales como transferencias de Western, ensayos radioinmunológicos, ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de precipitación inmunológica, ensayos inmunológicos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC). Los ensayos que evalúan la capacidad de un MRD para afectar funcionalmente a su diana (por ejemplo, ensayos para medir la señalización, proliferación, migración, etc.) también pueden usarse para evaluar indirectamente la interacción MRD-diana.

También puede prepararse un MRD mejorado que tenga una semivida *in vivo* mejorada basándose en una secuencia de MRD conocida. Por ejemplo, pueden introducirse al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones conservativas o no conservativas), eliminaciones o inserciones de aminoácidos en una secuencia de MRD conocida y puede evaluarse el aumento de la semivida en el MRD resultante. Por lo tanto, pueden incluirse en las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) variantes y derivados de los MRD que conservan la capacidad para unirse a la diana y tienen una semivida aumentada. Un MRD en un anticuerpo que contiene MRD puede tener una semivida de al menos aproximadamente 5, al menos de aproximadamente 10, al menos de aproximadamente 15, al menos de aproximadamente 20, al menos de aproximadamente 25, al menos de aproximadamente 30, al menos de aproximadamente 35, al menos de aproximadamente 40, al menos de aproximadamente 45, al menos de aproximadamente 50, al menos de aproximadamente 55, al menos de aproximadamente 60, al menos de aproximadamente 65, al menos de aproximadamente 70, al menos de aproximadamente 75, al menos de aproximadamente 80, al menos de aproximadamente 85, al menos de aproximadamente 90, al menos de aproximadamente 95, al menos de aproximadamente 100, al menos de aproximadamente 110, al menos de aproximadamente 120, al menos de aproximadamente 130, al menos de aproximadamente 140 o al menos de aproximadamente 150 horas. Un MRD en un anticuerpo que contiene MRD puede tener una semivida de al menos de aproximadamente 5, al menos de aproximadamente 10, al menos de aproximadamente 15, al menos de aproximadamente 20, al menos de aproximadamente 25, al menos de aproximadamente 30, al menos de aproximadamente 35, al menos de aproximadamente 40, al menos de aproximadamente 45, al menos de aproximadamente 50, al menos de aproximadamente 55, al menos de aproximadamente 60, al menos de aproximadamente 65, al menos de aproximadamente 70, al menos de aproximadamente 75, al menos de aproximadamente 80, al menos de aproximadamente 85, al menos de aproximadamente 90, al menos de aproximadamente 95, al menos de aproximadamente 100, al menos de aproximadamente 110, al menos de aproximadamente 120, al menos de aproximadamente 130, al menos de aproximadamente 140 o al menos de aproximadamente 150 horas.

Una vez se ha averiguado la secuencia del MRD, los péptidos pueden prepararse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los péptidos de MRD pueden sintetizarse químicamente y unirse operablemente al anticuerpo o pueden sintetizarse usando tecnología recombinante. Por ejemplo, pueden sintetizarse MRD en solución o sobre un soporte sólido usando técnicas conocidas. Se encuentran disponibles comercialmente diversos sintetizadores automáticos y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Tam et al., J. Am. Chem. Soc. 105:6442 (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany y Merrifield, The Peptides, Gross y Meienhofer, eds, Academic Press, Nueva York, 1-284; Barany et al., Int. J. Pep. Protein Res., 30:705-739 (1987); y la patente de los Estados Unidos n.º 5.424.398.

Pueden sintetizarse MRD con moléculas unidas covalentemente que no son aminoácidos, pero que ayudan a la purificación, identificación y/o rastreo de un MRD *in vitro* o *in vivo*. (por ejemplo, biotina para reaccionar con avidina o moléculas marcadas con avidina).

Las siguientes dianas de MRD se describen con más detalle solo a modo de ejemplo.

El MRD puede dirigirse a una integrina. La función de las integrinas tales como $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$ como marcadores asociados a tumor se ha documentado bien. Un reciente estudio de 25 líneas celulares humanas permanentes establecidas a partir de ovario avanzado demostró que todas las líneas eran positivas para la expresión de $\alpha v \beta 5$ y muchas eran positivas para la expresión de $\alpha v \beta 3$. Los estudios también han demostrado que $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$ se expresan de forma elevada en tejidos de tumor cervical humano maligno. Las integrinas también han demostrado efectos terapéuticos en modelos animales de sarcoma de Kaposi, melanoma y cáncer de mama.

Varios antagonistas de integrina $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$ están en desarrollo clínico. Estos incluyen péptidos RGD cíclicos y miméticos de RGD de molécula pequeña sintéticos. Dos antagonistas de integrina basados en anticuerpo están actualmente en ensayo clínico para el tratamiento del cáncer. El primero es VITAXIN® (MEDI-522, Abegrein), la forma humanizada del anticuerpo LM609 murino anti- $\alpha v \beta 3$ humana. Un estudio en fase I de aumento de dosis en pacientes con cáncer demostró que VITAXIN® es seguro para su uso en seres humanos. Otro anticuerpo en ensayo clínico es CNT095, un Ab completamente humano que reconoce integrinas αv . Un estudio en fase I de CNT095 en pacientes con una diversidad de tumores sólidos ha demostrado que se tolera bien. La cliengitida (EMD 121974), un antagonista peptídico de $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$, también ha demostrado ser seguro en ensayos en fase I. Además, ha habido numerosos estudios de dirección de fármacos y de imágenes basados en el uso de ligandos para estos receptores. Estas observaciones preclínicas y clínicas demuestran la importancia de abordar $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$ y estudios que implican el uso de anticuerpos en esta estrategia han informado de forma coherente de que la dirección a través de estas integrinas es segura.

También se encuentran en desarrollo ensayos clínicos para antagonistas que se dirigen a $\alpha 5 v \beta 1$ para tratar el melanoma metastásico, el carcinoma de células renales y el cáncer de pulmón no microcítico (M200, volociximab) y el glioma maligno (ATN-161).

Los MRD de unión a integrina que contienen uno o más motivos de secuencia de tripéptido de RGD representan un ejemplo de MRD de la divulgación. Los ligandos que tienen el motivo de RGD como dominio mínimo de reconocimiento y del que pueden obtenerse MRD de la invención son bien conocidos, una lista parcial de los cuales incluye, con la diana de integrina correspondiente en paréntesis, fibronectina ($\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha b \beta 1$, $\alpha 1 b \beta 3$, $\alpha v \beta 3$ y $\alpha 3 \beta 1$), fibrinógeno ($\alpha M \beta 2$ y $\alpha 1 b \beta 1$), factor de von Willebrand ($\alpha 1 b \beta 3$ y $\alpha v \beta 3$) y vitronectina ($\alpha 1 b \beta 3$, $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$).

El MRD de direccionamiento que contiene RGD puede ser un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en: YCRGDCT (SEQ ID NO: 3); PCRGDCL (SEQ ID NO: 4); TCRGDCY (SEQ ID NO: 5); y LCRGDCF (SEQ ID NO: 6).

Un MRD que imita un sitio de unión no dependiente de RGD en un receptor de integrina y que tiene la especificidad de unión a diana de un ligando de alta afinidad que reconoce la integrina seleccionada también se contempla en la presente invención. También se contemplan MRD que se unen a un receptor de integrina y que alteran la actividad de unión y/o señalización de la integrina.

El MRD se dirige a una molécula angiogénica. La angiogénesis es esencial para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Ang2 ha demostrado actuar como molécula proangiogénica. La administración de inhibidores selectivos de Ang2 es suficiente para suprimir tanto la angiogénesis tumoral como la angiogénesis de la córnea. Por lo tanto, la inhibición de Ang2 sola o en combinación con la inhibición de otros factores angiogénicos, tales como VEGF, puede representar una estrategia antiangiogénica eficaz para tratar a pacientes con tumores sólidos.

Se contempla que los MRD útiles en la presente invención incluyan aquellos que se unen a receptores angiogénicos, a factores angiogénicos y/o a Ang2. Un MRD de la invención se une a Ang2. El componente de unión a TIE2 puede comprender un fragmento de ANG2 que se une a TIE2. Las composiciones de la divulgación pueden unirse a TIE2 y comprender los aminoácidos 283-449 de la ANG2 humana divulgada en la Referencia de Secuencia del NCBI n.º NP_001138.1.

Un MRD y/o un anticuerpo que contiene MRD se une a Ang2 y puede contener una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: GAQTNFMPMDDLEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO: 9) (ANGa); LWDDCYFFPNPPHCYNP (SEQ ID NO: 11) (ANGb); LWDDC YSYNPPHCYNP (SEQ ID NO: 12) (ANGc); LWDDCYSFPNPPHCYNP (SEQ ID NO: 15) (ANGd); DCAVYPNPPWCYKMEFGK (SEQ ID NO: 16) (ANGe); PHEECYFYPNPPHCYT MS (SEQ ID NO: 17) (ANGf); y PHEECYSYPNPPHCYTMS (SEQ ID NO: 18) (ANGg).

Un MRD y/o un anticuerpo que contiene MRD se une a Ang2 y puede contener una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: GAQTNFMPMDDLEQRLYEQFILQ QGLE (SEQ ID NO: 9) (ANGa); LWDDCYFFPNPPHCYNP (SEQ ID NO: 11) (ANGb); LWDDCYSYPNPPHCYNP (SEQ ID NO: 12) (ANGc); LWDDCYSFPNPPHCYNP (SEQ ID NO: 15) (ANGd); DCAVYPNPPWCYKMEFGK (SEQ ID NO: 16) (ANGe); PHEECYFYPNPP HCYTMS (SEQ ID NO: 17) (ANGf); y PHEECYSYPNPPHCYTMS (SEQ ID NO: 18) (ANGg).

Los péptidos de unión a ANG-2 divulgados en las Patentes de los Estados Unidos n.º 7.309.483, 7.205.275, 7.138.370 7.063.965, 7.063.840, 7.045.302, 7.008.781, 6.825.008, 6.645.484, 6.627.415, 6.455.035, 6.441.137, 6.433.143, 6.265.564, 6.166.185, 5.879.672, 5.814.464, 5.681.714, 5.650.490, 5.643.755 y 5.521.073; y las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos n.º 2007/0225221, 2007/0093419, 2007/0093418, 2007/0072801, 2007/0025993, 2006/0122370, 2005/0186665, 2005/0175617, 2005/0106099, 2005/0100906, 2003/0236193, 2003/0229023, 2003/0166858, 2003/0166857, 2003/0162712, 2003/0109677, 2003/0092891, 2003/0040463, 2002/0173627 y 2002/0039992, y las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO2006/005361, WO/2006/002854, WO2004/092215, WO/2004/076650, WO2003/057134, WO/2000/075323, WO2000/065085, WO/1998/018914 y WO1995/021866.

El MRD puede estar dirigido al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La fusión de anticuerpo-MRD puede comprender un MRD con la secuencia ATWLPPP (SEQ ID NO: 71) que inhibe la angiogénesis mediada por VEGF. Binetruy-Tournaire et al., EMBO J. 19:1525-1533 (2000). En la presente divulgación se contempla un anticuerpo anti-VEGF que contiene un MRD dirigido a VEGF. Pueden encontrarse anticuerpos anti-VEGF, por ejemplo, en Presta et al., Cancer Research 57:4593-4599 (1997); y Fuh et al., J. Biol. Chem. 281:10 6625 (2006).

También pueden usarse MRD específicos del receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina en la presente divulgación.

También se contemplan MRD específicos de migración vascular para su uso en la presente divulgación. Varios estudios han caracterizado la eficacia de unir el péptido de migración vascular a otras proteínas como IL-12 o fármacos para dirigir su suministro a animales vivos.

Se contemplan varios otros sitios de unión a diana como la diana de las fusiones de anticuerpo-MRD de la presente divulgación, incluyendo, por ejemplo, FGFR1, FGFR2, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor del factor I de crecimiento insulínico o receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. Los MRD pueden estar dirigidos a estos sitios de unión diana o a los ligandos respectivos.

El MRD de la divulgación puede unirse a IL6. El MRD de la divulgación puede unirse a IL6R.

El MRD de la divulgación puede unirse a HER2/3.

El MRD de la divulgación puede unirse a ErbB2.

El MRD de la divulgación puede unirse a una proteína humana. El MRD de la divulgación puede unirse tanto a una proteína humana como a su homólogo de ratón, rata, conejo o hámster.

III. Anticuerpos

El anticuerpo en las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) descritas en el presente documento puede ser cualquier inmunoglobulina de unión a antígeno adecuada. Las moléculas de anticuerpo que contienen MRD descritas en el presente documento pueden conservar las propiedades estructurales y funcionales de los anticuerpos monoclonales tradicionales. Por lo tanto, los anticuerpos conservan sus propiedades de unión a epítomos, pero ventajosamente, también incorporan una o más especificidades de unión a diana adicionales.

Los anticuerpos que pueden usarse en las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados y quiméricos. Las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos pueden ser IgG1. Los anticuerpos pueden ser IgG3.

Los anticuerpos que pueden usarse como parte de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser derivados naturales o ser el resultado de ingeniería genética recombinante (por ejemplo, presentación en fagos, xenomouse y sintéticos). Los anticuerpos pueden incluir modificaciones, por ejemplo, para aumentar la semivida o para aumentar o reducir la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Los anticuerpos pueden proceder o derivarse de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos o generarse de manera sintética. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, murinos, de burro, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de llama, de caballo o de pollo. Los anticuerpos pueden ser humanos.

Las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptido de un multímero pueden ser idéntica a las que se encuentran en una segunda cadena de polipéptido del multímero. Los monómeros que contienen una porción de cadena pesada de la invención pueden no ser idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión a diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Se describen anticuerpos biespecíficos y bivalentes y los métodos para producirlos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.731.168, 5.807.706, 5.821.333 y en las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos n.º 2003/020734 y 2002/015537. Se describen anticuerpos biespecíficos y tetravalentes y los métodos para producirlos, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO02/096948 y WO00/44788. Véase, en general, las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO93/17715, WO92/08802, WO91/00360 y WO92/05793; Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60-69 (1991); Patentes de los Estados Unidos n.º 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; y 5.601.819; y Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992).

Las porciones de cadena pesada del componente de anticuerpo de las fusiones de MRD-anticuerpo para su uso en los métodos divulgados en el presente documento pueden proceder de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 procedente de una molécula de IgG1 y una región bisagra procedente de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra procedente, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra quimérica procedente, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Los dominios de unión a antígeno del componente de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a su diana con una constante de disociación o Kd de menos de 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M. El componente de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede tener una constante de disociación o Kd de menos de 5×10^{-5} M. La unión a antígeno del componente de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede tener una constante de disociación o Kd de menos de 5×10^{-8} M. La unión a antígeno del componente de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede tener una constante de disociación o Kd de menos de 5×10^{-9} M. El componente de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede tener una constante de disociación o Kd de menos de 5×10^{-10} M. El componente de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede tener una constante de disociación o Kd de menos de 5×10^{-11} M. El componente de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede tener una constante de disociación o Kd de menos de 5×10^{-12} M.

El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a su diana con una velocidad de disociación (k_{off}) de menos de 5×10^{-2} s⁻¹, 10^{-2} s⁻¹, 5×10^{-3} s⁻¹, o 10^{-3} s⁻¹. Más preferentemente, el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD se une a su diana con una velocidad de disociación (k_{off}) de menos de 5×10^{-4} s⁻¹, 10^{-4} s⁻¹, 5×10^{-5} s⁻¹, o 10^{-5} s⁻¹, 5×10^{-6} s⁻¹, 10^{-6} s⁻¹, 5×10^{-7} s⁻¹, o 10^{-7} s⁻¹.

El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a su diana con una velocidad de asociación (k_{on}) de más de 10^3 M⁻¹s⁻¹, 5×10^3 M⁻¹s⁻¹, 10^4 M⁻¹s⁻¹, o 5×10^4 M⁻¹s⁻¹. Más preferentemente, el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD se une a su diana con una velocidad de asociación (k_{on}) de más de 10^5 M⁻¹s⁻¹, 5×10^5 M⁻¹s⁻¹, 10^6 M⁻¹s⁻¹, o 5×10^6 M⁻¹s⁻¹, o 10^7 M⁻¹s⁻¹.

Se conocen en la técnica y pueden emplearse estrategias de maduración por afinidad (por ejemplo, reordenamiento de genes, reordenamiento de motivos, reordenamiento de exones y/o reordenamiento de codones (citadas de manera colectiva como "reordenamiento de ADN) para generar una alta afinidad y/o para alterar las actividades (por ejemplo, ADCC o CDC) de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD)). Véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos n.º 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458; y Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-733 (1997), Harayama, *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82 (1998), Hansson et al., *J. Mol. Biol.* 287:265-276 (1999) y Lorenzo y Blasco, *Biotechniques* 24(2):308-313 (1998). Ventajosamente, pueden aplicarse de manera rutinaria estrategias de maduración por afinidad y de reordenamiento de cadenas para generar

composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que también pueden incluir variantes y derivados que mejoran la función del anticuerpo y/o propiedades farmacodinámicas deseables.

Por consiguiente, se divulga una fusión de anticuerpo-MRD, en la que al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se ha alterado a fin de proporcionar características bioquímicas deseadas, tales como funciones efectoras reducidas o aumentadas, la capacidad para dimerizar de manera no covalente, capacidad aumentada para localizarse en el sitio de un tumor, semivida en suero reducida o semivida en suero aumentada cuando se compara con un anticuerpo no alterado con una actividad inmunológica aproximadamente igual. Las alteraciones de los dominios de región constante pueden ser sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores Fc (FcR) expresados en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas localicen a una célula diana portadora del antígeno y posteriormente eliminen a la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos IgG de alta afinidad específicos dirigidos a la superficie de las células diana "arman" a las células citotóxicas y son necesarios para dicha eliminación. La lisis de la célula diana es extracelular, requiere del contacto o de la proximidad entre las células citotóxicas y las células diana y no implica al complemento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "potencia la ADCC" (por ejemplo, haciendo referencia a células) pretende incluir cualquier aumento medible en la lisis celular cuando se pone en contacto con un anticuerpo que contiene MRD variante en comparación con la eliminación celular de la misma célula en contacto con un anticuerpo que contiene MRD que no se ha modificado de un modo que altere la ADCC en presencia de células efectoras (por ejemplo, a una proporción de células diana:células efectoras de 1:50), por ejemplo, un aumento en la lisis celular de al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 % o 325 %.

El componente de anticuerpo de la fusión de anticuerpo-MRD puede haberse modificado para aumentar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (véase, por ejemplo, Bruhns et al., Blood 113:3716-3725 (2009); Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001); Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005-4010 (2006); Stavenhagen et al., Cancer Res., 67:8882-8890 (2007); Horton et al., Cancer Res. 68:8049-8057 (2008); Zalevsky et al., Blood 113:3735-3743 (2009); Bruckheimer et al., Neoplasia 11:509-517 (2009); Allan et al., documento WO2006/020114; Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691 (2009); y Watkins et al., documento WO2004/074455. Los ejemplos de modificación por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenida en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que aumentan la ADCC incluyen una o más modificaciones correspondientes a: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D o Q; IgG1-D280H, K290S con o sin S298D o V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; e IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; en donde la numeración de los restos en la región Fc es la del índice de EU como en Kabat.

Una proteína variante de Fc puede tener actividad ADCC potenciada en relación con una molécula comparable. Una proteína variante de Fc puede tener una actividad ADCC que es al menos 2 veces o al menos 3 veces o al menos 5 veces o al menos 10 veces o al menos 50 veces o al menos 100 veces mayor que la de una molécula comparable. Una proteína variante de Fc puede tener unión potenciada al receptor de Fc, Fc gamma RIIIA y tiene una actividad ADCC potenciada en relación con una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener tanto actividad ADCC mejorada como semivida en suero mejorada en relación con una molécula comparable.

Puede evaluarse la capacidad de cualquier proteína variante de Fc particular para mediar la lisis de la célula diana mediante ADCC usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, para evaluar la actividad de ADCC, puede añadirse una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) a las células diana en combinación con células efectoras inmunitarias, que pueden activarse mediante los complejos de antígeno-anticuerpo, dando como resultado la citólisis de la célula diana. En general, la citólisis se detecta por la liberación de marcadores (por ejemplo, sustratos radiactivos, colorantes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Los ejemplos específicos de ensayos de ADCC *in vitro* se describen en Wisecarver et al., J Immunol Methods 79:277-282 (1985); Bruggemann et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987); Wilkinson et al., J. Immunol. Methods 258:183-191 (2001); Patel et al., J. Immunol. Methods 184:29-38 (1995). Como alternativa o además, la actividad de ADCC de la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998) y la Patente de los Estados Unidos n.º 7.662.925.

El componente de anticuerpo de la fusión de anticuerpo-MRD puede haberse modificado para reducir la ADCC (véase, por ejemplo, Idusogie et al., J. Immunol. 166:2571-2575 (2001); Sazinsky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:20167-20172 (2008); Davis et al., J. Rheumatol. 34:2204-2210 (2007); Bolt et al., Eur. J. Immunol. 23:403-411 (1993); Alegre et al., Transplantation 57:1537-1543 (1994); Xu et al., Cell Immunol. 200:16-26 (2000); Cole et al.,

Transplantation 68:563-571 (1999); Hutchins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11980-11984 (1995); Reddy et al., J. Immunol. 164:1925-1933 (2000); Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO1997/11971 y WO2007/106585; Publicación de Solicitud de los Estados Unidos 2007/0148167A1; McEarchern et al., Blood 109:1185-1192 (2007); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691 (2009); y Kumagai et al., J. Clin. Pharmacol. 47:1489-1497 (2007). Los ejemplos de modificación por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenida en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que reducen la ADCC incluyen una o más modificaciones correspondientes a: IgG1-K326W, E333S; IgG2-E333S; IgG1-N297A; IgG1-L234A, L235A; IgG2-V234A, G237A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-S228P, L236E; IgG2-secuencia de EU 118-260; IgG4-secuencia de EU 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C220S, C226S, C229S, P238S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; e IgG1-L234F, L235E, P331S.

El componente de anticuerpo de la fusión de anticuerpo-MRD puede haberse modificado para aumentar la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP); (véase, por ejemplo, Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001); Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005-4010 (2006); Stavenhagen et al., Cancer Res. 67:8882-8890 (2007); Richards et al., Mol. Cancer Ther. 7:2517-2527 (2008); Horton et al., Cancer Res. 68:8049-8057 (2008); Zalevsky et al., Blood 113:3735-3743 (2009); Bruckheimer et al., Neoplasia 11:509-517 (2009); Allan et al., documento WO2006/020114; Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691 (2009); y Watkins et al., documento WO2004/074455. Los ejemplos de modificaciones por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenidas en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que aumentan la ADCP incluyen una o más modificaciones correspondientes a: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P2471, A339D o Q; IgG1-D280H, K290S con o sin S298D o V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; IgG1-G236A, S239D, I332E.

El componente de anticuerpo de la fusión de anticuerpo-MRD puede haberse modificado para reducir la ADCP (véase, por ejemplo, Sazinsky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:20167-20172 (2008); Davis et al., J. Rheumatol. 34:2204-2210 (2007); Bolt et al., Eur. J. Immunol. 23:403-411 (1993); Alegre et al., Transplantation 57:1537-1543 (1994); Xu et al., Cell Immunol. 200:16-20 (2000); Cole et al., Transplantation 68:563-571 (1999); Hutchins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11980-11984 (1995); Reddy et al., J. Immunol. 164:1925-1933 (2000); Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO1997/11971 y WO2007/106585; Publicación de Solicitud de los Estados Unidos 2007/0148167; McEarchern et al., Blood 109:1185-1192 (2007); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691 (2009); y Kumagai et al., J. Clin. Pharmacol. 47:1489-1497 (2007). Los ejemplos de modificación por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenida en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que reducen la ADCC incluyen una o más modificaciones correspondientes a: IgG1-N297A; IgG1-L234A, L235A; IgG2-V234A, G237A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-S228P, L236E; IgG2 secuencia de EU 118-260; IgG4-secuencia de EU 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C220S, C226S, C229S, P238S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; e IgG1-L234F, L235E, P331S.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula, por ejemplo, un anticuerpo, en complejo con un antígeno afin. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Una proteína variante de Fc puede tener actividad CDC potenciada en relación con una molécula comparable. Una proteína variante de Fc puede tener una actividad CDC que es al menos 2 veces o al menos 3 veces o al menos 5 veces o al menos 10 veces o al menos 50 veces o al menos 100 veces mayor que la de una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener tanto actividad CDC mejorada como semivida en suero mejorada en relación con una molécula comparable.

El componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD puede haberse modificado para aumentar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (véase, por ejemplo, Idusogie et al., J. Immunol. 166:2571-2575 (2001); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691 (2009); y Natsume et al., Cancer Res. 68:3863-3872 (2008). Los ejemplos de modificación por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenida en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que aumentan la ADCC incluyen una o más modificaciones correspondientes a: IgG1-K326A, E333A; e IgG1-K326W, E333S, IgG2-E333S.

La presente invención proporciona formulaciones, en donde la región Fc comprende un resto de aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 252, 254, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333 y 334 numeradas según el índice de EU como se expone en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un resto de aminoácido de origen no natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.624.821, 6.277.375 y 6.737.056; y las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO01/58957, WO02/06919, WO04/016750, WO04/029207, WO04/035752 y WO05/040217).

Los anticuerpos que contienen MRD de la invención pueden contener una variante de Fc que comprende al menos un resto de aminoácido de origen no natural seleccionado entre el grupo que consiste en 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 2341, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y,

2351, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 2401, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 252Y, 254T, 256E, 2621, 262A, 262T, 262E, 2631, 263A, 263T, 263M, 264L, 2641, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 2651, 265L, 265H, 265T, 2661, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 2961, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 2981, 298T, 298F, 2991, 299L, 299A, 299S, 299V, 200H, 299F, 299E, 313F, 325Q, 325L, 3251, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 3281, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 3301, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y y 332A, numeradas según el índice de EU como se expone en Kabat.

Opcionalmente, la región Fc puede comprender restos de aminoácidos adicionales y/o alternativos de origen no natural conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.624.821, 6.277.375 y 6.737.056; y las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO01/58957, WO02/06919, WO04/016750, WO04/029207, WO04/035752 y WO05/040217).

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede ser una fusión de anticuerpo-MRD, en donde el componente de anticuerpo se ha modificado para aumentar la unión inhibitoria al receptor Fc gamma RIIb (véase, por ejemplo, Chu et al., *Mol. Immunol.* 45:3926-3933 (2008)). Un ejemplo de modificación por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenida en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que aumenta la unión al receptor inhibitor Fc gamma RIIb es IgG1-S267E, L328F.

El componente de anticuerpo de la fusión de anticuerpo-MRD puede haberse modificado para reducir la CDC (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO1997/11971 y WO2007/106585; la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos n.º 2007/0148167A1; McEarchern et al., *Blood* 109:1185-1192 (2007); Hayden-Ledbetter et al., *Clin. Cancer* 15:2739-2746 (2009); Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005-4010 (2006); Bruckheimer et al., *Neoplasia* 11:509-517 (2009); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009); y Sazinsky et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:20167-20172 (2008). Los ejemplos de modificación por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenida en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que reducen la CDC incluyen una o más modificaciones correspondientes a: IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG2 secuencia de EU 118-260; IgG4-secuencia de EU 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; IgG1-L234F, L235E, P331S; e IgG1-C226S, P230S.

La semivida de una IgG esta mediada por su unión dependiente de pH al receptor FcRn neonatal. El componente de anticuerpo de la fusión de anticuerpo-MRD se ha modificado para aumentar la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Petkova et al., *Int. Immunol.* 18:1759-1769 (2006); Dall'Acqua et al., *J. Immunol.* 169:5171-5180 (2002); Oganessian et al., *Mol. Immunol.* 46:1750-1755 (2009); Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.* 281:23514-23524 (2006); Hinton et al., *J. Immunol.* 176:346-356 (2006); Datta-Mannan et al., *Drug Metab. Dispos.* 35:86-94 (2007); Datta-Mannan et al., *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717 (2007); Publicación de Solicitud Internacional n.º WO2006/130834; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009); y Yeung et al., *J. Immunol.* 182:7663-7671 (2009).

El anticuerpo de la fusión de anticuerpo-MRD puede haberse modificado para unirse de manera selectiva a FcRn a pH 6,0, pero no a pH 7,4. Los ejemplos de modificación por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenida en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que aumentan la semivida incluyen una o más modificaciones correspondientes a: IgG1-M252Y, S254T, T256E; IgG1-T250Q, M428L; IgG1-H433K, N434Y; IgG1-N434A; e IgG1-T307A, E380A, N434A.

El componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD puede haberse modificado para reducir la unión a FcRn (véanse, por ejemplo, Petkova et al., *Int. Immunol.* 18:1759-1769 (2006); Datta-Mannan et al., *Drug Metab. Dispos.* 35:86-94 (2007); Datta-Mannan et al., *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009); y Vaccaro et al., *Nat. Biotechnol.* 23:1283-1288 (2005). Los ejemplos de modificación por ingeniería genética de la secuencia de Fc contenida en el componente de anticuerpo de las fusiones de anticuerpo-MRD que reducen la semivida incluyen una o más modificaciones correspondientes a: IgG1-M252Y, S254T, T256E; H433K, N434F, 436H; IgG1-I253A; e IgG1-P2571, N434H o D376V, N434H.

Las fusiones de anticuerpo-MRD pueden haberse glucodiseñado o la porción de Fc del anticuerpo que contiene MRD puede haberse mutado para aumentar la función efectora usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando de este modo la localización en el tumor. En otros casos, puede suceder que las modificaciones de la región constante consistentes con la presente invención moderen la unión al complemento y, por lo tanto, reduzcan la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Pueden usarse otras modificaciones más de la región constante para modificar enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten una localización mejorada debido a una especificidad antigénica aumentada o a la flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización en tumores, la biodistribución y la semivida en suero, puede medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación innecesaria.

Los métodos para generar anticuerpos que contienen regiones Fc de origen no natural se conocen en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos mediante métodos de mutagénesis, incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis de sitio dirigido (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)), mutagénesis por PCR (Higuchi, en "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, págs. 177-183 (1990)) y mutagénesis de casete (Wells et al., Gene 34:315-323 (1985)). Puede llevarse a cabo la mutagénesis de sitio dirigido mediante el método de extensión de solape por la PCR (Higuchi, en "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, Nueva York, págs. 61-70 (1989)). Como alternativa, puede usarse la técnica de extensión de solape por la PCR (Higuchi, anteriormente citado) para introducir cualquier mutación deseada en una secuencia diana (el ADN de partida). Se conocen en la técnica otros métodos útiles para la generación de anticuerpos que contienen regiones Fc de origen no natural (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.624.821, 5.885.573, 5.677.425, 6.165.745, 6.277.375, 5.869.046, 6.121.022, 5.624.821, 5.648.260, 6.528.624, 6.194.551, 6.737.056, 6.821.505 y 6.277.375; la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos n.º 2004/0002587 y las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO94/29351, WO99/58572, WO00/42072, WO02/060919, WO04/029207, WO04/099249 y WO04/063351).

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) usadas de acuerdo con los métodos de la invención también incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de tal forma que dicha unión covalente no impide la unión específica del anticuerpo a su epítipo afín. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación o derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes. Se pueden llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

El componente de anticuerpo de las composiciones de la invención puede modificarse para que contenga uno o más aminoácidos de cisteína libres que tienen una reactividad tiol en un intervalo deseable (por ejemplo, de 0,6 a 1,0), en donde el anticuerpo modificado con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos de un anticuerpo original por cisteína. Uno o más restos de aminoácido de cisteína libre pueden estar ubicados en una cadena ligera. Uno o más restos de aminoácido de cisteína libre pueden estar ubicados en una cadena pesada. Uno o más restos de aminoácido de cisteína libre pueden estar ubicados tanto en una cadena pesada como en una cadena ligera. El anticuerpo que contiene MRD modificado con cisteína puede contener un aminoácido de cisteína libre que tiene un valor de reactividad de tiol en el intervalo de 0,6 a 1,0 y una modificación de secuencia en la cadena ligera o en la cadena pesada que se divulga en la Patente de los Estados Unidos n.º 7.855.275. El anticuerpo modificado con cisteína puede contener un aminoácido de cisteína libre que tiene un valor de reactividad de tiol en el intervalo de 0,6 a 1,0 y una modificación de secuencia en la cadena ligera o en la cadena pesada que no se divulga en la Patente de los Estados Unidos n.º 7.855.275.

El anticuerpo que contiene MRD puede modificarse para que contenga uno o más aminoácidos de selenocisteína libres u otro aminoácido no natural capaz de formar enlaces disulfuro. Se conocen en la técnica anticuerpos que contienen la misma y métodos para producir dichos anticuerpos. Véase, por ejemplo, Hofer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 105(34):12451-12456 (2008); y Hofer et al., Biochem. 48(50):12047-12057 (2009). Uno o más restos de aminoácido de selenocisteína libre pueden estar ubicados en una cadena ligera. Uno o más restos de aminoácido de selenocisteína libre pueden estar ubicados en una cadena pesada. Uno o más restos de aminoácido de selenocisteína libre pueden estar ubicados tanto en una cadena pesada como en una cadena ligera.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden haberse modificado a fin de no provocar una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal que se vaya a tratar, por ejemplo, en un ser humano. El anticuerpo puede modificarse para reducir la inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la materia. Por ejemplo, los componentes de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden estar humanizados, primatizados, desimmunizados o quimerizados. Estos tipos de anticuerpos proceden de un anticuerpo no humano, normalmente, un anticuerpo murino o de primate, que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto puede lograrse mediante numerosos métodos, que incluyen (a) injertar de los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar al menos una parte de una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en regiones marco y constantes humanas con o sin retención de restos estructurales críticos; o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "vistiéndolos" con secciones de tipo humano mediante el reemplazo de restos superficiales. Dichos métodos se divulgan en Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994), y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.190.370.

También puede usarse desimmunización para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo que contiene MRD. Como se usa en el presente documento, el término "desimmunización" incluye la alteración de un anticuerpo que contiene MRD para modificar los epítopos de linfocitos T (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud Internacional WO9852976A1 y WO0034317A2. Por ejemplo, se analizan las secuencias de VH y VL del anticuerpo de partida y se

genera un "mapa" de epítomos de linfocitos T humanos a partir de cada región V, mostrando la ubicación de los epítomos en relación con las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros restos clave dentro de la secuencia. Los epítomos de linfocitos T individuales del mapa de epítomos de linfocitos T se analizan a fin de identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña una serie de secuencias VH y VL alternativas que comprende combinaciones de sustituciones de aminoácidos y posteriormente, se incorporan estas secuencias en una serie de anticuerpos para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento, que después se evalúan respecto de su función. Normalmente, se generan y evalúan entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Después, se clonan los genes de cadena pesada y ligera completos que comprenden regiones V y C humanas modificadas en vectores de expresión y los plásmidos obtenidos se introducen en líneas celulares para la producción del anticuerpo completo. Después, se comparan los anticuerpos en ensayos bioquímicos y biológicos adecuados y se identifica la variante óptima.

Pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento muchos componentes de anticuerpo diferentes de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD). Se contempla que pueden usarse anticuerpos catalíticos y no catalíticos en la presente invención. Por ejemplo, El anticuerpo 38C2 es un hibridoma de secreción de anticuerpo y se ha descrito previamente en la Publicación de Solicitud Internacional WO97/21803. 38C2 contiene un sitio de combinación de anticuerpo que cataliza la reacción de adición de aldol entre un donador alifático y un aceptador de aldehído. En un modelo de ratón singénico de neuroblastoma, la administración sistémica de un profármaco de etopósido y la inyección intratumoral de Ab 38C2 inhibía el crecimiento tumoral.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD (es decir, la diana del dominio de unión antigénico) puede ser cualquier molécula con la que sea deseable que interactúe una fusión de MRD-anticuerpo. Por ejemplo, la diana del anticuerpo puede ser un factor soluble o la diana del anticuerpo puede ser una proteína transmembrana, tal como un receptor de superficie celular. La diana del anticuerpo también puede ser un componente extracelular o un componente intracelular. La diana del anticuerpo puede ser un factor que regula la proliferación, la diferenciación o la supervivencia celular. La diana del anticuerpo puede ser una citocina. La diana del anticuerpo puede ser un factor que regula la angiogénesis. La diana del anticuerpo puede ser un factor que regula una o más respuestas inmunitarias, tal como, autoinmunidad, inflamación y respuestas inmunitarias contra células cancerosas. La diana del anticuerpo puede ser un factor que regula la adhesión celular y/o la interacción célula-célula. La diana del anticuerpo puede ser una molécula de señalización celular. La capacidad de un anticuerpo para unirse a una diana y para bloquear, aumentar o interferir con la actividad biológica de la diana del anticuerpo pueden determinarse usando o modificando de manera rutinaria ensayos, bioensayos y/o modelos animales conocidos en la técnica para evaluar dicha actividad.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un antígeno relacionado con enfermedades. El antígeno puede ser un antígeno característico de un cáncer particular y/o de un tipo celular particular (por ejemplo, una célula hiperproliferativa) y/o de un patógeno particular (por ejemplo, una célula bacteriana (por ejemplo, tuberculosis, viruela, ántrax), un virus (por ejemplo, VIH), un parásito (por ejemplo, malaria, leishmaniasis), una infección fúngica, un moho, un micoplasma, un antígeno de prion o un antígeno asociado con un trastorno del sistema inmunitario.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser una diana que se haya validado en un modelo animal o en una situación clínica.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un antígeno de cáncer.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser: PDGFRA, PDGFRB, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-CC, PDGF-C, PDGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VEGFC, VEGFD, neuropilina 2 (NRP2), betacelulina, PLGF, RET (reordenado durante la transfección), TIE1, TIE2 (TEK), CA125, CD3, CD4, CD7, CD10, CD13, CD25, CD32, CD32b, CD44, CD49e (integrina alfa 5), CD55, CD64, CD90 (THY1), CD133 (prominina 1), CD147, CD166, CD200, ALDH1, ESA, SHH, DHH, IHH, patched1 (PTCH1), smoothened (SMO), WNT1, WNT2B, WNT3A, WNT4, WNT4A, WNT5A, WNT5B, WNT7B, WNT8A, WNT10A, WNT10B, WNT16B, LRP5, LRP6, FZD1, FZD2, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, Notch, Notch1, Notch3, Notch4, DLL4, Jagged, Jagged1, Jagged2, Jagged3, TNFSF1 (TNFb, LTa), TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF6B (DcR3), TNFSF7 (ligando de CD27, CD70), TNFRSF7 (CD27), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFRSF8 (CD30), TNFSF11 (RANKL), TNFRSF11A (RANK), TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF12 (TWEAKR), TNFSF13 (APRIL), TNFSF13B (BLYS), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFSF15 (TL1A), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF19L (RELt), TNFRSF19 (TROY), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF25 (DR3), ANG1 (ANGPT1), ANG3 (ANGPTL1), ANG4 (ANGPT4), IL1 alfa, IL1 beta, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2R, IL5, IL5R, IL6, IL6R, IL8, IL8R, IL10, IL10R, IL12, IL12R, IL13, IL13R, IL15, IL15R, IL18, IL18R, IL19, IL19R, IL21R, IL23, IL23R, mif, XAG1, XAG3, REGIV, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, ALK, ALK1, ALK7, ALCAM, Artemin, Axl, TGFb, TGFb2, TGFb3, TGFBR1, IGFIIR, BMP2, BMP5, BMP6, BMPRI, GDF3, GDF8, GDF9, N-cadherina, E-cadherina, VE-cadherina, NCAM, L1CAM (CD171), gangliósido GM2, gangliósido GD2, calcitonina, PSGR, DCC, CDPC1, CXCR2, CXCR7, CCR3, CCR5, CCR7, CCR10, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL12, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, Claudin1, Claudin2, Claudin3, Claudin4, TMEFF2, neuregulina, MCSF, CSF, CSFR (fms), GCSF, GCSFR,

BCAM, HPV, hCG, SR1F, PSA, FOLR2 (receptor beta de folato), BRCA1, BRCA2, HLA-DR, ABCC3, ABCB5, HM1.24, LFA1, LYNX, S100A8, S100A9, SCF, factor de Von Willebrand, receptor Lewis Y6, Lewis Y, CA G250 (CA9), integrina avb3 (CNT095), integrina avb5, activina B1 alfa, receptor B4 de leucotrieno (LTB4R), receptor NT de neurotensina (NTR), antígeno oncofetal 5T4, Tenascina C, MMP, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, MMP14, MMP26, cathepsina G, cathepsina H, cathepsina L, SULF1, SULF2, MET, UPA, MHC1, MN (CA9), TAG-72, TM4SF1, Heparanasa (HPSE), syndecan (SDC1), Efrina B2, Efrina B4 o relaxina 2. Un MRD que se une a una de las dianas anteriores está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las dianas anteriores también están abarcadas por la invención. El anticuerpo anterior y las dianas de MRD y aquellas descritas de otro modo en el presente documento pretenden ser ilustrativos y no limitantes.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser CD19, CD22, CD30, CD33, CD38, CD44v6, TNFSF5 (ligando de CD40), TNFRSF5 (CD40), CD52, CD54 (ICAM), CD74, CD80, CD200, EPCAM (EGP2), neuropilina 1 (NRP1), TEM1, mesotelina, TGFbeta 1, TGFBR1, fosfatidilserina, receptor alfa de folato (FOLR1), TNFRSF10A (TRAIL R1 DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5), CXCR4, CCR4, CCL2, HGF, CRYPTO, VLA5, TNFSF9 (ligando de 41BB), TNFRSF9 (41BB), CTLA4, HLA-DR, IL6, TNFSF4 (ligando de OX40), TNFRSF4 (OX40), MUC1, MUC18, mucina CanAg, gangliósido GD3, EGFL7, PDGFRa, IL21, IGF1, IGF2, CD117 (cKit), PSMA, SLAMF7, antígeno carcinoembrionario (CEA), FAP, integrina avb3 o integrina $\alpha 5\beta 3$. Un MRD que se une a una de las dianas anteriores está abarcado por la divulgación. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las dianas anteriores también están abarcadas por la divulgación.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión a la diana con un anticuerpo seleccionado entre: sipilizumab *CD2* (por ejemplo, MEDI-507, MedImmune), blinatumomab *CD19 CD3* (por ejemplo, MT103, Micromet/MedImmune); XMAB@5574 *CD19* (Xencor), SGN-19A *CD19* (Seattle Genetics), ASG-5ME (Agenesys y Seattle Genetics), MEDI-551 *CD19* (MedImmune), epratuzumab *CD22* (por ejemplo, hLL2, Immunomedics/UCB), inotuzumab ozogamicina *CD22* (Pfizer), iratumumab *CD30* (por ejemplo, SGN-30 (Seattle Genetics) y MDX-060 (Medarex)), XMAB@2513 *CD30* (Xencor), brentuximab vedotina *CD30* (por ejemplo, SGN-35, Seattle Genetics), gemtuzumab ozogamicina *CD33* (por ejemplo, MYLOTARG®, Pfizer), lintuzumab *CD33* (por ejemplo, anticuerpo de Seattle Genetics), MOR202, *CD38* (MorphoSys), daratumumab *CD38* (por ejemplo, anticuerpo de Genmab), CP870893 *CD40* (Pfizer), dacetuzumab *CD40* (por ejemplo, SGN40, Seattle Genetics), ANTOVA® *CD40* (Biogen Idec), lucatumumab *CD40* (por ejemplo, HCD122, Novartis) XMAB@5485 *CD40* (Xencor), teneliximab, ruplizumab *CD40L* (por ejemplo, ANTOVA®) bivatumumab mertansina *CD44v6*, alemtuzumab *CD52* (por ejemplo, CAMPATH®/MABCAMPATH®, Genzyme/Bayer), BI505 *ICAM1* (Bioinvent), milatuzumab *CD74* (por ejemplo, anticuerpo de Immunomedics), galiximab *CD80* (Biogen Idec), BMS663513 *4-1BB* (Bristol-Myers Squibb), anticuerpo Alexion *CD200* (Alexion), edrecolomab *EPCAM* (por ejemplo, MAb17-1A, PANOREX® (GlaxoSmithKline), AT003 *EPCAM* (Affitech)), adecatimumab *EPCAM* (por ejemplo, MT201, Micromet), oportuzumab monatox *EPCAM*, Genentech anticuerpo anti-NRP1, MORAB004 *TEM1* (Morphotek), MORAB009 *mesotelina* (Morphotek), lerdelumab *TGFb1* (por ejemplo, CAT-152, Cambridge Antibody Technology), metelimumab *TGFb1* (por ejemplo, CAT-192, Cambridge Antibody Technology), anticuerpo ImClone anti-TGFBR1, bavixumab fosfatidilserina (por ejemplo, anticuerpo de Peregrine (Peregrine Pharmaceuticals)), AT004 *fosfatidilserina* (Affitech), AT005 *fosfatidilserina* (Affitech), MORAB03 *receptor alfa de folato* (Morphotek), farletuzumab *receptor alfa de folato* cáncer (por ejemplo, MORAB003, Morphotek), CS1008 *DR4* (Sankyo), mapatumumab *DR4* (por ejemplo, HGS-ETR1, Human Genome Sciences), LBY135 *DR5* (Novartis), AMG66 *DR5* (Amgen), Apomab *DR5* (Genentech), PRO95780 (Genentech), lextatumumab *DR5* (por ejemplo, HGS-ETR2, Human Genome Sciences), conatumumab *DR5* (por ejemplo, AMG655, Amgen), tigatuzumab *DR5* (por ejemplo, CS-1008), AT009 *CXCR4* (Affitech), AT008 *CCR4* (Affitech), CNTO-888 *CCL2* (Centocor), AMG102 *HGF* (Amgen), anticuerpo CRYPTO (Biogen Idec), anticuerpo M200 *VLA5* (Biogen Idec), ipilimumab *CTLA4* (por ejemplo, MDX-010, Bristol-Myers Squibb/Medarex), belatacept *CTLA4 ECD* (por ejemplo, CP-675.206, Pfizer), IMMU114 *HLA-DR* (Immunomedics), apolizumab *HLA-DR*, toclizumab *IL6R* (por ejemplo, ACTEMR®/ ROACTREMRA®, Hoffman-La Roche), OX86 *OX40*, pemtumomab *PEM/MUC1* (Theragyn), ABX-MA1 *MUC-18* (Abgenix), clivatuzumab *MUC-18* (por ejemplo, hPAM4, Immunomedics), cantuzumab mertansina *mucin CanAg*, ecomeximab (Ludwig Institute), Genentech anticuerpo anti-EGFL7, AMG820 *CSFR* (Amgen), olaratumab *PDGFRa* (por ejemplo, anticuerpo de Imclone (Imclone)), anticuerpo IL21 de Zymogenetics (Zymogenetics), MEDI-573 *IGF1/IGF2* (MedImmune), AMG191 *cKit* (Amgen), etaracizumab (por ejemplo, MEDI-522, MedImmune), y MLN591 *PSMA* (Millennium Pharmaceuticals), elotuzumab *SLAMF7* (por ejemplo, HuLuc63, BMS), labetuzumab *CEA* (CEA-CIDE®, Immunomedics), sibrotuzumab *FAP*, CNT095 *integrina avb3* (Centocor), VITAXIN® *integrina avb3* (MedImmune) y voloximab *$\alpha 5\beta 1$* (las dianas de los anticuerpos se encuentran en cursiva). Los MRD que compiten por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores están abarcados por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión a la diana con un anticuerpo seleccionado entre: MDX-1342 *CD19* (BMS), SGN-CD19A *CD19* (Seattle Genetics), un anticuerpo anti-CD20 descrito en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.500.362, ofatumumab *CD20* (por ejemplo, ARZERRA®, GENMAB), veltuzumab *CD20* (hA20, Takeda y Nycomed), PRO70769 *CD20* (Genentech; véase, por ejemplo, la

Solicitud Internacional n.º PCT/US2003/040426), AMG780 *Tie2/Ang1* (Amgen), REGN910 *ANG2* (Regeneron) y el anticuerpo anti-CD22 descrito en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.789.554 (Immunomedics), lumiliximab *CD23* (por ejemplo, IDEC152, Biogen), IDEC-152 *CD23* (Biogen), MDX-1401 *CD30* (BMS), HeFi-1 *CD30* (NCI), daratumumab *CD38*, un anticuerpo anti *CD40* descrito en la Publicación de Solicitud Internacional n.º WO2007124299 (Novartis), IDEC-131 *CD40L* (Biogen), MDX-1411 *CD70* (BMS), SGN-75 *CD70* ADC (Seattle Genetics), HuMax-CD74™ *CD74* ADC (Genmab), IDEC-114 *CD80* (Biogen), TRC105 *CD105/endoglin* (Tacon), ABX-CBL *CD147* (Amgen), RG1HuMax-TF™ *Tissue Factor* (TF)(Genmab), HuMax-Her2™ *ErbB2* (Genmab), Trastuzumab-DMI *ErbB2-DM1* (Genentech), AMG888 *HER3* (Amgen y Daiichi Sankyo), HuMV833 *VEGF* (Tsukuba Research Lab, véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud Internacional n.º WO/2000/034337), IMC-18F1 *VEGFR1* (Imclone), IMC-1C11 *VEGFR* (Imclone), DC101 *VEGFR2* (Imclone), KSB-102 *EGFR* (KS Biomedix), mAb-806 *EGFR* (Ludwig Institute for Cancer Research), MR1-1 *EGFRvIII toxin* (IVAX, National Cancer Institute), HuMax-EGFR *EGFR* (Genmab, véase, por ejemplo, la Solicitud de los Estados Unidos n.º 10/172.317), IMC-11F8 *EGFR* (Imclone), CDX-110 *EGFRvIII* (AVANT Immunotherapeutics), zalumumab *EGFR* (Genmab), 425, EMD55900 y EMD62000 *EGFR* (Merck KGaA, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.558.864), ICR62 *EGFR* (Institute of Cancer Research, véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud Internacional n.º WO95/20045), SC100 *EGFR* (Scancell e ISU Chemical), MOR201 *FGFR-3* (Morphosys), ARGX-111 *c-Met* (arGEN-X), HuMax-cMet™ *cMet* (Genmab), GC-1008 *TGFb1* (Genzyme), MDX-070 *PMSA* (BMS), huJ591 *PSMA* (Cornell Research Foundation), muJ591 *PSMA* (Cornell Research Foundation), GC1008 *TGFb* (Genzyme), NG-1 *Ep-CAM* (Xoma), MOR101 *ICAM-1 (CD54)* (Morphosys), MOR102 *ICAM-1 (CD54)* (Morphosys), ABX-MA1 *MUC18* (Abgenix), HumaLYM (Intracel), HumaRAD-HN (Intracel), HumaRAD-OV (Intracel), ARGX-110 y ARGX-111 (arGEN-X), HuMax-Lymphoma (Genmab y Amgen), Milatuzumab *CD74* (por ejemplo, IMMU-115, IMMU-110; Immunomedics), HuMax-Cancer *Heparanase I* (Genmab), Hu3S193 *Lewis (y)* (Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research), RAV12 *epítipo de carbohidrato unido en N* (Raven), nimotuzumab (TheraCIM, hR3; YM Biosciences, véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.891.996 y 6.506.883), BEC2 *GD3* (Imclone), ⁹⁰Ytacetuzumab tetraxetan *alfa fetoproteína* (por ejemplo, FP-CIDE®, Immunomedics), KRN330 (Kirin), huA33 *A33* (Ludwig Institute for Cancer Research), mAb 216 *epítipo glucosilado de linfocitos B* (NCI), REGN421 *DLL4* (Regeneron), ASG-5ME *SLC44A4 ADC (AGS-5)*, ASG-22ME *Nectin-4 ADC*, CDX-1307 (MDX-1307), *hCgb* (Celldex), *proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTH-rP)(UCB)*, MT293 *colágeno escindido* (TRC093/D93, Tacon), KW-2871 *GD3* (Kyowa), KIR (1-7F9) *KIR* (Novo), A27.15 *receptor de transferrina* (Salk Institute, véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud Internacional n.º WO2005/111082) y E2.3 *receptor de transferrina* (Salk Institute). Los MRD que compiten por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores están abarcados por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcados por la divulgación. Uno de los anticuerpos descritos anteriormente puede ser el anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo seleccionado entre: siplizumab *CD2* (por ejemplo, MEDI-507, MedImmune), blinatumomab *CD19 CD3* (por ejemplo, MT103, Micromet/MedImmune); XMAB®5574 *CD19*, (Xencor), SGN-19A *CD19* (Seattle Genetics), ASG-5ME (Agenesys y Seattle Genetics), MEDI-551 *CD19* (MedImmune), epratuzumab *CD22* (por ejemplo, hLL2, Immunomedics/UCB), inotuzumab *ozogamicina CD22*, iratumumab *CD30* (por ejemplo, SGN-30 (Seattle Genetics) y MDX-060 (Medarex)), XMAB®2513 *CD30* (Xencor), brentuximab vedotina *CD30* (por ejemplo, SGN-35, Seattle Genetics), gemtuzumab *ozogamicina CD33* (por ejemplo, MYLOTARG®, Pfizer), lintuzumab *CD33* (por ejemplo, anticuerpo de Seattle Genetics), MOR202 *CD38* (MorphoSys), daratumumab *CD38* (por ejemplo, anticuerpo de Genmab), CP870893 *CD40* (Pfizer), dacetuzumab *CD40* (por ejemplo, SGN40, Seattle Genetics), ANTOVA® *CD40* (Biogen Idec), lucatumumab *CD40* (por ejemplo, HCD122, Novartis) XMAB®5485 *CD40* (Xencor), teneliximab, ruplizumab *CD40L* (por ejemplo, ANTOVA®), bivatumumab mertansina *CD44v6*, alemtuzumab *CD52* (por ejemplo, CAMPATH®/MABCAMPATH®, Genzyme/Bayer), BI505 *ICAM1* (Bioinvent), milatuzumab *CD74* (por ejemplo, anticuerpo de Immunomedics), galiximab *CD80* (Biogen Idec), BMS663513 *4-1BB* (Bristol-Myers Squibb), anticuerpo Alexion *CD200* (Alexion), edrecolomab *EPCAM* (por ejemplo, MAB17-1A, PANOREX® (GlaxoSmithKline), AT003 *EPCAM* (Affitech)), adecatuzumab *EPCAM* (por ejemplo, MT201, Micromet), oportuzumab monatox *EPCAM*, Genentech anticuerpo anti-NRP1, MORAB004 *TEM1* (Morphotek), MORAB009 *mesotelina* (Morphotek), lerdelimumab *TGFb1* (por ejemplo, CAT-152, Cambridge Antibody Technology), metelimumab *TGFb1* (por ejemplo, CAT-192, Cambridge Antibody Technology), anticuerpo ImClone anti-TGFBR11, bavituximab *fosfatidilserina* (por ejemplo, anticuerpo de Peregrine (Peregrine Pharmaceuticals)), AT004 *fosfatidilserina* (Affitech), AT005 *fosfatidilserina* (Affitech), MORAB03 *receptor alfa de folato* (Morphotek), farletuzumab *receptor alfa de folato* cáncer (por ejemplo, MORAB003, Morphotek), CS1008 *DR4* (Sankyo), mapatumumab *DR4* (por ejemplo, HGS-ETR1, Human Genome Sciences), LB135 *DR5* (Novartis), AMG66 *DR5* (Amgen), Apomab *DR5* (Genentech), PRO95780 (Genentech), lexatumumab *DR5* (por ejemplo, HGS-ETR2, Human Genome Sciences), conatumumab *DR5* (por ejemplo, AMG655, Amgen), tigatuzumab (por ejemplo, CS-1008), AT009 *CXCR4* (Affitech), AT008 *CCR4* (Affitech), CNTO-888 *CCL2* (Centocor), AMG102 *HGF* (Amgen), anticuerpo CRYPTO (Biogen Idec), anticuerpo M200 *VLA5* (Biogen Idec), ipilimumab *CTLA4* (por ejemplo, MDX-010, Bristol-Myers Squibb/Medarex), belatacept *CTLA4 ECD* (por ejemplo, CP-675.206, Pfizer), IMMU114 *HLA-DR* (Immunomedics), apolizumab *HLA-DR*, tocilizumab *IL6R* (por ejemplo, ACTEMR®/ROACTREMRA®, Hoffman-La Roche) OX86 *OX40*, pemtumomab *PEM/MUC1* (Theragyn), ABX-MA1 *MUC-18* (Abgenix), cantuzumab mertansina *mucin CanAg*, ecomeximab (Ludwig Institute), Genentech anticuerpo anti-EGFL7, AMG820 *CSFR* (Amgen), olaratumab *PDGFRa* (por ejemplo, anticuerpo de Imclone (Imclone)),

anticuerpo IL21 de Zymogenetics (Zymogenetics), MEDI-573 IGF1/IGF2 (MedImmune), AMG191 *cKit* (Amgen), etaracizumab (por ejemplo, MEDI-522, MedImmune), MLN591 *PSMA* (Millennium Pharmaceuticals), elotuzumab *SLAMF7* (por ejemplo, HuLuc63, PDL), labetuzumab CEA (CEA-CIDE®, Immunomedics), sibrotuzumab *FAP*, CNT095 *integrina avb3* (Centocor), VITAXIN® *integrina avb3* (MedImmune) y voloximab $\alpha 5\beta 1$ (por ejemplo, M200, PDL y Biogen Idec).

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser ALK1. El anticuerpo puede ser PF-3.446.962 (Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que PF-3.446.962. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de PF-3.446.962 a ALK1. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de ALK1 a PF-3.446.962 también están abarcados por la invención.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser CD22. El anticuerpo puede ser inotuzumab (por ejemplo, inotuzumab ozogamicina CMC-544, PF-5.208.773; Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que inotuzumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de inotuzumab a CD22. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de CD22 a inotuzumab también están abarcadas por la divulgación.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser CRYPTO. El anticuerpo puede ser el anticuerpo Biogen CRYPTO que se ha incluido en ensayos clínicos de fase I (Biogen Idec). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo Biogen CRYPTO. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión del anticuerpo Biogen CRYPTO a CRYPTO. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de CRYPTO al anticuerpo Biogen CRYPTO también están abarcadas por la invención.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD es TNFSF5 (CD40 LIGAND). El anticuerpo es el anticuerpo Biogen CD40L que se ha incluido en ensayos clínicos de fase I (Biogen Idec). El anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo Biogen CD40L. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión del anticuerpo Biogen CD40L a CD40L. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de CD40L al anticuerpo Biogen CD40L también están abarcadas por la invención.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser CD80. El anticuerpo puede ser galiximab (Biogen Idec). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que galiximab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de galiximab a CD80. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de CD80 a galiximab también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD80 y a una diana seleccionada entre: CD2, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, TNFRSF5 (CD40), CD52, CD74, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), VEGFR1, VEGFR2 y VEGF. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD80 y a una diana seleccionada entre: CD3, CD4 y NKG2D. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CD80 y que también se unen a al menos 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la divulgación. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD80. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser galiximab.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser MCSF. El anticuerpo puede ser PD-360.324 (Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que PD-360.324. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de PD-360.324 a MCSF. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de MCSF a PD-360.324 también están abarcadas por la invención.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser CD44. El anticuerpo puede ser PF-3.475.952 (Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que PF-3.475.952. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de PF-3.475.952 a CD44. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de CD44 a PF-3.475.952 también están abarcados por la invención.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser p-cadherina (CDH3). El anticuerpo puede ser PF-3.732.010 (Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que PF-3.732.010. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de PF-3.732.010 a p-cadherina. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de p-cadherina a PF-3.732.010 también están abarcadas por la invención.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser ANG2 (ANGPT2). El anticuerpo puede ser MEDI3617 (MedImmune). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que MEDI3617. El anticuerpo puede inhibir

de manera competitiva la unión de MEDI3617 a ANG2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de ANG2 a MEDI3617 también están abarcadas por la invención.

5 El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a ANG-2 divulgado en las Patentes de los Estados Unidos n.º 7.063.965, 7.063.840, 6.645.484, 6.627.415, 6.455.035, 6.433.143, 6.376.653, 6.166.185, 5.879.672, 5.814.464, 5.650.490, 5.643.755, 5.521.073; las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos n.º 2011/0158978 (por ejemplo, H4L4), 2006/0246071, 2006/0057138, 2006/0024297, 2006/0018909, 2005/0100906, 2003/0166858, 2003/0166857, 2003/0124129, 2003/0109677, 10 2003/0040463 y 2002/0173627; o las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO2006/020706, WO2006/045049, WO2006/068953 o WO2003/030833. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de ANG2 a estos anticuerpos también están abarcadas por la invención.

15 Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ANG2 y además, se une a una diana seleccionada entre: VEGF (es decir, VEGFA), VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIA, FGFR2-IIIB y FGFR2-IIIC), FGFR3, TNF, FGFR3, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL1, IL1beta, IL6, IL8, IL18, HGF, PDGFA,

20 PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Notch 1, DLL4, EGFL7, α 2 β 1 integrina, α 4 β 1 integrina, α 5 β 1 integrina, α v β 3 integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAU, VCAM1, PDG-FRA y PDGFRB. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a ANG2 y al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser MEDI3617, AMG780 o 25 REGN910. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser H4L4.

El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ANG2 y TNF. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ANG2 e IL6. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ANG2 e IL1. El anticuerpo que contiene MRD administrado puede unirse a ANG2, IL6 y TNF. El anticuerpo que contiene MRD administrado puede unirse a ANG2, 30 IL1 y TNF. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ANG2, IL1, IL6 y TNF.

El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ANG2 y TNF y el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD es adalimumab. El anticuerpo que contiene MRD puede competir con adalimumab por la unión a TNF.

35 El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ANG2. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a ANG2 seleccionado entre SAITAng-2-1, SAITAng-2-2, SAITAng-2-3, SAITAng-2-4 u otro anticuerpo divulgado en la Publicación de Solicitud Internacional n.º WO2009/142460. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen un anticuerpo y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de ANG2 a uno o más de estos anticuerpos también están abarcadas por la invención. 40

El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TIE2. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a TIE2 divulgado en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.365.154 y 6.376.653; las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos n.º 2007/0025993, 45 2006/0057138 y 2006/0024297; o las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO2006/020706, WO2000/018437 y WO2000/018804. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen un anticuerpo y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de TIE a uno o más de estos anticuerpos también están abarcadas por la invención.

50 La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser EGFR(ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor de factor I de crecimiento de tipo insulina, antígeno de membrana específico de próstata, una integrina o cMet.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a EGFR(ErbB1). El anticuerpo 55 es ERBITUX® (IMC-C225). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que ERBITUX®. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de ERBITUX® a EGFR. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede inhibir la dimerización de EGFR. El anticuerpo puede ser matuzumab (por ejemplo, EMD 72000, Merck Serono) o panitumumab (por ejemplo, VECTIBIX®, Amgen). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que matuzumab o panitumumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de matuzumab o panitumumab a EGFR. 60 El anticuerpo puede ser ABX-EGF (Immunex) o MEDX-214 (Medarex). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que ABX-EGF o MEDX-214. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de ABX-EGF o MEDX-214 a EGFR. El anticuerpo puede ser zalutumumab (Genmab) o nimotuzumab (Biocon). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que zalutumumab (Genmab) o nimotuzumab (Biocon). El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de zalutumumab (Genmab) o nimotuzumab (Biocon) a EGFR. 65

- Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a EGFR(ErbB1) y a una diana seleccionada entre: HGF, CD64, CDCP1, RON, cMET, ErbB2, ErbB3, IGF1R, PLGF, RGMa, PDGFRa, PDGFRb, VEGFR1, VEGFR2, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), IGF1, 2, IGF2, CD3, CD4, NKG2D y toxoide tetánico. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a EGFR. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser matuzumab, panitumumab, MEDX-214 o ABX-EGF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser nimotuzumab (Biocon) o zalutumumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB1 y además se une a ErbB3. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB1 y un MRD del anticuerpo que contiene MRD se une a ErbB3. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser cetuximab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB1 a cetuximab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a ErbB1 seleccionado entre: nimotuzumab (Biocon), matuzumab (Merck KGaA), panitumumab (Amgen), zalutumumab (Genmab), MEDX-214 y ABX-EGF. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB1 a un anticuerpo seleccionado entre: nimotuzumab, matuzumab, panitumumab y zalutumumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB3 y un MRD del anticuerpo que contiene MRD se une a ErbB1. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a ErbB3 seleccionado entre MM121 (Merrimack), 8B8 (Genentech), AV203 (Aveo) y AMG888 (Amgen). El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB3 a un anticuerpo seleccionado entre MM121, 8B8, AV203 y AMG888.
- El anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a ErbB2 (Her2). El anticuerpo puede ser trastuzumab (por ejemplo, HERCEPTIN®, Genentech/Roche). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que trastuzumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de trastuzumab a ErbB2. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 de los anticuerpos anteriores.
- El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a ErbB2. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que se une de manera específica al mismo epítipo que el anticuerpo anti-ErbB2, trastuzumab (por ejemplo, HERCEPTIN®, Genentech). El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de ErbB2 al anticuerpo anti-ErbB2, trastuzumab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser el anticuerpo anti-ErbB2, trastuzumab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede inhibir la dimerización de HER2. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede inhibir la heterodimerización de HER2 con HER3 (ErbB3). El anticuerpo puede ser pertuzumab (por ejemplo, OMNITARG® y phrMab2C4, Genentech). El anticuerpo puede unirse específicamente al mismo epítipo que pertuzumab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de ErbB2 a pertuzumab. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención. Por consiguiente, el anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser trastuzumab y 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD en el anticuerpo que contiene MRD inhiben de manera competitiva la unión de ErbB2 a pertuzumab.
- El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a ErbB2 seleccionado entre el grupo: MDX-210 (Medarex), tgDCC-E1A (Targeted Genetics), MGAH22 (MacroGenics) y pertuzumab (OMNITARG™, 2C4; Genentech). También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3 o 4 de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con al menos 1, 2, 3 o 4 de los anticuerpos anteriores.
- El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y además se une a ErbB3. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y un MRD del anticuerpo que contiene MRD se une a ErbB3. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser trastuzumab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB2 a trastuzumab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a ErbB2 seleccionado entre: MDX-210 (Medarex), tgDCC-E1A (Targeted Genetics), MGAH22 (MacroGenics) y pertuzumab (OMNITARG™). El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB2 a un anticuerpo seleccionado entre: MDX-210, tgDCC-E1A, MGAH22 y pertuzumab. El componente de

anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB3 y un MRD del anticuerpo que contiene MRD se une a ErbB2.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede comprender las CDR del anticuerpo anti-ErbB2 trastuzumab. En la tabla 1 se proporcionan las secuencias de CDR, VH y VL de trastuzumab.

Tabla 1

CDR	Secuencia
VL-CDR1	RASQDVNTAVAW (SEQ ID NO:59)
VL-CDR2	SASFLYS (SEQ ID NO:60)
VL-CDR3	QQHYTTPPT (SEQ ID NO:61)
VH-CDR1	GRNIKDTYIH (SEQ ID NO:62)
VH-CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO:63)
VH-CDR3	WGGDGFYAMDY (SEQ ID NO:64)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO:65)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVVSS (SEQ ID NO:66)

El anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a ErbB3 (Her3). El anticuerpo puede ser MM121 (Merrimack Pharmaceuticals) o AMG888 (Amgen). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que MM121 o AMG888. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de MM121 o AMG888 a ErbB3. El anticuerpo puede ser AV-203 (AVEO). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que AV-203. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de AV-203. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1 o ambos de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a VEGF (VEGFA). El anticuerpo puede ser bevacizumab (por ejemplo, AVASTIN®, Genentech/Roche). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que bevacizumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de bevacizumab a VEGFA. El anticuerpo que contiene MRD puede ser AT001 (Affitech). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que AT001. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de AT001 a VEGFA. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1 o ambos de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede comprender las CDR del anticuerpo anti-VEGF bevacizumab. En la tabla 2 se proporcionan las secuencias de CDR, VH y VL de bevacizumab.

Tabla 2

CDR	Secuencia
VL-CDR1	SASQDISNYLN (SEQ ID NO:72)
VL-CDR2	FTSSLHS (SEQ ID NO:73)
VL-CDR3	QQYSTVPWT (SEQ ID NO:74)
VH-CDR1	GYTFTNYGMN (SEQ ID NO:75)
VH-CDR2	WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO:76)
VH-CDR3	YPHYYGSSHWFYFDV (SEQ ID NO:77)

CDR	Secuencia
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKV LIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTV PWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:78)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG LEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAE DTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:79)

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a VEGF. El anticuerpo puede ser bevacizumab (por ejemplo, AVASTIN®, Genentech). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que bevacizumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de bevacizumab a VEGF. El anticuerpo puede ser r84 (Peregrine) o 2C3 (Peregrine). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que r84 o 2C3. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de VEGF a r84 o 2C3. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o 3 de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF y además se une a una diana angiogénica seleccionada entre: VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIA, FGFR2-IIIB y FGFR2-IIIC), FGFR3, TNFSF2 (TNFa), FGFR3, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL6, IL8, IL18, HGF, TIE2, PDGFA, PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Notch 1, DLL4, EGFL7, $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha v\beta 3$ integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAU, VCAM1, PDG-FRA y PDGFRB. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a VEGF y a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser r85, 2C3 o AT001. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser bevacizumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF y además se une a una diana seleccionada entre: IL1 beta, fosfatidilserina, TNFSF11 (RANKL), TNFSF12 (TWEAK), IGF1.2, IGF2, IGF1, DKK1, SDF2, CXC3CL1 (fractalcina), esclerostina y toxoide tetánico y HGF. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF y además se une a una diana seleccionada entre: ErbB3, EGFR, cMet, VEGF, RON (MST1R), DLL4, CDCP1 CD318), NRP1, ROBO4, CD13, CTLA4 (CD152), ICOS (CD278), CD20, CD22, CD30, CD33, CD80 y IL6R. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a VEGF y a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser r85, 2C3 o AT001. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser bevacizumab.

El anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a VEGFR1. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de Aflibercept (Regeneron) a VEGFR1. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede inhibir la dimerización de VEGFR1. Un MRD que compite por la unión a la diana con Aflibercept también está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con Aflibercept también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a VEGFR2. El anticuerpo puede ser ramucirumab (por ejemplo, IMC1121B e IMC1C11, ImClone). El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede inhibir la dimerización de VEGFR2. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que ramucirumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de ramucirumab a VEGFR2. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de Aflibercept a VEGFR2. Un MRD que compite por la unión a la diana con ramucirumab también está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con ramucirumab o Aflibercept también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a un receptor de FGF (por ejemplo, FGFR1, FGFR2, FGFR3 o FGFR4). El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que se une específicamente a FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC). El anticuerpo puede ser IMC-A1 (Imclone). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que IMC-A1. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de IMC-A1 a FGFR1. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de FP-1039

(Five Prime) a un ligando FGF de FGFR1. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que se une específicamente a FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIB y FGFR2-IIIC). El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que se une específicamente a FGFR3. El anticuerpo puede ser IMC-A1 (Imclone). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que PRO-001 (ProChon Biotech), R3Mab (Genentech) o 1A6 (Genentech). El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de PRO-001 (ProChon Biotech), R3Mab (Genentech) o 1A6 (Genentech). Un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores o trampas de ligando también está abarcado por la presente invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1 o más de los anticuerpos anteriores o trampas de ligando también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a CD20. El anticuerpo puede ser rituximab (por ejemplo, RITUXAN®/MABTHERA®, Genentech/Roche/Biogen Idec). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que rituximab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de rituximab a CD20. El anticuerpo puede ser GA101 (Biogen Idec/Roche/Glycart). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que GA101. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de GA101 a CD20. El anticuerpo puede ser PF-5.230.895 (SBI-087; Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que PF-5.230.895. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de PF-5.230.895 a CD20. El anticuerpo puede ser ocrelizumab (por ejemplo, 2H7; Genentech/Roche/Biogen Idec). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que ocrelizumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de ocrelizumab a CD20. El anticuerpo que contiene MRD puede seleccionarse entre: obinutuzumab (por ejemplo, GA101; Biogen Idec/Roche/Glycart), ofatumumab (por ejemplo, ARZERRA® y HuMax-CD20 Genmab), veltuzumab (por ejemplo, IMMU-160, Immunomedics), AME-133 (Applied Molecular Evolution), SGN35 (Millennium), TG-20 (GTC Biotherapeutics), afutuzumab (Hoffman-La Roche) y PRO131921 (Genentech). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado entre: obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, AME-133, SGN35, TG-20 y PRO131921. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de CD20 a un anticuerpo seleccionado entre: obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, AME-133, SGN35, TG-20, afutuzumab y PRO131921. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 de los anticuerpos anteriores.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD20 y a una diana seleccionada entre: CD19, CD22, CD30, TNFRSF5 (CD40), CD52, CD74, CD80, CD138, VEGFR1, VEGFR2, EGFR, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), TNF, NGF, VEGF, IGF1.2, IGF2, IGF1 y RANKL. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD20 y a una diana seleccionada entre: CD3, CD4 y NKG2D. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CD20 y también se unen a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD20. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo seleccionado entre: rituximab, GA101, PF-5.230.895, ocrelizumab obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab, AME-133, SGN35, TG-20, afutuzumab y PRO131921.

El anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a IGF1R. El anticuerpo puede seleccionarse entre: cixutumumab (por ejemplo, IMC-A12, Imclone), figitutumumab (por ejemplo, CP-751.871, Pfizer), AMG479 (Amgen), BIIB022 (Biogen Idec), SCH 717454 (Schering-Plough) y R1507 (Hoffman La-Roche). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado entre: cixutumumab, figitutumumab, AMG479, BIIB022, SCH 717454 y R1507. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de IGF1R a un anticuerpo seleccionado entre: cixutumumab, figitutumumab, AMG479, BIIB022, SCH 717454 y R1507. El anticuerpo puede ser figitutumumab. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que figitutumumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de IGF1R a figitutumumab. El anticuerpo puede ser BIIB022. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que BIIB022. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de IGF1R a BIIB022. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede inhibir la dimerización de IGF1R. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a IGF1R con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a IGF1R con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 de los anticuerpos anteriores.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IGF1R y a una diana seleccionada entre: EGFR, ErbB2, ErbB3, PDGFRa, PDGFRb, cMet, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), CD20, NKG2D, VEGF, PGE2, IGF1, IGF2 e IGF1.2. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IGF1R y a una diana seleccionada entre: CD3, CD4 y NKG2D. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a IGF1R y se unen a 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IGF1R. El componente de anticuerpo

del anticuerpo que contiene MRD puede seleccionarse entre: cixutumumab, figitumumab, AMG479, BIIB022, SCH 717454 y R1507.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a una diana (por ejemplo, ligando, receptor o proteína accesoria) asociada con un sistema de transporte mediado por un receptor de la barrera hematoencefálica (BBB) (por ejemplo, los sistemas de transportes mediados por el receptor de insulina, el receptor de transferrina, el receptor de leptina, el receptor de lipoproteína y el receptor de IGF receptor) y es capaz de atravesar al lado cerebral de la BBB. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) tiene 2, 3, 4, 5 o más sitios de unión para (es decir, es capaz de unirse de manera multivalente a) un antígeno diana (por ejemplo, ligando, receptor o proteína accesoria) asociada con un sistema de transporte mediado por un receptor de la BBB (por ejemplo, los sistemas de transporte mediados por el receptor de insulina, el receptor de transferrina, el receptor de leptina, el receptor de lipoproteína y el receptor de IGF). La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener un solo sitio de unión para una diana asociada con un sistema de transporte mediado por receptores de la BBB. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener 2, 3, 4, 5 o más sitios de unión individuales para una diana asociada con un sistema de transporte mediado por receptores de la BBB. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas ubicadas en el lado cerebral (fluido cefalorraquídeo) de la BBB. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse adicionalmente a 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas ubicadas en el lado cerebral (fluido cefalorraquídeo) de la BBB. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas asociadas con una enfermedad o trastorno neurológico. La enfermedad o trastorno neurológico puede seleccionarse entre cáncer de cerebro, una enfermedad neurodegenerativa, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica y Neuro-SIDA (por ejemplo, demencia asociada al SIDA). Por consiguiente, la divulgación describe métodos para tratar a un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente para tratar a una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado entre cánceres de cerebro, una enfermedad neurodegenerativa, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica y Neuro-SIDA (por ejemplo, demencia asociada al SIDA). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar un cáncer cerebral, un cáncer metastásico del cerebro o un cáncer primario del cerebro. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar un tumor neurológico, tal como, un glioma (por ejemplo, un glioblastoma, glioblastoma multiforme (GBM) y astrocitoma), ependimoma, oligodendroglioma, neurofibroma, sarcoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo, adenoma hipofisario, neuroblastoma o cáncer de las meninges (por ejemplo, meningioma, meningiosarcoma y gliomatosis). La divulgación describe métodos para tratar a un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente para tratar una enfermedad neurodegenerativa.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a un sistema de transporte endógeno mediado por receptores de la BBB seleccionado entre los sistemas de transporte mediados por el receptor de insulina, el receptor de transferrina, el receptor de leptina, el receptor de lipoproteína y el receptor de IGF.

La composición multivalente y multiespecífica (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse al receptor de transferrina. El anticuerpo que contiene MRD se une a una diana seleccionada entre: receptor de lipoproteína de baja densidad 1 (LRP-1), un ligando de LRP-1 o un fragmento funcional o una variante del mismo que se une a LRP-1, receptor de lipoproteína de baja densidad 2 (LRP-2), un ligando de LRP-2 o un fragmento funcional o una variante del mismo que se une a LRP-1, una proteína transferrina o un fragmento funcional o variante de la misma, receptor de insulina, TMEM30A, receptor de leptina, receptor del IGF, un ligando de IGFR o un fragmento funcional o variante del mismo, receptor de difteria, un ligando del receptor de difteria o un fragmento funcional o variante del mismo, transportador de colina, un complejo que se une al receptor de colina, un transportador de aminoácidos (por ejemplo, LAT1/CD98, SLC3A2 y SLC7A5), un ligando de transportador de aminoácidos o un fragmento funcional o variante del mismo, RAGE, un ligando de RAGE o un fragmento funcional o variante del mismo, SLC2A1 y un ligando de SLC2A1 o un fragmento funcional o variante del mismo.

La composición multivalente y multiespecífica (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a RAGE. La composición multivalente y multiespecífica (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a RAGE y a una diana seleccionada entre: Abeta, endothelin1, TNF, IL6, MCSF, un AGE, un miembro de S100, HMGB1, LPS y TLR2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas que se unen a RAGE y que también se unen a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la divulgación. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a RAGE.

La composición multivalente y multiespecífica (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a un antígeno diana asociado con un sistema de transporte endógeno mediado por receptores de la barrera hematoencefálica (BBB) y también se une a un antígeno diana seleccionado entre alfa-sinucleína, RGM A, NOGO A, NgR, OMGp MAG, CSPG, semaforinas inhibitoras de neuritas (por ejemplo, semaforina 3A y semaforina 4), una efrina, A-beta, AGE (S100 A, anfoterina), NGF, A-B soluble, aggrecan, midkine, neurocan, versican, fosfacan, Te38 y

PGE2, IL1, IL1R, IL6, IL6R, IL12, IL18, IL23, TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), CD45RB, CD52, CD200, VEGF, VLA4, TNF alfa, Interferón gamma, GMCSF, FGF, C5, CXCL13, CCR2, CB2, MIP 1a y MCP-1. El anticuerpo que contiene MRD puede tener un solo sitio de unión para una diana asociada con un sistema de transporte endógeno mediado por receptores de la barrera hematoencefálica (BBB) y además, se une a una diana seleccionada entre alfa-sinucleína, RGM A, NOGO A, NgR, OMGp MAG, CSPG, semaforinas inhibitoras de neuritas (por ejemplo, semaforina 3A y semaforina 4), una efrina, A-beta, AGE (S100 A, anfoterina), NGF, A-B soluble, aggrecan, midkine, neurocan, versican, fosfacan, Te38, PGE2, IL1, IL1R, IL6, IL6R, IL12, IL18, IL23, TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), CD45RB, CD52, CD200, VEGF, VLA4, TNF alfa, Interferón gamma, GMCSF, FGF, C5, CXCL13, CCR2, CB2, MIP 1a y MCP-1.

El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado entre cáncer de cerebro, una enfermedad neurodegenerativa, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica y Neuro-SIDA (por ejemplo, demencia asociada al SIDA). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para 2 o más de las dianas anteriores. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 2 sitios de unión para 3 o más dianas. Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con el cáncer. Las dianas a las que se une la composición multiespecífica monovalente y multivalente pueden estar asociadas con 1, 2, 3, 4, 5 o más vías de señalización o modos de acción diferentes asociados con el cáncer.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a integrina. El anticuerpo puede seleccionarse entre: MEDI-522 *avb3* (VITAXIN®, MedImmune), CNTO 95 *a5b3* (Centocor), JC7U *avb3* y volociximab *a5b1* (por ejemplo, M200, PDL y Biogen Idec). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado entre: MEDI-522, CNTO 95, JC7U *avb3* y volociximab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de integrina a un anticuerpo seleccionado entre: MEDI-522, CNTO 95, JC7U y M200. El anticuerpo puede ser natalizumab (por ejemplo, TSABRI®, Biogen Idec). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que natalizumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de integrina a natalizumab. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a cMet. El anticuerpo puede seleccionarse entre: MetMab (OA-5D5, Genentech), AMG-102 (Amgen) y DN30. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado entre: MetMab, AMG-102 y DN30. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de cMET a un anticuerpo seleccionado entre: MetMab (OA-5D5), AMG-102 y DN30. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o 3 de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a cMet y el anticuerpo puede seleccionarse entre: 11E1, CE-355621, LA480 y LMH87. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado entre: MetMab, AMG-102 y DN30. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de cMET a un anticuerpo seleccionado entre: 11E1, CE-355621, LA480 y LMH87. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3 o 4 de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a cMET y a una diana seleccionada entre: ErbB2, ErbB3, EGFR, IGF1R, NRP1, RON, PDGFRa, PDGFRb, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, TGF beta, TGF beta R2, CD82, CD152, NGF, BMP2, BMP4, BMP5, BMP9, BMP10, BMPR-IA, ALK1, a3b1 integrina y HGF. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a cMET y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a cMET. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo seleccionado entre: MetMab, AMG-102 y DN30. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo seleccionado entre: 11E1, CE-355621, LA480 y LMH87.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a MST1R (RON). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a RON y a una diana seleccionada entre: EGFR, ErbB2, ErbB3, VEGFR1, VEGFR2, cMET, CXCR4, VEGF, MST, MTSP1, CDCP1, EPHB2, NGF, CXCL12 y HGF (SF). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a MST1R y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a MST1R.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a HGF (SF). El anticuerpo puede ser AMG-102 (Amgen) o SCH 900105 (AV-229, AVEO). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que AMG-102 (Amgen) o SCH 900105 (AV-229, AVEO). El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de HGF a AMG-102 (Amgen) o SCH 900105 (AV-229, AVEO). Un MRD que compite por la unión a la diana con AMG-102 (Amgen) o SCH 900105 (AV-229, AVEO) también está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o 3 de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a HGF y a una diana seleccionada entre: ErbB2, ErbB3, EGFR, IGF1R, NRP1, RON, PDGFRa, PDGFRb, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, TGF beta, TGF beta R2, CD82, CD152, NGF, BMP2, BMP4, BMP5, BMP9, BMP10, BMPR-IA, ALK1, a3b1 integrina, cMET, MST1R (RON), CXCR4, MST, MTSP1, CDCP1, EPHB2, NGF, CXCL12 NRP1 y fosfatidilserina. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a HGF y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser AMG-102 o SCH 900105.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a a5b1 integrina (VLA5). El anticuerpo puede ser volociximab (por ejemplo, M200 Biogen Idec). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que volociximab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de a5b1 integrina a volociximab. Un MRD que compite por la unión de a5b1 integrina a volociximab también está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de a5b1 integrina a volociximab también están abarcadas por la invención.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un antígeno asociado con un trastorno autoinmunitario, inflamatorio u otro trastorno del sistema inmunitario o está asociado con la regulación de una respuesta inmunitaria.

El anticuerpo que contiene MRD puede mejorar el rendimiento de las células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células dendríticas). La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un miembro seleccionado entre: CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD27, CD28, CD30, CD30L, TNFSF14 (LIGHT, ligando de HVEM), CD70, ICOS, ICOSL (B7-H2), CTLA4, PD-1, PDL1 (B7-H1), B7-H4, B7-H3, PDL2 (B7-DC), BTLA, CD46, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), HLA-DR, CD74, PD1, TNFRSF4 (OX40), TNFRSF9 (41BB), TNFSF4 (ligando de OX40), TNFSF9 (ligando de 41BB), TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR), MHC-1, TNFRSF5 (CD40), TLR4, TNFRSF14 (HVEM), FcgammaRIIB y IL4R.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser una diana autoinhibidora seleccionada entre: IL1, IL1 beta, IL1Ra, L-5, IL6, IL6R, CD26L, CD28, CD80, FcRn y Fc Gamma RIIB. Un MRD que se une a una de las dianas anteriores puede estar abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las dianas anteriores también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a prostaglandina E2 (PGE2). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL6R y a una diana seleccionada entre: EGFR, IGF1R, IL6R, TNF, NGF, IL1 beta, IL6, IL17A, VEGF, IL15, IL18, S1P y Abeta. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a PGE2 y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a PGE2.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser una diana inmunoestimuladora (por ejemplo, un agonista de una diana asociada con la activación de células inmunitarias (tal como TNFRSF9 (41BB) o TNFRSF5 (CD40)) o un antagonista de un punto de control inmunitario inhibidor (tal como CTLA-4)). La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser una diana inmunoestimuladora seleccionada entre: CD25, CD28, CTLA-4, PD1, PDL1, B7-H1, B7-H4, IL10, TGFbeta, TNFSF4 (ligando de OX40), TNFRSF4 (OX40), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFRSF5 (CD40), TNFSF9 (ligando de 41BB), TNFRSF9 (41BB), TNFSF14 (LIGHT, ligando de HVEM), TNFRSF14 (HVEM), TNFSF15 (TL1A), TNFRSF25 (DR3), TNFSF18 (ligando de GITR) y TNFRSF18 (GITR). Un MRD que se une a una de las dianas anteriores está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las dianas anteriores también están abarcadas por la invención. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2, 3 o a las 4 dianas seleccionadas entre CTLA-4, TNFRSF18 (GITR), 4-1BB y TNFRSF5 (CD40). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CTLA-4 y a TNFRSF9 (41BB). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CTLA-4 y a TNFRSF18 (GITR). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CTLA-4 y a TNFRSF5 (CD40). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFRSF5 (CD40) y a TNFRSF9 (41BB). El

anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFRSF4 (OX40) y a TNFRSF9 (41BB). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a PD1 e B7-H1. El anticuerpo que contiene MRD puede potenciar una respuesta inmunitaria, tal como la respuesta antitumoral del sistema inmunitario o una respuesta inmunitaria frente a una vacuna.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser una citocina seleccionada entre: IL1 alfa, IL1 beta, IL18, TNFSF2 (TNFa), LTalfa, LT beta, TNFSF11 (RANKL), TNFSF13B (BLYS), TNFSF13 (APRIL), IL6, IL7, IL10, IL12, IL15, IL17A, IL23, OncoStatinM, TGFbeta, BMP2-15, PDGF (por ejemplo, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-CC, PDGF-C, PDGF-D), un miembro de la familia de FGF (por ejemplo, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b y FGF19), VEGF (por ejemplo, VEGFA y VEGFB), MIF y un interferón de tipo I. Un MRD que se une a una de las dianas anteriores está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las dianas anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 de las dianas anteriores.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser una citocina seleccionada entre: TNF, CD25, CD28, CTLA-4, PD1, PDL1, B7-H1, B7-H4, IL10, TGFbeta, TNFSF4 (ligando de OX40), TNFRSF4 (OX40), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFRSF5 (CD40), TNFSF9 (ligando de 41BB), TNFRSF9 (41BB), TNFSF14 (LIGHT, ligando de HVEM), TNFRSF14 (HVEM), TNFSF15 (TL1A), TNFRSF25 (DR3), TNFSF18 (GITR Ligando) y TNFRSF18 (GITR). Un MRD que se une a una de las dianas anteriores está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las dianas anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 de las dianas anteriores.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser IL1Ra, IL1 Rb, IL2, IL3, IL4, IL7, IL10, IL11, IL15, IL16, IL17, IL17A, IL17F, IL18, IL19, IL25, IL32, IL33, interferón beta, SCF, BCA1/CXCL13, CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCL13, CXCL16, C3AR, C5AR, CXCR1, CXCR2, CCR1, CCR3, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, ChemR23, CCL3, CCL5, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, MPL, GP130, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, TREM1, TREM2, FcRn, FcGamma RIIB, oncostatina M, linfotóxina alfa (LTa), subunidad beta 7 de integrina, CD49a (integrina alfa 1), integrina a5b3, MIF, ESM1, WIF1, cathepsina B, cathepsina D, cathepsina K, cathepsina S, TNFSF2 (TNFa), TNFSF3 (LTb), TNFRSF3 (LTBR), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF6B (DcR3), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFRSF8 (CD30), TNFSF9 (ligando de 41BB), TNFRSF9 (41BB), TNFSF11 (RANKL), TNFRSF11A (RANK), TNFSF14 (LIGHT, ligando de HVEM), TNFRSF14 (HVEM), TNFRSF16 (NGFR), TNFSF18 (ligando de GITR), TNFRSF18 (GITR), TNFRSF19L (RELt), TNFRSF19 (TROY), TNFRSF21 (DR6), CD14, CD23, CD25, CD28, CD36, CD36L, CD39, CD52, CD91, CD153, CD164, CD200, CD200R, BTLA, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), B7 h, ICOS, ICOSL (B7-H2), MHC, CD, B7-H3, B7-H4, B7x, SLAM, KIM-1, SLAMF2, SLAMF3, SLAMF4, SLAMF5, SLAMF6 o SLAMF7. Un MRD que se une a una de las dianas anteriores está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las dianas anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 de las dianas anteriores. El anticuerpo anterior y las dianas de MRD y aquellas descritas de otro modo en el presente documento pretenden ser ilustrativos y no limitantes.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser TNFSF1A (TNF/TNF-alfa), TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFSF7 (ligando de CD27, CD70), TNFRSF7 (CD27), TNFSF13B (BLYS), TNFSF13 (APRIL), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFRSF17 (BCMA), TNFSF15 (TL1A), TNFRSF25 (DR3), TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF12 (TWEAKR), TNFSF4 (ligando de OX40), TNFRSF4 (OX40), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFRSF5 (CD40), IL1, IL1 beta, IL1R, IL2R, IL4-Ra, IL5, IL5R, IL6, IL6R, IL9, IL12, IL13, IL14, IL15, IL15R, IL17f, IL17R, IL17Rb, IL17RC, IL20, IL21, IL22RA, IL23, IL23R, IL31, TSLP, TSLPR, interferón alfa, interferón gamma, B7RP-1, cKit, GMCSF, GMCSFR, CTLA-4, CD2, CD3, CD4, CD11a, CD18, CD20, CD22, CD26L, CD30, TNFRSF5 (CD40), CD80, CD86, CXCR3, CXCR4, CCR2, CCR4, CCR5, CCR8, CCL2, CXCL10, PLGF, PD1, B7-DC (PDL2), B7-H1 (PDL1), alfa4 integrina, A4B7 integrina, C5, RhD, IgE o Rh. Un MRD que se une a una de las dianas anteriores está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las dianas anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 de las dianas anteriores.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión a la diana con: SGN-70 CD70 (Seattle Genetics), SGN-75 CD70 (Seattle Genetics), Belimumab BLYS (por ejemplo, BENLYSTA®, Human Genome Sciences/ GlaxoSmithKline), Atacicept BLYS/APRIL (Merck/Serono), TWEAK (por ejemplo, Biogen mAb), anticuerpos TL1A de CoGenesys/Teva (por ejemplo, hum11D8, hum25B9 y hum1B4 (Publicación de la Solicitud de los Estados Unidos n.º 2009/0280116), OX40 mAb, humAb OX40L (Genentech), rilonacept IL1 trap (por ejemplo, ARCALYST®, Regeneron), catumaxomab 1L1beta (por ejemplo, REMOVAB®, Fresenius Biotech GmbH), Xoma052 IL1beta (Lilly),

canakinumab *IL1 β* (por ejemplo, ILARIS® (Novartis) y ACZ885 (Novartis)), AMG108 *IL1R* (Amgen), daclizumab *IL2Ra* (por ejemplo, ZENAPAX®, Hoffman-La Roche), basiliximab *IL2Ra* (por ejemplo, SIMULECT®, Novartis), AMGN-317 *IL4a* (Amgen), pascolizumab *IL4* (PDL), mepolizumab *IL5* (por ejemplo, BOSATRIA®, GlaxoSmithKline), reslizumab *IL5* (por ejemplo, SCH55700, Ception Therapeutics), benralizumab *IL5R* (por ejemplo, MEDI-563 MedImmune), BIW-8405, *IL5R* (BioWa), etanercept *TNFR2-fc* (por ejemplo, ENBREL®, Amgen), siltuximab *IL6* (por ejemplo, CNTO328, Centocor), CNTO136 *IL6* (Centocor), CDP-6038 *IL6* (UCB), AMGN-220 *IL6* (Amgen), REGN-88 *IL6R* (Regeneron), tocilizumab *IL6R* (por ejemplo, ACTEMRA™/ ROACTEMRA™, Chugai/Roche), MEDI-528 *IL9* (MedImmune), briakinumab *IL12/13* (por ejemplo, ABT-874, Abbott), ustekinumab *IL12*, *IL23* (por ejemplo, STELARA® y CNTO 1275, Centocor), TNX-650 *IL13* (Tanox), lebrikizumab *IL13* (Genentech), talokinumab *IL13* (por ejemplo, CAT354, por ejemplo, Cambridge Antibody Technology), AMG714 *IL15* (Amgen), CRB-15 *IL15R* (Hoffman La-Roche), AMG827 *IL17R* (Amgen), IL17RC anticuerpo de Zymogenetics/Merck Serono, IL20 anticuerpo de Zymogenetics, *IL20* anticuerpo de Novo Nordisk, IL21 anticuerpo de Novo Nordisk (por ejemplo, NCT01038674), anticuerpo IL21 de Zymogenetics (Zymogenetics), IL22RA anticuerpo de Zymogenetics, IL31 anticuerpo de Zymogenetics, AMG157 *TSLP* (Amgen), MEDI-545 *interferón alfa* (MedImmune), MEDI-546 *receptor de interferón alfa* (MedImmune), AMG811 *interferón gamma* (Amgen), INNO202 *interferón gamma* (Innogenetics/Advanced Biotherapy), HuZAF *interferón-gamma* (PDL), AMG557 *B7RP1* (Amgen), AMG191 *cKit* (Amgen), MOR103 *GMCSF* (MorphoSys), mavrilimumab *GMCSFR* (por ejemplo, CAM-3001, MedImmune), tremelimumab *CTLA4* (por ejemplo, CP-675.206, Pfizer), ipilimumab *CTLA4* (por ejemplo, MDX-010, BMS/Medarex), alefacept *CD2* (por ejemplo, AMEVIVE®, Astellas), sipilizumab *CD2* (por ejemplo, MEDI-507, MedImmune), otelixizumab *CD3* (por ejemplo, TRX4, Tolerx/GlaxoSmithKline), teplizumab *CD3* (por ejemplo, MGA031, MacroGenics/Eli Lilly), visilizumab *CD3* (por ejemplo, NUVION®, PDL), muromonab-CD3 *CD3* (Ortho), ibalizumab (por ejemplo, TMB-355 y TNX-355, TaiMed Biologics), zanolimumab *CD4* (por ejemplo, HUMAX-CD4®, Genmab), cedelizumab *CD4* (Euroasian Chemicals), keliximab *CD4*, priliximab *CD4* (por ejemplo, cMT412, Centocor), BT-061 *CD4* (BioTest AG), efalizumab *CD11a* (por ejemplo, RAPTIVA®/XANELIM™, Genentech/Roche/Merck-Serono), MLN01 *CD18* (Millennium Pharmaceuticals), epratuzumab *CD22* (por ejemplo, anticuerpo de Amgen) y hLL2; (Immunomedics/UCB)), aselizumab *CD26L*, iratumumab *CD30* (por ejemplo, SGN30 (Seattle Genetics) y MDX-060 (Medarex), SGN40 *CD40* (Seattle Genetics), ANTOVA® *ligando de CD40* (Biogen Idec), abatacept *CD80 CD86* (por ejemplo, ORENCIA®, Bristol-Myers Squibb), CT-011 *PD1* (Cure Tech), GITR (por ejemplo, TRX518, (Tolerx), AT010 *CXCR3* (Affitech), MLN1202 *CCR2* (Millennium Pharmaceuticals), AMG-761 *CCR4* (Amgen), HGS004 *CCR5* (Human Genome Sciences), PRO 140 (Progenics), MDX-1338 *CXCR4* (Medarex), CNTO-888 *CCL2* (Centocor), ABN912 *CCL2* (Novartis), MDX-1100 *CXCL10* (Medarex), TB-403 *PLGF* (BioInvent), natalizumab *subunidad alfa4 de integrina* (por ejemplo, TYSABRI®, Biogen Idec/Elan), vedolizumab *integrina A4B7* (por ejemplo, MLN2, Millennium Pharmaceuticals/Takeda), eculizumab *complemento C5* (por ejemplo, SOLIRIS®, Alexion), pexelizumab *complemento C5* (Alexion), omalizumab *IgE* (por ejemplo, XOLAIR®, Genentech/Roche/Novartis), talizumab (por ejemplo, TNX-901, Tanox), toralizumab (IDEC 131, IDEC), bertilimumab *eotaxina* (por ejemplo, iCo-008, iCos Therapeutics Inc.), ozrolimumab *RhD* (por ejemplo, Sym001, Symphogen A/S), atorolimumab o morolimumab (factor de Rh). También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los anticuerpos anteriores.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser: SGN-70 *CD70* (Seattle Genetics), SGN-75 *CD70* (Seattle Genetics), Belimumab *BLYS* (por ejemplo, BENLYSTA®, Human Genome Sciences/GlaxoSmithKline), BLIB023 *TWEAK* (Biogen Idec), anticuerpos TL1A de CoGenesys/Teva (por ejemplo, 11D8, 25B9 y 1B4 (Publicación de la Solicitud de los Estados Unidos n.º 2009/0280116), OX40 mAb, humAb OX40L (Genentech), catumaxomab *IL1 β* (por ejemplo, REMOVAB®, Fresenius Biotech GmbH), canakinumab *IL1 β* (por ejemplo, ILARIS® (Novartis) y ACZ885 (Novartis)), AMG108 *IL1R* (Amgen), daclizumab *IL2Ra* (por ejemplo, ZENAPAX®, Hoffman-La Roche), basiliximab *IL2Ra* (por ejemplo, SIMULECT®, Novartis), AMGN-317 *IL4a* (Amgen), pascolizumab *IL4* (PDL), mepolizumab *IL5* (por ejemplo, BOSATRIA®, GlaxoSmithKline), reslizumab *IL5* (por ejemplo, SCH55700, Ception Therapeutics), benralizumab *IL5R* (por ejemplo, MEDI-563, MedImmune), BIW-8405, *IL5R* (BioWa), siltuximab *IL6* (por ejemplo, CNTO328, Centocor), CNTO-136 *IL6* (Centocor), CDP-6038 *IL6* (UCB), AMGN-220 *IL6* (Amgen), REGN-88 *IL6R* (Regeneron), tocilizumab *IL6R* (por ejemplo, ACTEMRA™/ ROACTEMRA™, Chugai/Roche), MEDI-528 *IL9* (MedImmune), briakinumab *IL12/13* (por ejemplo, ABT-874, Abbott), ustekinumab *IL12*, *IL23* (por ejemplo, CNTO 1275, Centocor), lebrikizumab *IL13* (Genentech), TNX-650 *IL13* (Tanox), CAT354 *IL13* (Cambridge Antibody Technology), AMG714 *IL15* (Amgen), CRB-15 *IL15R* (Hoffman La-Roche), AMG827 *IL17R* (Amgen), IL17RC anticuerpo de Zymogenetics/Merck Serono, IL20 anticuerpo de Zymogenetics, *IL20* anticuerpo de Novo Nordisk, IL21 anticuerpo de Novo Nordisk, anticuerpo IL21 de Zymogenetics (Zymogenetics), IL22RA anticuerpo de Zymogenetics, IL31 anticuerpo de Zymogenetics, AMG157 *TSLP* (Amgen), MEDI-545 *interferón alfa* (MedImmune), MEDI-546 *receptor de interferón alfa* (MedImmune), AMG811 *interferón gamma* (Amgen), INNO202 *interferón gamma* (Innogenetics/Advanced Biotherapy), HuZAF *interferón-gamma* (PDL), AMG557 *B7RP1* (Amgen), AMG191 *cKit* (Amgen), MOR103 *GMCSF* (MorphoSys), CAM-3001 *GMCSFR* (MedImmune), tremelimumab *CTLA4* (por ejemplo, CP-675.206, Pfizer), ipilimumab *CTLA4* (por ejemplo, MDX-010, BMS/Medarex), sipilizumab *CD2* (por ejemplo, MEDI-507, MedImmune), otelixizumab *CD3* (por ejemplo, TRX4, Tolerx/GlaxoSmithKline), muromonab-CD3 *CD3* (Ortho), teplizumab *CD3* (por ejemplo, MGA031, MacroGenics/Eli Lilly), visilizumab *CD3* (por ejemplo,

NUVION®, PDL), zanolimumab *CD4* (por ejemplo, HUMAX-CD4®, Genmab), cedelizumab *CD4* (Euroasian Chemicals), keliximab *CD4*, priliximab *CD4* (por ejemplo, cMT412, Centocor), BT-061 *CD4* (BioTest AG), ibalizumab (por ejemplo, TMB-355 y TNX-355, TaiMed Biologics), efalizumab *CD11a* (por ejemplo, RAPTIVA®/XANELIM™, Genentech/Roche/Merck-Serono), MLN01 *CD18* (Millennium Pharmaceuticals), epratuzumab *CD22* (por ejemplo, anticuerpo de Amgen) y hLL2 (Immunomedics/UCB)), aselizumab *CD26L* iratumumab *CD30* (por ejemplo, SGN30 (Seattle Genetics) y MDX-060 (Medarex), SGN40 *CD40* (Seattle Genetics), ANTOVA® *ligando de CD40* (Biogen Idec), CT-011 *PD1* (Cure Tech), AT010 *CXCR3* (Affitech), MLN3897 *CCR1* (Millennium Pharmaceuticals), MLN1202 *CCR2* (Millennium Pharmaceuticals), AMG-761 *CCR4* (Amgen), HGS004 *CCR5* (Human Genome Sciences), PRO 140 (Progenics), MDX-1338 *CXCR4* (Medarex), CNTO-888 *CCL2* (Centocor), ABN912 *CCL2* (Novartis), MDX-1100 *CXCL10* (Medarex), TB-403 *PLGF* (BioInvent), natalizumab *subunidad alfa4 de integrina* (por ejemplo, TYSABRI®, Biogen Idec/Elan), vedolizumab *integrina A4B7* (por ejemplo, MLN02, Millennium Pharmaceuticals/Takeda), eculizumab *complemento C5* (por ejemplo, SOLIRIS®, Alexion pharmaceuticals), omalizumab *IgE* (por ejemplo, XOLAIR®, Genentech/Roche/Novartis), talizumab (por ejemplo, TNX-901, Tanox), toralizumab (IDEC 131, IDEC), bertilimumab *eotaxina* (por ejemplo, iCo-008, iCo Therapeutics Inc.), ozrolimumab *RhD* (por ejemplo, Sym001, SympHogen A/S), atorolimumab o morolimumab (factor de Rh).

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión a la diana con un anticuerpo seleccionado entre: oxelumab (por ejemplo, RG4930; Genmab), AMG139 (Amgen), AMG181 (Amgen), CNTO 148 *TNF* (Medarex), un anticuerpo anti-TNF descrito en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.258.562 (BASF), Humicade® *TNF* (Celltech), HuM291CD3 *receptor de fc* (PDL), Mik-beta-1 *IL-2Rb* (*CD122*) (Hoffman LaRoche), REGN668 *IL-4R* (Regeneron), sarilumab *IL-6R* (por ejemplo, REGN88, Regeneron), HuMax-Inflam *IL-8* (por ejemplo, HuMax-Inflam™/ MDX-018; Genmab y Medarex), el anticuerpo anti-IL-12 y/o anti-IL-12p40 divulgado en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.914.128 (Abbott), HuMax-IL15 *IL15* (Medarex y Genmab), ABX-IL8 *IL8* (Abgenix), un anticuerpo anti-IL-18 divulgado en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos n.º 2005/0147610 (Abbott), hCBE-11 *LTBR* (Biogen), HuMax-TAC *IL-2Rα* (*CD25*) (Genmab, véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud Internacional n.º WO2004045512, MLN01 *Beta2 integrina* (Xoma), D3H44 ATF (Genentech), MT203 *GMCSF* (Micromet y Takeda), IFX1/CaCP29 (InflaRx GmbH), CAT-213 *Eotaxin I* (Cambridge Antibody Technologies), MDX-018 *IL-8* (por ejemplo, HuMax-Inflam™; Medarex), REGN846 *IL-4R* (Regeneron, véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos n.º 20100291107), REGN728 (Regeneron), RGN846 (Regeneron), T2-18C3 *IL1A* (MABp1; XBiotech), RA-18C3 *IL1A* (XBiotech) y CV-18C3 *IL1A* (XBiotech). También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos que contienen MRD que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de los anticuerpos anteriores.

Uno de los anticuerpos descritos anteriormente puede ser el anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a CTLA4. El anticuerpo puede ser tremelimumab (por ejemplo, CP-675.206, Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que tremelimumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de tremelimumab a CTLA4. El anticuerpo puede ser ipilimumab (por ejemplo, MDX-010, Bristol-Myers Squibb/Medarex). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que ipilimumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de ipilimumab a CTLA4. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de CTLA4 a tremelimumab o ipilimumab también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a TNFSF12 (TWEAK). El anticuerpo puede ser el anticuerpo para TWEAK de Biogen que se ha incluido en ensayos clínicos de fase I. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo Biogen TWEAK. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión del anticuerpo Biogen TWEAK a TWEAK. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten la unión de TWEAK al anticuerpo de Biogen TWEAK también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a IL2Ra (*CD25*). El anticuerpo puede ser daclizumab (por ejemplo, ZENAPAX®). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que daclizumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de daclizumab a IL2Ra (*CD25*). Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de IL2Ra (*CD25*) a daclizumab también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a CD40 (TNFRSF5). El anticuerpo puede ser CP-870893 *CD40* (Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que CP-870893. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de CP-870893 a CD40. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de CD40 a CP-870893 también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a Alfa4 integrina. El anticuerpo puede ser natalizumab (por ejemplo, TYSABRI®; Biogen Idec/Elan). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que natalizumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de natalizumab a Alfa4 integrina. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de Alfa4 integrina a natalizumab también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a IL22. El anticuerpo puede ser PF-5.212.367 (ILV-094) (Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que PF-5.212.367. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de PF-5.212.367 a IL22. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de IL22 a PF-5.212.367 también están abarcados por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a MAdCAM. El anticuerpo puede ser PF-547.659 (Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que PF-547.659. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de PF-547.659 a MAdCAM. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de MAdCAM a PF-547.659 también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse de manera específica a TNF. El anticuerpo puede ser adalimumab (por ejemplo, HUMIRA®/TRUDEXA®, Abbott). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que adalimumab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de adalimumab a TNF. El anticuerpo puede ser ATN-103 (Pfizer). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que ATN-103. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de ATN-103 a TNF. El anticuerpo puede ser infliximab. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que infliximab. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de infliximab a TNF. El anticuerpo puede seleccionarse entre: certolizumab (por ejemplo, CIMZIA®, UCB), golimumab (por ejemplo, SIMPONI™, Centocor) y AME-527 (Applied Molecular Evolution). El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que certolizumab, golimumab o AME-527. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva la unión de certolizumab, golimumab o AME-527, a TNF. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2, 3, 4 o 5, de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede comprender las CDR del anticuerpo anti-TNF adalimumab. En la tabla 3 se proporcionan las secuencias de CDR, VH y VL de adalimumab.

Tabla 3

CDR	Secuencia
VL-CDR1	RASQGIRNYLA (SEQ ID NO:80)
VL-CDR2	AASTLQS (SEQ ID NO:81)
VL-CDR3	QRYNRAPYT (SEQ ID NO:82)
VH-CDR1	DYAMH (SEQ ID NO:83)
VH-CDR2	AITWNSGHIDYADSVES (SEQ ID NO:84)
VH-CDR3	VSYLSTASSLDY (SEQ ID NO:85)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKL
	LIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:86)
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKG LEWVSAITWNSGHIDYADSVESGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:87)

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF (es decir, TNF alfa) y puede unirse adicionalmente a una diana seleccionada entre: Te38, IL12, IL12p40, IL13, IL15, IL17, IL18, IL1beta, IL23, MIF, PGE2, PGE4, VEGF, TNFSF11 (RANKL), TNFSF13B (BLYS), GP130, CD22 y CTLA-4. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF alfa, IL6 y TNFSF13B (BLYS). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF alfa y TNFSF12 (TWEAK). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF y TNFSF15 (TL1A). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF y puede unirse adicionalmente a una diana seleccionada entre NGF, SOST (sclerostina), LPA, IL17A,

DKK, alfa Vbeta3, IL23p19, IL2, IL2RA (CD25), IL6, IL6R, IL12p40, IL6, IL10, IL21, IL22, CD20 y se une a TNF. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a TNF alfa y a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF alfa. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser adalimumab, infliximab, certolizumab, golimumab, CNTO 148, AME-527 o ATN-103.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser IL6. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser siltuximab (CNTO328, Centocor), CNTO-136 (Centocor), CDP-6038 (UCB) o AMGN-220 (Amgen). El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir con siltuximab (CNTO328, Centocor), CNTO-136 (Centocor), CDP-6038 (UCB) o AMGN-220 (Amgen) por la unión a IL6. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL6. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL6 y a una diana seleccionada entre: IL1, IL1beta, IL1Ra, IL5, CD8, TNFRSF5 (CD40), PDL1, IL6R, IL17A, TNF, VEGF, TNFSF11 (RANKL) y PGE2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a IL6 y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL6. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser siltuximab, CNTO136, CDP-6038 o AMGN-220.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser IL6R. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser REGN-88 (Regeneron) o tocilizumab (ACTEMRA™/ROACTEMRA™, Chugai/Roche). El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir con siltuximab, REGN-88 (Regeneron) o tocilizumab (ACTEMRA™/ROACTEMRA™, Chugai/Roche) por la unión a IL6R. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1 o ambos de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL6R. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL6R y a una diana seleccionada entre: CD8, TNFRSF5 (CD40), PDL1, IL6, IL17A, TNF, VEGF, TNFSF11 (RANKL) y PGE2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a IL6R y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL6R. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser REGN-88 o tocilizumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFSF15 (TL1A). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TL1A y a una diana seleccionada entre: TNF, IFN alfa, IFN gamma, IL1, IL1beta, IL6, IL8, IL12, IL15, IL17, IL18, IL23 y IL32. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a TL1A y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la divulgación. Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos que incluyen la enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TL1a.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a interferón alfa. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a interferón alfa y a TNFSF13B (BLYS). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a interferón alfa, TNFSF13B (BLYS) y a una trampa extracelular de neutrófilos (NET). Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos que incluyen enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a interferón alfa.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la divulgación también tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades o trastornos neurológicos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, dolor y lesión o traumatismo neural. La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser: amiloide beta (Abeta), *beta amiloide*, factor D del complemento, PLP, ROBO4, ROBO, GDNF, NGF, LINGO o miostatina. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser gantenerumab (por ejemplo, R1450, Hoffman La-Roche), bapineuzumab *beta amiloide* 9 (Eli Lilly), solanezumab *beta amiloide* 9 (Eli Lilly), tanezumab NGF (por ejemplo, RN624, Pfizer), B1B033 LINGO (Biogen Idec), PF-3.446.879 *miostatina* (Pfizer) o stamulumab *miostatina* (Wyeth). El anticuerpo puede unirse específicamente al mismo epítipo que gantenerumab, bapineuzumab, solanezumab, tanezumab, B1B033 o stamulumab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión a la diana de gantenerumab, bapineuzumab, solanezumab, tanezumab, B1B033 o stamulumab. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser beta amiloide. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD es RN1219 (PF-4.360.365; Pfizer). El anticuerpo puede unirse específicamente al mismo epítipo que RN1219. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de beta amiloide a RN1219. Un MRD que compite por la unión de beta amiloide a RN1219 también está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de beta amiloide a RN1219 también están abarcadas por la invención.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser NGF. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser tanezumab (por ejemplo, RN624, Pfizer). El anticuerpo puede unirse específicamente al mismo epítipo que tanezumab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de NGF a tanezumab. Un MRD que compite por la unión de NGF a tanezumab también está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de NGF a tanezumab también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a NGF y a una diana seleccionada entre: MTX, NKG2D, RON, IL6R, ErbB3, TNFRSF21 (DR6), CD3, IGFR, DLL4, P1GF, CD20, EGFR, HER2, CD19, CD22, TNFRSF5 (CD40), CD80, cMET, NRP1, TNF, LINGO, HGF, IGF1, IGF1.2, IGF2, NGF, Te38, NogoA, RGM A, MAG, OMGP, NgR, TNFSF12 (TWEAK), PGE2, IL1 beta, semaforina 3A y semaforina 4. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a NGF y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a NGF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser tanezumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de NGF a tanezumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser MEDI-578. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de NGF a MEDI-578.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser LINGO (por ejemplo, LINGO1). El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser BIIB033 (Biogen Idec). El anticuerpo puede unirse específicamente al mismo epítipo que BIIB033. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de LINGO a BIIB033. Un MRD que compite por la unión de LINGO a BIIB033 también está abarcado por la invención. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión de LINGO a BIIB033 también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a LINGO y a una diana seleccionada entre: MTX, NKG2D, RON, IL6R, ErbB3, TNFRSF21 (DR6), CD3, IGFR, DLL4, P1GF, CD20, EGFR, HER2, CD19, CD22, TNFRSF5 (CD40), CD80, cMET, NRP1, TNF, TNFSF12 (TWEAK), HGF, IGF1, IGF1.2, IGF2, NGF, Te38, NogoA, RGM A, MAG, OMGP, NgR, NGF, PGE2, IL1 beta, semaforina 3A y semaforina 4. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a LINGO y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a LINGO. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser BIIB033.

La diana de un anticuerpo de un anticuerpo que contiene MRD puede ser TNFSF12 (TWEAK). El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFSF12 (TWEAK) y a una diana seleccionada entre: MTX, NKG2D, RON, IL6R, ErbB3, TNFRSF21 (DR6), CD3, IGFR, DLL4, P1GF, CD20, EGFR, HER2, CD19, CD22, TNFRSF5 (CD40), CD80, cMET, NRP1, TNF, LINGO, HGF, IGF1, IGF1.2, IGF2, NGF, Te38, NogoA, RGM A, MAG, OMGP, NgR, NGF, PGE2, IL1 beta, semaforina 3A y semaforina 4. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a TNFSF12 (TWEAK) y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFSF12 (TWEAK). El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD es BIIB023.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser: LDL oxidada, gpIIb, gpIIIa, PCSK9, Factor VIII, oxigrina a2bB3, AOC3 o mesotelina. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser BI-204 *LDL oxidada* (BioInvent), abciximab *gpIIb*, *gpIIIa* (por ejemplo, REOPRO, Eli Lilly), AMG-145 *PCSK9* (Amgen), TB-402 *Factor VIII* (BioInvent), vapaliximab o tadocizumab *integrina a2bB3* (Yamamoto Pharma). El anticuerpo puede unirse específicamente al mismo epítipo que BI-204, abciximab, AMG-145, TB-402 o tadocizumab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de BI-204, abciximab, AMG-145, TB-402, vapaliximab o tadocizumab. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede estar asociado con el crecimiento óseo y/o el metabolismo. La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser TNFSF11 (RANKL). La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser: DKK1, osteopontina, cathepsina K, TNFRSF19L (RELT), TNFRSF19 (TROY) o esclerostina (CDP-7851 UCB Celltech). La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser TNFSF11 (RANKL). El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser denosumab (por ejemplo, AMG-162, Amgen). El anticuerpo puede unirse específicamente al mismo epítipo que denosumab. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de TNFSF11 (RANKL) a denosumab. El anticuerpo puede ser AMG617 o AMG785 (por ejemplo, CDP7851, Amgen). El anticuerpo puede unirse de manera específica al mismo epítipo que AMG617 o AMG785. El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de esclerostina a AMG617 o AMG785. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFSF11 (RANKL). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFSF11 y a una diana seleccionada entre: esclerostina (SOST), endotelina-1, DKK1, IL1, IL6, IL7, IL8, IL11, IL17A, MCSF, IGF1, IGF2, IGF1,2 IGF1R, TNF, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8a, FGF8b, FGF18, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TGF beta, TGF beta R2, BMP2, BMP4, BMP5, BMP9, BMP10, BMPR-IA, PDGF, PDGFRa, PDGFRb PTH, proteína relacionada con PTH (PTHrP) y PGE2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a TNFSF11 y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFSF11. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser denosumab, AMG617 o AMG785.

La diana de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un antígeno bacteriano, un antígeno vírico, un antígeno de micoplasma, un antígeno de prion o un antígeno de parásito (por ejemplo, uno que infecte a mamíferos).

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un antígeno vírico. La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser ántrax, hepatitis B, rabia, virus Nipah, virus del Nilo Occidental, un virus de la meningitis o CMV. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir con la unión al antígeno de ABTHRAX® (Human Genome Sciences), exbivirumab, foravirumab, libivirumab, rafivirumab, regavirumab, sevirumab (por ejemplo, MSL-109, Protovir), tuvirumab, raxibacumab, virus Nipah M102.4 o MGAWN1® (MacroGenics) por la unión a la diana. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser RSV. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser motavizumab (por ejemplo, NUMAX®, MEDI-577; MedImmune) o palivizumab *proteína f de fusión de RSV* (por ejemplo, SYNAGIS®, MedImmune). El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir con motavizumab o palivizumab *proteína f de fusión de RSV*, por la unión a la diana. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser felvizumab. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir con felvizumab por la unión a la diana. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

La diana del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un antígeno bacteriano o fúngico. El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión al antígeno con nebucumab, edobacomab (por ejemplo, E5), tefibazumab (Inhibitex), panobacumab (por ejemplo, KBPA101, Kenta), pagibaximab (por ejemplo, BSYX-A110, Biosynexus), urtoxazumab o efungumab (por ejemplo, MYCOGRAB®, Novartis). El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser nebucumab, edobacomab, tefibazumab (Inhibitex), panobacumab, pagibaximab, urtoxazumab o efungumab. También está abarcado por la invención un MRD que compite por la unión a la diana con uno de los anticuerpos anteriores. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más MRD que compiten por la unión a la diana con 1, 2 o más de los anticuerpos anteriores también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede ser el anticuerpo catalítico 38C2. El anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que 38C2. El anticuerpo puede inhibir de manera competitiva a 38C2.

Otros anticuerpos de interés incluyen anticuerpos de unión a A33. El antígeno A33 humano es una glucoproteína transmembranaria de la superfamilia de Ig. La función del antígeno A33 humano en tejido de colon normal y maligno aún no es conocida. Sin embargo, varias propiedades del antígeno A33 sugieren que es una diana prometedora para inmunoterapia de cáncer de colon. Estas propiedades incluyen (i) el patrón de expresión altamente restringido del antígeno A33, (ii) la expresión de grandes cantidades del antígeno A33 en células de cáncer de colon, (iii) la ausencia de antígeno A33 desprendido o secretado, (iv) el hecho de que tras la unión del anticuerpo A33 al antígeno A33, el anticuerpo A33 se internaliza y se secuestra en vesículas y (v) la dirección del anticuerpo A33 a cáncer de colon que expresa el antígeno A33 en estudios clínicos preliminares. La fusión de un MRD dirigido a A33 a un anticuerpo catalítico o no catalítico aumentaría la eficacia terapéutica de anticuerpos dirigidos a A33.

El anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una proteína diana humana. El MRD puede unirse tanto a una proteína humana como a su ortólogo de ratón, rata, conejo o hámster.

Los anticuerpos en las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) son capaces de unirse a sus dianas respectivas cuando los MRD están unidos al anticuerpo. El anticuerpo puede unirse a su diana de manera independiente. El anticuerpo puede ser un agonista de la diana. El anticuerpo puede ser un antagonista de la diana. El anticuerpo puede usarse para localizar un anticuerpo que contiene MRD en un área donde está ubicada la diana del anticuerpo.

Se contempla que los anticuerpos usados en la presente invención puedan prepararse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden "producirse de manera recombinante" moléculas de anticuerpo y composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD), es decir, producirse usando tecnología de ADN recombinante.

Los anticuerpos monoclonales que pueden usarse como el componente de anticuerpo de las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature 256:495 (1975). Usando el método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador adecuado, se inmuniza como se ha descrito anteriormente para provocar la producción por parte de los linfocitos de anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno de inmunización. También pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Después de la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que después pueden extraerse por selección de los linfocitos no fusionados y las células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno seleccionado, según se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia o mediante un ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA); ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA)) pueden propagarse posteriormente ya sea *in vitro*, por ejemplo, usando métodos conocidos (véase, por ejemplo Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o *in vivo*, por ejemplo, en forma de tumores de ascitis en un animal. Después, pueden purificarse los anticuerpos monoclonales del medio de cultivo o del fluido de ascitis como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos policlonales.

Como alternativa, también pueden producirse anticuerpos monoclonales usando métodos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567. Por ejemplo, en un enfoque, se aíslan polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal de linfocitos B maduros o células de hibridoma, tal como mediante RT-PCR, usando cebadores oligonucleotídicos que amplifican de manera específica los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y su secuencia se determina usando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan posteriormente en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfectan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, se generan los anticuerpos monoclonales por las células hospedadoras. En otras estrategias, pueden aislarse anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo que tienen la inmunorreactividad deseada mediante bibliotecas de expresión en fagos que expresan CDR de las especies deseadas, usando técnicas conocidas en la materia (McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)).

Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal pueden modificarse adicionalmente de varias maneras distintas, usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótido que codifican uno o más MRD y opcionalmente enlazadores, pueden fusionarse operablemente, por ejemplo, al extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica las secuencias del anticuerpo monoclonal. Los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón pueden sustituirse (1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o (2) por un polipéptido no de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. Las técnicas de mutagénesis de sitio dirigido y de alta densidad de la región variable se conocen en la materia y pueden usarse para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo humano. Por ejemplo, pueden prepararse directamente anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la materia. Pueden generarse linfocitos B

humanos inmortalizados *in vitro* o aislarse de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boemer et al., *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); y las patentes de los Estados Unidos n.º 5.750.373 y 6.787.637). El anticuerpo humano puede proceder de la "estrategia de minilocus" en la que se imita un locus de Ig exógeno mediante la inclusión de genes individuales a partir del locus de Ig (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.545.807). Los métodos para preparar un anticuerpo humano a partir de una fagoteca y opcionalmente optimizar la afinidad de unión se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Vaughan et al., *Nat. Biotech.* 14:309-314 (1996); Sheets et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom et al., *Nat. Biotechnology* 23:1105-1116 (2005); Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); Persic et al., *Gene* 187:9-18 (1997); Jostock et al., *J. Immunol. Methods* 289:65-80 (2004); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)); *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991); *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Yang et al., *J. Mol. Biol.* 254:392-403 (1995); y Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4457-4461 (1992). Las técnicas para la generación y el uso de fagotecas también se describen en: las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.545.807, 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793, 6.521.404, 6.544.731, 6.555.313, 6.582.915, 6.593.081, 6.300.064, 6.653.068, 6.706.484 y 7.264.963; y Rothe et al., *J. Mol. Bio.* 130:448-54 (2007). Las estrategias de maduración por afinidad y de reordenamiento de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) se conocen en la materia y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

También pueden producirse anticuerpos en ratones que son transgénicos para los genes de inmunoglobulina humanos o fragmentos de estos genes y que son capaces, tras la inmunización, de producir un amplio repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Esta estrategia se describe en: Lonberg, *Nat. Biotechnol* 23:1117-1125 (2005), Green et al., *Nature Genet.* 7:13-21 (1994) y Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 6.596.541, 7.105.348 y 7.368.334.

IV. Enlazadores

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) de la invención pueden contener un solo enlazador, múltiples enlazadores o ningún enlazador. Por lo tanto, puede unirse operablemente (ligarse) un MRD al anticuerpo de manera directa o unirse de manera operable a través de un péptido enlazador opcional. De manera similar, puede unirse operablemente un MRD a uno o más MRD de manera directa o unirse operablemente a uno o más MRD a través de uno o más péptidos enlazadores opcionales. Los enlazadores pueden ser de cualquier tamaño o composición, en tanto que sean capaces de unirse a un MRD y a un anticuerpo, de tal forma que el MRD permite que el anticuerpo que contiene MRD se una a la diana de MRD.

Los enlazadores pueden tener de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, de aproximadamente 1 a 15 aminoácidos, de aproximadamente 1 a 10 aminoácidos, de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 15 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 10 aminoácidos o de aproximadamente 2 a 5 aminoácidos. El enlazador también puede tener de aproximadamente 4 a 15 aminoácidos. El péptido enlazador puede contener un péptido enlazador corto con la secuencia GGGG (SEQ ID NO: 1), un péptido enlazador mediano con la secuencia SSGGGGSGGGGGGSS (SEQ ID NO: 2) o un péptido enlazador largo con la secuencia SSGGGG SGGGGGGSSRSS (SEQ ID NO: 19). El MRD puede insertarse en el cuarto bucle en la región constante de cadena ligera. Por ejemplo, el MRD puede insertarse entre las letras subrayadas en la siguiente secuencia de aminoácidos:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDKLGTNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVY ACEVTHQGLSLPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 102).

El enlazador también puede ser un enlazador no peptídico, tal como un enlazador de alquilo o un enlazador de PEG. Por ejemplo, pueden usarse enlazadores de alquilo, tales como --NH--(CH₂)_s-C(O)--, en donde s=2-20. Estos enlazadores de alquilo pueden estar sustituidos además por un grupo que no aporta impedancia estérica, tal como alquilo inferior (por ejemplo, C₁-C₆), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH₂, fenilo, etc. Un enlazador no peptídico ilustrativo es un enlazador de PEG. El enlazador de PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 100 a 5000 kDa o de aproximadamente 100 a 500 kDa.

El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un MRD o agente citotóxico dentro de la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil a ácidos (por ejemplo, hidrazona), un enlazador sensible a proteasas (por ejemplo, sensible a peptidasa), un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos n.º 5.208.020; Publicación de Solicitud de los Estados Unidos n.º 20090110753), en donde es deseable que la unión covalente entre un MRD o un agente citotóxico y la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) se escinda intracelularmente cuando la composición se internaliza dentro de la célula. Las expresiones "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso metabólico o una reacción dentro de una célula en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) mediante la cual, la unión covalente, es decir, la unión a través de un enlazador entre el MRD y el agente citotóxico, el MRD y el anticuerpo, el anticuerpo y el agente citotóxico o entre dos MRD se rompe, dando como resultado la disociación entre el MRD y/o el agente

citotóxico del anticuerpo en el interior de la célula. Por lo tanto, los restos escindidos del zybody-ADC son, por tanto, metabolitos intracelulares.

La optimización del enlazador puede evaluarse usando las técnicas descritas en los ejemplos 1-18 y técnicas por lo demás conocidas en la técnica. Preferentemente, los enlazadores no deben alterar la capacidad de un MRD y/o un anticuerpo para unirse a moléculas diana.

V. Anticuerpos que contienen MRD

Usando los métodos descritos en el presente documento, puede lograrse multiespecificidad y una mayor multivalencia mediante la fusión de los MRD a los anticuerpos.

Los MRD de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) preparadas de acuerdo con la presente invención, pueden unirse operablemente a un anticuerpo a través del extremo N o el extremo C del péptido. El MRD puede unirse operablemente al anticuerpo en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo o el extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo. La optimización de la composición de MRD, la ubicación de la unión de MRD-anticuerpo y la composición del enlazador pueden llevarse a cabo usando los ensayos de unión descritos en los ejemplos 1-18 y bioensayos y otros ensayos conocidos en la técnica para la actividad biológica relacionada con la diana adecuada.

Un anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo que contiene MRD descrito en la Solicitud de los Estados Unidos n.º 61/489.249, presentada el 24 de mayo de 2011.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden contener un MRD unido operablemente a la cadena pesada del anticuerpo, la cadena ligera del anticuerpo o a la cadena tanto pesada como ligera. Un anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD unido a uno de los extremos de la cadena de anticuerpo. Un anticuerpo que contiene MRD de la invención puede contener al menos un MRD unido operablemente a dos de los extremos de la cadena de anticuerpo. Un anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD unido operablemente a tres de los extremos de la cadena de anticuerpo. Un anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD unido operablemente a cada uno de los cuatro extremos de la cadena de anticuerpo (es decir, los extremos N y C terminales de la cadena ligera y los extremos N y C terminales de la cadena pesada).

El anticuerpo que contiene MRD puede tener al menos un MRD unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera. El anticuerpo que contiene MRD puede tener al menos un MRD unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada. El anticuerpo que contiene MRD puede tener al menos un MRD unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera. El anticuerpo que contiene MRD puede tener al menos un MRD unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada.

Un anticuerpo que contiene MRD puede ser "multiespecífico" (por ejemplo, biespecífico, triespecífico, tetraespecífico, pentaespecífico o de una mayor multiespecificidad), lo que significa que reconoce y se une a dos o más epítopos diferentes presentes en uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, proteínas). Por lo tanto, en los casos donde un anticuerpo que contiene MRD sea "monoespecífico" o "multiespecífico", (por ejemplo, biespecífico, triespecífico o tetraespecífico) se refiere al número de epítopos diferentes a los que se une el anticuerpo que contiene MRD. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana (por ejemplo, como se describe en el presente documento) o pueden ser específicos para un polipéptido diana, así como para un epítipo heterólogo, tal como una diana de polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. La presente invención contempla la preparación de anticuerpos mono, bi, tri, tetra y pentaespecíficos, así como de anticuerpos con una mayor multiespecificidad. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a dos epítopos diferentes. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a dos epítopos diferentes simultáneamente. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a tres epítopos diferentes. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a tres epítopos diferentes simultáneamente. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a cuatro epítopos diferentes. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a cuatro epítopos diferentes simultáneamente. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a cinco epítopos diferentes (véase, por ejemplo, la FIG. 2D). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a cinco epítopos diferentes simultáneamente.

Dos MRD del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo antígeno. Tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez MDR del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo antígeno. Al menos dos MRD del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo antígeno. Al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez MDR del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo antígeno. Dos MRD del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo epítipo. Tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez MDR del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo epítipo. Al menos dos MRD del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo epítipo. Al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez MDR del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo epítipo.

El anticuerpo y un MRD del anticuerpo que contiene MRD pueden unirse al mismo antígeno. El anticuerpo y dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez MDR del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo antígeno. El anticuerpo y al menos un MRD del anticuerpo que contiene MRD pueden unirse al mismo antígeno. El anticuerpo y al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez MDR del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo antígeno. El anticuerpo y un MRD del anticuerpo que contiene MRD pueden unirse al mismo epítipo. El anticuerpo y dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez MDR del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo epítipo. El anticuerpo y al menos un MRD del anticuerpo que contiene MRD pueden unirse al mismo epítipo. El anticuerpo y al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez MDR del anticuerpo que contiene MRD puede unirse al mismo epítipo.

La presente invención también proporciona dos o más MRD que se unen a cualquier extremo terminal del anticuerpo. Dos, tres, cuatro o más MRD pueden estar unidos operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada. Dos, tres, cuatro o más MRD pueden estar unidos operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera. Dos, tres, cuatro o más MRD pueden estar unidos operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada. Dos, tres, cuatro o más MRD pueden estar unidos operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera. Se prevé que estos MRD pueden ser iguales o diferentes. Además, puede usarse cualquier combinación de número y enlaces del MRD. Por ejemplo, pueden unirse operablemente dos MRD al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que contiene un MRD unido al extremo C-terminal de la cadena ligera. De manera similar, pueden unirse operablemente tres MRD al extremo C-terminal de la cadena ligera y pueden unirse operablemente dos MRD al extremo N-terminal de la cadena ligera.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden contener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez MRD.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener un MRD (véase, por ejemplo, las FIG. 2B y 2C). La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener dos MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener tres MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener cuatro MRD (véase, por ejemplo, las FIG. 2B y 2C). La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener cinco MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener seis MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener entre dos y diez MRD.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos un MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos dos MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos tres MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos cuatro MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos cinco MRD. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos seis MRD.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener dos MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener tres MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener cuatro MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener cinco MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener seis MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener entre dos y diez MRD diferentes.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos dos MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos tres MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos cuatro MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos cinco MRD diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener al menos seis MRD diferentes.

Por lo tanto, las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser monoméricas para MRD (es decir, contienen un MRD en el extremo de una cadena de péptido conectado opcionalmente a través de un enlazador) multiméricas para MRD (es decir, contienen más de un MRD en tándem, conectado opcionalmente mediante un enlazador). Las composiciones multiméricas multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser homomultiméricas (es decir, contienen más del mismo MRD en tándem, conectado opcionalmente mediante enlazadores (por ejemplo, homodímeros,

homotrimeros, homotetrámeros)) o heteromultiméricas (es decir, contienen dos o más MRD en los que hay al menos dos MRD conectados opcionalmente mediante enlazadores, donde todos o algunos de los MRD unidos a un extremo particular son diferentes (por ejemplo, heterodímero, heterotrímero, heterotetrámero, etc.)). La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener dos MRD monoméricos diferentes ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener tres MRD monoméricos diferentes ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener cuatro MRD monoméricos diferentes ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener cinco MRD monoméricos diferentes ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener seis MRD monoméricos diferentes ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) al menos un MRD dímérico y al menos uno monomérico ubicado en diferentes extremos de la inmunoglobulina. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) al menos un MRD homodimérico y al menos uno monomérico ubicado en diferentes extremos de la inmunoglobulina. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) al menos un MRD heterodimérico y al menos uno monomérico ubicado en diferentes extremos de la inmunoglobulina.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) al menos un MRD multimérico y al menos uno monomérico ubicado en diferentes extremos de la inmunoglobulina. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) al menos un MRD homomultimérico y al menos uno monomérico ubicado en diferentes extremos de la inmunoglobulina. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) al menos un MRD heteromultimérico y al menos uno monomérico ubicado en diferentes extremos de la inmunoglobulina.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede contener MRD unidos operablemente a al menos dos extremos de la inmunoglobulina diferentes. Los MRD fusionados a al menos una de las inmunoglobulinas pueden ser un multímero. Los MRD fusionados a al menos una de las inmunoglobulinas pueden ser homomultiméricos (es decir, más de un MRD igual unidos operablemente en tándem, opcionalmente a través de un enlazador). Los MRD fusionados a al menos una de las inmunoglobulinas pueden ser heteromultiméricos (es decir, dos o más MRD diferentes unidos operablemente en tándem, opcionalmente a través de un enlazador). Los MRD fusionados a al menos una de las inmunoglobulinas pueden ser un dímero. Los MRD fusionados a al menos una de las inmunoglobulinas pueden ser un homodímero. Los MRD fusionados a al menos una de las inmunoglobulinas pueden ser un heterodímero.

Los múltiples MRD pueden dirigirse al mismo sitio de unión a diana o a dos o más sitios de unión a diana diferentes. En los casos donde los MRD se unen a sitios de unión a diana diferentes, los sitios de unión pueden encontrarse en la misma molécula diana o en moléculas diana diferentes.

De manera similar, el anticuerpo y el MRD en una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) pueden unirse a la misma molécula diana o a dos moléculas diana diferentes.

Al menos un MRD y el anticuerpo en la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) pueden unirse a sus dianas de manera simultánea. Cada MRD en la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) y el anticuerpo pueden unirse a su diana de manera simultánea. Por lo tanto, la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más dianas de manera simultánea.

Puede evaluarse la capacidad de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) para unirse a múltiples dianas de manera simultánea usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, aquellos métodos descritos en los ejemplos más adelante.

Composiciones multivalentes y multiespecíficas que tienen especificidad monovalente

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) de la invención pueden tener un solo sitio de unión para (es decir, se unen de manera monovalente a) una diana.

Los dominios de unión a antígeno de un componente de anticuerpo de una composición multiespecífica multivalente y monovalente de la invención pueden unirse a dos epítopos diana diferentes (es decir, el anticuerpo es biespecífico). La expresión "anticuerpo biespecífico" pretende incluir cualquier anticuerpo, que tiene dos especificidades de unión diferentes, es decir, el anticuerpo se une a dos epítopos diferentes, que pueden estar

ubicados en el mismo antígeno o, más habitualmente, en diferentes antígenos diana. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. (Véase, por ejemplo, Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983); Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994); Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60-69 (1991); las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.474.893, 4.676.980, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920, 5.601.819, 5.731.168, 5.807.706 y 5.821.333; las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO94/04690, WO91/00360, WO92/05793, WO92/08802, WO92/200373, WO93/17715, WO00/44788 y WO02/096948; los documentos EP 1870459A1 y EP 03089).

Un método para generar anticuerpos biespecíficos se ha denominado la estrategia de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional WO2006/028936). En esta tecnología, se reduce el mal emparejamiento de las cadenas pesadas de Ig mutando aminoácidos seleccionados que forman la interfaz de los dominios CH3 en IgG. En las posiciones dentro del dominio CH3 en las que interactúan directamente dos cadenas pesadas, se introduce un aminoácido con una cadena lateral pequeña (ojal) en la secuencia de una cadena pesada y un aminoácido con una cadena lateral larga (botón) en la ubicación del resto que interacciona homólogo en la otra cadena pesada. Las composiciones de la invención pueden tener cadenas de inmunoglobulina en las que se han modificado los dominios CH3 mutando aminoácidos seleccionados que interactúan en la interfaz entre dos polipéptidos a fin de formar preferencialmente un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos pueden estar formados por cadenas de inmunoglobulina de la misma subclase (por ejemplo, IgG1 o IgG3) o diferentes subclases (por ejemplo, IgG1 e IgG3 o IgG3 e IgG4).

Un componente de anticuerpo biespecífico de una composición multiespecífica y multivalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede comprender una mutación T366W en la cadena de "botón" y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en la cadena de "ojal" y opcionalmente, un puente disulfuro intercadena adicional entre los dominios CH3, por ejemplo, introduciendo una mutación Y349C en la cadena de "botón" y una mutación E356C o una mutación S354C en la cadena de "ojal"; las mutaciones R409D, K370E en la cadena de "botón" y las mutaciones D399K, E357K en la cadena de "ojal"; las mutaciones R409D, K370E en la cadena de "botón" y las mutaciones D399K, E357K en la cadena de "ojal"; una mutación T366W en la cadena de "botón" y las mutaciones T366S, L368A, Y407V en la cadena de "ojal"; las mutaciones R409D, K370E en la cadena de "botón" y las mutaciones D399K, E357K en la cadena de "ojal"; las mutaciones Y349C, T366W en una de las cadenas y las mutaciones E356C, T366S, L368A, Y407V en la cadena contraria; las mutaciones Y349C, T366W en una cadena y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en la cadena contraria; las mutaciones Y349C, T366W en una cadena y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en la cadena contraria; y las mutaciones Y349C, T366W en una cadena y las mutaciones S354C, T366S, L368A, Y407V en la cadena contraria (numeración de acuerdo con el índice de EU de Kabat).

Un componente de anticuerpo biespecífico de una composición de la invención (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser un anticuerpo IgG4 o un anticuerpo IgG4 modificado o contiene una cadena pesada de IgG4 o una cadena pesada de IgG4 modificada. Los anticuerpos IgG4 son moléculas diana que sufren intercambio del brazo de Fab intercambiando una cadena pesada de IgG4 y la cadena ligera unida por un par de cadena pesada-ligera de otra molécula de IgG4, dando como resultado anticuerpos biespecíficos. Por consiguiente, el intercambio del brazo de Fab mediante el intercambio de anticuerpos IgG4 que contienen MRD, ya esté provocado *in vivo* o *in vitro* en condiciones fisiológicas, dará lugar a composiciones de anticuerpo biespecíficas. Una cadena pesada de IgG4 de una composición de la invención puede contener una sustitución S228P. Se ha demostrado que esta sustitución inhibe de manera significativa el intercambio de brazos de Fab en los anticuerpos IgG4 mutantes resultantes y por lo tanto, reduce la probabilidad del intercambio de brazo de Fab entre anticuerpos recombinantes e IgG4 endógena. (Véase, por ejemplo, Labrijn et al., *Nat. Biotechnol.* 27(8):767-71 (2009)). Una cadena pesada de IgG4 de una composición de la invención puede contener una sustitución de la Arg en la posición 409 (por ejemplo, con Lys, Ala, Thr, Met o Leu), la Phe en la posición 405 (por ejemplo, con Lys, Ala, Thr, Met o Leu) o la Lys en la posición 370. Puede reemplazarse la región CH3 de una cadena pesada de IgG4 de una composición de la divulgación con la región CHH3 de IgG1, IgG2 o IgG3. Las interacciones entre uno o más MRD ubicados en los extremos C-terminales de diferentes cadenas pesadas (por ejemplo, IgG4 o IgG4 e IgG3) pueden favorecer y/o estabilizar heterodímeros entre las cadenas pesadas o de otro modo reduce el intercambio de brazos de Fab por el heterodímero.

Los componentes de anticuerpo biespecíficos ejemplares de las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención incluyen heterodímeros de cadena de IgG4 e IgG1, IgG4 e IgG2, IgG4 e IgG2, IgG4 e IgG3, IgG1 e IgG3. Dichos anticuerpos heterodiméricos de cadena pesada, pueden modificarse de manera rutinaria, por ejemplo, modificando aminoácidos seleccionados que forman la interfaz de los dominios CH3 en IgG4 humana y los de IgG1 o IgG3, a fin de favorecer la formación de cadena pesada heterodimérica. Las interacciones entre uno o más MRD ubicados en los extremos C-terminales de las cadenas pesadas heterodiméricas pueden favorecer o estabilizar la formación o la estructura heteromultimérica, respectivamente.

Se sabe que los anticuerpos IgG4 tienen actividad ADCC y semivida reducida en comparación con otras subclases de inmunoglobulina, tales como, IgG1 e IgG3. Por consiguiente, los formatos basados en subclases de IgG4 proporcionan un formato atractivo para desarrollar agentes terapéuticos que se unen a y bloquean los receptores

celulares, pero no eliminan las células diana. Como alternativa, cuando se desea una actividad efectora aumentada, puede modificarse una cadena pesada de IgG4 de una composición de la invención como se describe en el presente documento o como se conoce de otro modo en la técnica, a fin de aumentar la función efectora (por ejemplo, modificación de los restos en las posiciones 327, 330 y 331; numeración de acuerdo con el índice de EU de Kabat).

De manera similar, en los casos donde se desea una semivida aumentada, puede modificarse una cadena pesada de IgG4 de una composición de la invención como se describe en el presente documento o como se conoce de otro modo en la técnica para unirse de manera más selectiva al FcRn a pH 6,0, pero no a pH 7,4, mediante por ejemplo, la incorporación de mutaciones ubicadas en la interfaz entre los dominios CH2 y CH3, tal como sustituciones en T250Q/M428L así como M252Y/S254T/T256E y H433K/N434F (numeración de acuerdo con el índice de EU de Kabat).

Como se ha ilustrado anteriormente, se prevé que las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) de la invención pueden tener un solo sitio de unión para (es decir, se unen de manera monovalente a) una diana. El sitio de unión individual (es decir, sitio de unión monovalente) puede ser un dominio de unión a antígeno de anticuerpo. El único sitio de unión puede ser un MRD. Por lo tanto, las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención abarcan (y pueden modificarse de manera rutinaria para que incluyan) anticuerpos que contienen MRD que contienen 1, 2, 3, 4 o más sitios de unión para una diana. Los sitios de unión individuales pueden proporcionarse mediante uno o más MRD ubicados en uno o más de los 4 extremos de cadena pesada de inmunoglobulina o los 4 extremos de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, el sitio de unión a antígeno individual puede proporcionarse mediante uno de los dominios de unión del anticuerpo (en donde un MRD del anticuerpo que contiene MRD se une al mismo epítipo del otro dominio de unión a antígeno del anticuerpo). Además, las composiciones de la invención pueden abarcar (y pueden modificarse de manera rutinaria para que incluyan) anticuerpos que contienen MRD que contienen 1, 2, 3, 4 o más sitios de unión individuales para una diana y no se unen de manera bivalente a otra diana.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede tener un solo sitio de unión para (es decir, se une de manera monovalente) a un antígeno de la superficie celular que forma multímeros (por ejemplo, homómeros o heterómeros). El sitio de unión individual puede unirse a un antígeno de la superficie celular que requiera de multimerización para la señalización. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede tener un solo sitio de unión que se une a una diana de la superficie celular e inhibe la unión de otra molécula (tal como un ligando) a la diana de la superficie celular. La unión del sitio de unión individual puede inhibir la multimerización de la diana (por ejemplo, la multimerización homomérica y heteromérica). La composición puede tener sitios de unión individuales para dianas diferentes (es decir, se une de manera monovalente a más de una diana diferente). Los múltiples sitios de unión individuales de la composición pueden unirse a dianas en la misma célula. Los múltiples sitios de unión individuales de la composición pueden unirse a dianas en diferentes células. Se conocen en la técnica numerosos receptores que requieren de multimerización para efectuar su función normal. Se prevé que dichos receptores sean dianas de los sitios de unión individuales en las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) de la invención. La composición puede tener un solo sitio de unión para una tirosina cinasa receptora. La composición puede tener un solo sitio de unión para un receptor de factor de crecimiento. La composición puede tener un solo sitio de unión para un receptor acoplado a proteína G. La composición puede tener un solo sitio de unión para un receptor de quimiocinas. La composición puede tener un solo sitio de unión para un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. La composición puede tener un solo sitio de unión para un receptor seleccionado entre: RAGE, c-Met, ErbB2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIla, FGFR2-IIlb y FGFR2-IIlc), FGFR3, PDGFRA, PDGFRB, netrina, CD28, TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF21 o TNFRSF25, TNFRSF7 (CD27), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFRSF8 (CD30), TNFSF11 (RANKL), TNFRSF11A (RANK), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF25 (DR3) y LRP6.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede tener un solo sitio de unión para (es decir, se une de manera monovalente a) una diana de la superficie celular que forma un multímero y múltiples sitios (es decir, se une de manera monovalente) para dos o más dianas diferentes. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para una diana de la superficie celular y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes. Al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar ubicadas en una superficie celular. Al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden ser dianas solubles (por ejemplo, quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento). La composición puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas descritas en el presente documento. Las dianas a las que se une la composición pueden ser antígenos tumorales (incluyendo antígenos tumorales y antígenos asociados a tumores). Una diana a la que se une la composición puede estar asociada con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. Una diana a la que se une la composición puede estar asociada con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa).

Un anticuerpo que contiene MRD puede tener un solo sitio de unión para TNFRSF21 (DR6). El anticuerpo que contiene MRD puede tener un solo sitio de unión para DR6 y puede unirse a una diana seleccionada entre: AGE

(S100 A, anfoterina), IL1, IL6, IL18, IL12, IL23, TNFSF12 (TWEAK), TNF alfa, VEGF, TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), interferón gamma, GMCSF, un FGF, CXCL13, MCP 1, CCR2, NogoA, RGM A, OMgp MAG, un CPSG, LINGO, alfa-sinucleína, una semaforina (por ejemplo, semaforina 3A, semaforina 4), una efrina, VLA4, CD45, RB, C5, CD52 y CD200. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a DR6 y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos que incluyen enfermedades y trastornos neurológicos, tales como esclerosis múltiple y otras enfermedades neurodegenerativas. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a DR6.

Un anticuerpo que contiene MRD puede tener un solo sitio de unión para TNFRSF25 (DR3). El anticuerpo que contiene MRD puede tener un solo sitio de unión para DR3 y puede unirse a una diana seleccionada entre: TNF, IFN alfa, IFN gamma, IL1, IL1 beta, IL6, IL8, IL12, IL15, IL17, IL18, IL23 y IL32. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a DR3 y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos que incluyen la enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD se une a DR3.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede tener múltiples sitios de unión para (es decir, se une de manera multivalente a) una diana de la superficie celular que forma multímeros (por ejemplo, homómeros o heterómeros). Los múltiples sitios de unión pueden unirse a una diana de la superficie celular que requiere multimerización para la señalización. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede tener múltiples sitios de unión para una diana de la superficie celular. La unión de los múltiples sitios de unión puede dar como resultado la multimerización de la diana (por ejemplo, multimerización homomérica y heteromérica). La composición puede tener múltiples sitios de unión para diferentes dianas (es decir, se une de manera multivalente a más de una diana diferente). Los múltiples sitios de unión individuales de la composición pueden unirse a dianas en la misma célula. Los múltiples sitios de unión individuales de la composición pueden unirse a dianas en diferentes células. Se conocen en la técnica numerosos receptores que requieren de multimerización para efectuar su función normal. Se prevé que dichos receptores sean dianas de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD). La composición puede tener múltiples sitios de unión para una tirosina cinasa receptora. La composición puede tener múltiples sitios de unión para un receptor de factor de crecimiento. La composición puede tener múltiples sitios de unión para un receptor acoplado a proteína G. La composición puede tener múltiples sitios de unión para un receptor de quimiocinas. La composición puede tener múltiples sitios de unión para un miembro de la superfamilia de receptores de TNF.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFRSF10A (DR4). El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a DR4 y a una diana seleccionada entre: ErbB2, EGFR, IGF1R, TNFRSF10b (DR5), CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, TNFRSF5 (CD40), TNFRSF9 (41BB), IL6 e IGF1,2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a DR4 y que también se unen a al menos 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos, incluyendo cánceres, tales como cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, linfomas de linfocitos B, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y melanoma. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a DR4. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser CS1008 o mapatumumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFRSF10B (DR5). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a DR5 y a una diana seleccionada entre: ErbB2, EGFR, IGF1R, TNFRSF10A (DR4), CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, TNFRSF5 (CD40), TNFRSF9 (41BB), IL6 e IGF1,2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a DR5 y que también se unen a al menos 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos, incluyendo cánceres, tales como cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, linfomas de linfocitos B, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y melanoma. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a DR5. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser LBY135, AMG66, Apomab, PRO95780, lexatumumab, conatumumab o tigatuzumab.

Composiciones que redirigen la función de células efectoras

La divulgación también abarca composiciones multivalentes y multiespecíficas, tales como, composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que son capaces de yuxtaponer las células hospedadoras efectoras con células que se desea eliminar (por ejemplo, células inmunitarias, células cancerosas, células enfermas, agentes infecciosos y células infectadas por agentes infecciosos). Las funcionalidades multivalentes y multiespecíficas de las composiciones de la divulgación son particularmente adecuadas para redirigir las respuestas inmunitarias del hospedador y proporcionar numerosas ventajas frente a las plataformas de composición multiespecífica alternativas que se encuentran en desarrollo. La composición

multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a (1) un antígeno en una célula, tejido o agente infeccioso de interés (por ejemplo, una célula inmunitaria o un antígeno tumoral en una célula tumoral) y (2) una diana en una célula efectora, a fin de dirigir una respuesta inmunitaria hacia la célula, tejido o agente infeccioso de interés. Las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden ser monoméricas o multiméricas. Además, la diana multimérica a la que se une una composición multivalente y monovalente puede ser homomultimérica o heteromultimérica. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 2, 3, 4 o 5 dianas en la célula, tejido o agente infeccioso de interés. Una o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede ser un antígeno tumoral (por ejemplo, antígenos tumorales y antígenos asociados con tumores/cáncer). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas también tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades y trastornos que incluyen, pero sin limitación, enfermedades del sistema inmunitario, el sistema esquelético, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso, así como una enfermedad infecciosa. Por lo tanto, pueden asociarse 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario (por ejemplo, una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario divulgado en el presente documento, tal como inflamación o una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide)). pueden asociarse 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis u otra enfermedad o trastorno del sistema esquelético como se divulga en el presente documento). pueden asociarse 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente con una enfermedad o trastorno del sistema cardiovascular (por ejemplo, una enfermedad o trastorno del sistema cardiovascular como se divulga en el presente documento). pueden asociarse 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente con una enfermedad o trastorno del sistema nervioso (por ejemplo, una enfermedad o trastorno del sistema nervioso como se divulga en el presente documento). puede asociarse 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente con un agente infeccioso o enfermedad (por ejemplo, una enfermedad infecciosa o un agente divulgado en el presente documento).

Las células efectoras a las que puede unirse una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) de la invención incluyen, pero sin limitación, linfocitos T, monocitos/macrófagos y linfocitos citolíticos naturales.

La diana en una célula a la que se dirige una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede ser un antígeno tumoral. Se prevé que las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) son capaces de unirse virtualmente a cualquier tipo de tumor y cualquier tipo de antígeno tumoral. Los tipos de tumores ilustrativos que pueden usarse como diana incluyen, pero sin limitación, uno o más cánceres seleccionados entre el grupo: cáncer colorrectal, esofágico, gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer biliar, glioma, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de la vejiga urinaria y cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de cuello de útero y cáncer de endometrio. Los tipos ejemplares de tumores que pueden usarse como diana incluyen cánceres hematológicos. Los cánceres hematológicos que pueden usarse como diana incluyen, pero sin limitación, uno o más cánceres seleccionados entre el grupo de linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin medular, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica y leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda.

Los antígenos tumorales ejemplares incluyen ErbB1, ErbB2, ErbB3, VEGFR1, VEGFR2, EGFRvIII, CD16, CD19, CD20, oncostatina M, PSA, PSMA, integrina avb6, ADAM9, CD22, CD23, CD25, CD28, CD36, CD45, CD46, CD56, CD79a/CD79b, CD103, JAM-3, gp100, ALCAM, PIPA, A33, carboxipeptidasa M, E-cadherina, CA125, CDK4, CEA, CTLA-4, RAAG10, receptor de transferrina, p-15, GD2, MUM-1, MAGE-1, MAGE-3, KSA, MOC31, MIC-1, EphA2, GAGE-1, GAGE-2, MART, KID31, CD44v3, CD44v6 y ROR1. Los antígenos tumorales ejemplares adicionales se describen en el presente documento y/o se conocen en la técnica.

La diana en una célula a la que se dirige una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede ser una célula inmunitaria o una célula inflamatoria.

La divulgación abarca una composición multiespecífica multivalente y monovalente que puede unirse a un antígeno tumoral que no se expresa en las células tumorales en sí, sino en cambio, en las células no malignas reactivas y de soporte tumoral circundantes que comprenden el estroma tumoral (es decir, antígenos asociados con tumores). El estroma tumoral comprende células endoteliales que forman nuevos vasos sanguíneos y fibroblastos estromales que rodean la vasculatura tumoral. Una composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un antígeno asociado con tumores en una célula endotelial. Una composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un antígeno tumoral y también se une a un antígeno asociado con tumores en una célula de fibroblasto. Una composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un antígeno tumoral y también puede unirse a una proteína de activación de fibroblastos (FAP).

Los agentes infecciosos a los que una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede dirigir una respuesta inmunitaria incluyen, pero sin limitación, células procariotas y eucariotas, virus (incluyendo bacteriófagos), objetos extraños (por ejemplo, toxinas) y organismos

infecciosos, tales como hongos y parásitos (por ejemplo, parásitos de mamíferos), como se describe en el presente documento y agentes infecciosos asociados con enfermedades infecciosas descritas en el presente documento. La expresión "agentes infecciosos" también pretende abarcar otras células procariotas y eucariotas, virus (incluyendo bacteriófagos), objetos extraños (por ejemplo, toxinas) y organismos infecciosos, tales como hongos y parásitos por lo demás conocidos en la técnica.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a (1) un antígeno en una célula, tejido o agente infeccioso de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral) y (2) tiene un solo sitio de unión para una diana en una célula efectora, a fin de dirigir una respuesta inmunitaria hacia la célula, tejido o agente infeccioso de interés. El único sitio de unión puede ser un MRD. El sitio de unión individual puede ser un dominio de unión a antígeno de anticuerpo. La unión de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede no desencadenar una señal cuando la composición se une a una diana en una célula efectora. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 2, 3, 4 o 5 dianas en la célula, tejido o agente infeccioso de interés. Al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas de la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar ubicadas en una superficie celular. 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede ser un antígeno tumoral (por ejemplo, antígenos tumorales y antígenos asociados con tumores/cáncer). Una o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. Una o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a (1) un antígeno en una célula, tejido o agente infeccioso de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral) y (2) una diana en un leucocito, a fin de dirigir una respuesta inmunitaria a la célula, tejido o agente infeccioso de interés. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 2, 3, 4 o 5 dianas en la célula, tejido o agente infeccioso de interés. Al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas de la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar ubicadas en una superficie celular. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas descritas en el presente documento. 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede ser un antígeno tumoral (por ejemplo, antígenos tumorales y antígenos asociados con tumores/cáncer). Una o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. Una o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa.

La invención también abarca composiciones multivalentes y multiespecíficas que se unen a una diana expresada en un leucocito. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a (1) un antígeno en una célula, tejido o agente infeccioso de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral) y (2) tiene un solo sitio de unión para una diana en un leucocito, a fin de dirigir una respuesta inmunitaria hacia la célula, tejido o agente infeccioso de interés. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 2, 3, 4 o 5 dianas en la célula, tejido o agente infeccioso de interés. Al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas de la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar ubicadas en una superficie celular. 1, 2, 3, 4, 5 o más antígenos pueden ser antígenos asociados con tumores/cáncer). 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana expresada en un linfocito T. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a (1) un antígeno en una célula, tejido o agente infeccioso de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral) y (2) una diana en un linfocito T a fin de yuxtaponer células mieloides con la célula, tejido o agente infeccioso de interés. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener múltiples sitios de unión para (es decir, se une de manera multivalente a) una diana en un linfocito T. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para (es decir, se une de manera monovalente a) una diana en un linfocito T. El sitio de unión individual puede ser un MRD. El sitio de unión individual puede ser un dominio de unión a antígeno. La unión de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede no desencadenar una señal cuando la composición se une a una diana en un linfocito T. La unión de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede no dar como resultado la lisis del linfocito T que expresa la diana. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana seleccionada entre: CD2, CD3, CD4, CD8, CD161, un receptor de quimiocinas, CD95, y CCR5. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 2, 3, 4 o 5 dianas en la célula, tejido o agente infeccioso de interés. Al menos 1, 2, 3, 4, 5 más de las dianas de la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden ubicarse en una

superficie celular. 1, 2, 3, 4, 5 o dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden ser un antígeno tumoral (por ejemplo, antígenos tumorales y antígenos asociados con tumores/cáncer). 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener una proteína de fusión que contiene uno o más péptidos que se unen a una proteína en la superficie de una célula, tal como un linfocito T. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a secuencias de proteína diana próximas a la membrana en una célula e inhibir el entrecruzamiento (por ejemplo, la multimerización) de la proteína diana o sus proteínas asociadas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un linfocito T e inhibir el entrecruzamiento de la proteína diana o sus proteínas asociadas. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente y multiespecífico puede comprender los 27 aminoácidos amino-terminales de CD3 épsilon maduro. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede comprender una proteína de fusión que contiene una o más proteínas correspondientes al dominio G de una proteína CD3 (por ejemplo, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD3 alfa (TCRA) o CD3 beta (TCRB)). Por lo tanto, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: GYYVCYPRGSKPEDANFYLYLR ARVC (SEQ ID NO: 21), YLYLRAR (SEQ ID NO: 22), YRCNGTDIYKDKESTVQ VHRYMC (SEQ ID NO: 23) y DKESTVQVH (SEQ ID NO: 24). La composición puede comprender una proteína de fusión que contiene una o más proteínas correspondientes a una porción del dominio extracelular de una proteína CD3 (por ejemplo, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD3 alfa (TCRA) o CD3 beta (TCRB)) que es capaz de unirse a CD3 o a un multímero de CD3. Por lo tanto, la proteína de fusión puede comprender una porción de una proteína CD3 que es capaz de unirse a CD3 o a un multímero de CD3, en donde la porción comprende un fragmento de unión a CD3 de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: KPIIEELED RVFVNCNTSITWVEG TVGTLLSDITRLDLGKRILDPRIYRCNGTDIY KDKESTVQVHRYMCQSCVELD (ECD de CD3 delta humano maduro, SEQ ID NO: 25), QSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAAEK NITWFKDGKMIGFLTEDKKWNLGSKNAKDPGRMYQCKGSKQNKSKPLQVYYRMCQNC IELN (ECD de CD3 gamma humano maduro, el dominio de tipo Ig está resaltado; SEQ ID NO: 26), GNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGS DEDHL SLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVM (ECD de CD3 épsilon gamma humano maduro, el dominio de tipo Ig está resaltado, SEQ ID NO: 27) y QSFGLLDPK (ECD de CD3 zeta humano maduro, SEQ ID NO: 28). La proteína de fusión puede comprender un fragmento de quimiocina que se une a una diana en la superficie celular. El fragmento de quimiocina puede ser una porción de quimiocina seleccionada entre: CCL20 (LARC/Ckβ4), CCL25 (TECK/Ckβ15), CXCL12 (SDF-1), CXCL13 (BCA-1), CXCL16 (SRPSOX) y CX3CL1 (Fractalcina). El fragmento de quimiocina puede ser una porción de quimiocina seleccionada entre: CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP-2), CXCL9 (MIG/CRG-10), CXCL10 (IP-10/CRG-2) y CXCL11 (TAC/IP-9). El fragmento de quimiocina puede ser una porción de una quimiocina seleccionada entre CCL3 (MIP-1a) y CCL4 (MIP-1β).

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a CD3. La composición puede unirse a una diana de CD3 seleccionada entre CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD3 zeta, TCR alfa, TCR beta, el complejo de TCR o una combinación heteromérica u homomultimérica del mismo. La composición puede unirse a CD3 épsilon. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 y a múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes (por ejemplo, un antígeno tumoral como se divulga en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para (es decir, se une de manera monovalente a) CD3. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo MRD que se une a CD3 y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes (por ejemplo, un antígeno tumoral como se divulga en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo dominio de unión a antígeno de anticuerpo que se une a CD3 y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes (por ejemplo, un antígeno tumoral como se divulga en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica). Las composiciones de unión a CD3 de la divulgación pueden no ser anticuerpos monocatenarios.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a CD3 humano y a un ortólogo de CD3 de otro organismo. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 humano y a un ortólogo de CD3 de otro primate. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 humano y a un ortólogo de CD3 de mono cinomolgo o mono rhesus. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 humano y a un ortólogo de CD3 de un primate seleccionado entre *Saguinus Oedipus* y *Callithrix jacchus*. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 humano y a un ortólogo de CD3 de mono cinomolgo y a un ortólogo de CD3 de ratón o rata. Las composiciones de unión a CD3 épsilon humano de la divulgación pueden no ser anticuerpos monocatenarios. Las composiciones de unión a CD3 de la divulgación pueden no ser anticuerpos monocatenarios.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a CD3 épsilon humano. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a la proteína CD3 épsilon humana que tiene la secuencia de aminoácidos 23-207 expuesta en la Referencia de Secuencia del NCBI n.º NP_000724. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTT VILT (SEQ ID NO: 29). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de QDGNEEMGGI (SEQ ID NO: 30). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de QDGNEEMGG (SEQ ID NO: 31). Las composiciones de unión a CD3 épsilon humano de la divulgación pueden no ser anticuerpos monocatenarios.

Una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede tener un solo sitio de unión para CD3 épsilon (es decir, se une de manera monovalente a CD3 épsilon) y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes (por ejemplo, un linfocito B u otra diana divulgada en el presente documento). La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede competir por la unión a CD3 con un anticuerpo seleccionado entre: OKT-3, oteixizumab, teplizumab, visilizumab, muromonab, X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT31, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW24B6, OKT3D, M-T301, SMC2 y F101.01. Un MRD de un anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión a CD3 con un anticuerpo seleccionado entre: OKT-3, oteixizumab, teplizumab, visilizumab, muromonab X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT31, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW24B6, OKT3D, M-T301, SMC2 y F101.01. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede competir por la unión a CD3 con una composición de unión a CD3 divulgada en las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO2004/106380 y WO99/54440; Tunnacliffe et al., Int. Immunol. 1:546-550 (1989); Kjer-Nielsen, PNAS 101:7675-7680 (2004); o Salmeron et al., J. Immunol. 147: 3047-3052 (1991).

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a CD3 épsilon humano y a un ortólogo de CD3 épsilon de otro organismo. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a CD3 épsilon humano y a un ortólogo de CD3 épsilon de otro primate. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 épsilon humano y a un ortólogo de CD3 épsilon de mono cinomolgo o de mono rhesus. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 épsilon humano y a un ortólogo de CD3 épsilon de un primate seleccionado entre *Saguinus Oedipus* y *Callithrix jacchus*. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 épsilon humano y a un ortólogo de CD3 épsilon de mono cinomolgo y un ortólogo de CD3 épsilon de ratón o rata. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 épsilon.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a CD3 delta. La composición multiespecífica, multivalente y monovalente puede unirse a la proteína CD3 delta humana que tiene la secuencia de aminoácidos 22-171 expuesta en la Referencia de Secuencia del NCBI n.º NP_000723. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 delta. Un dominio de unión a antígeno de anticuerpo de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 delta. Las composiciones de unión a CD3 épsilon de la invención pueden no ser anticuerpos monocatenarios.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a la proteína CD3 gamma humana que tiene la secuencia de aminoácidos 23-182 expuesta en la Referencia de Secuencia del NCBI n.º NP_000064. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a gamma. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 gamma. Un dominio de unión a antígeno de anticuerpo de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 gamma. Las composiciones de unión a CD3 gamma de la divulgación pueden no ser anticuerpos monocatenarios.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a la proteína CD3 zeta que tiene la secuencia de aminoácidos 22-164 expuesta en la Referencia de Secuencia del NCBI n.º NP_932170. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 zeta. Un dominio de unión a antígeno de anticuerpo de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3 zeta. Las composiciones de unión a CD3 zeta de la divulgación pueden no ser anticuerpos monocatenarios.

La divulgación también abarca composiciones multivalentes y multiespecíficas que se unen a una diana expresada en linfocito citotóxico natural. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a (1) un antígeno en una célula, tejido o agente infeccioso de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral) y (2) una diana en un linfocito citotóxico natural. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener múltiples sitios de unión para (es decir, se une de manera multivalente) una diana en un linfocito citotóxico natural. La composición multiespecífica multivalente y monovalente

puede tener un solo sitio de unión para (es decir, se une de manera monovalente a) una diana en un linfocito citolítico natural. El sitio de unión individual puede ser un MRD. El sitio de unión individual puede ser un dominio de unión a antígeno de anticuerpo. La unión de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede no desencadenar una señal cuando la composición se une a una diana en un linfocito citolítico natural. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana seleccionada entre: KLRD1, KLRK1, KLRB1, 2B4 (CD244), KIR2D4, KIR2D5 y KIR3DL1. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana seleccionada entre: CD56, CD2 y CD161. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 2, 3, 4 o 5 dianas en la célula, tejido o agente infeccioso de interés. Al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas de la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar ubicadas en una superficie celular. 1, 2, 3, 4, 5 o dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden ser un antígeno tumoral (por ejemplo, antígenos tumorales y antígenos asociados con tumores/cáncer). 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD2. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a CD2 humano. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a la proteína CD2 humana que tiene la secuencia de aminoácidos 25-209 expuesta en la Referencia de Secuencia del NCBI n.º NP_001758. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener múltiples sitios de unión para CD2. El único sitio de unión puede ser un MRD. El sitio de unión individual puede ser un dominio de unión a antígeno de anticuerpo. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede ser un solo sitio de unión para CD2. La unión de la composición multiespecífica multivalente y monovalente a CD2 puede no desencadenar una señal por la célula en la que se expresa CD2. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD2 y a 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes (por ejemplo, un antígeno tumoral como se divulga en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica). Las composiciones de unión a CD2 de la invención no son anticuerpos monocatenarios.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a CD2 humano y a un ortólogo de CD2 de otro organismo. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD2 humano y a un ortólogo de CD2 de otro primate. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD2 humano y a un ortólogo de CD2 de mono cinomolgo o mono rhesus.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a un antígeno en una célula mieloide. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a (1) un antígeno en una célula, tejido o agente infeccioso de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral) y (2) una diana en una célula accesoria inmunitaria (por ejemplo, una célula mieloide) a fin de juxtaponer células mieloides con la célula, tejido o agente infeccioso de interés. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener múltiples sitios de unión para (es decir, se une de manera multivalente) a una diana en una célula mieloide. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión para (es decir, se une de manera monovalente a) una diana en una célula accesoria (por ejemplo, célula mieloide). El único sitio de unión puede ser un MRD. El sitio de unión individual puede ser un dominio de unión a antígeno de anticuerpo. La unión de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede no desencadenar una señal cuando la composición se une a una diana en una célula mieloide. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un receptor de Fc gamma seleccionado entre CD16 (es decir, Fc gamma RIII), CD64 (es decir, Fc gamma RI) y CD32 (es decir, Fc gamma RII). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD64 (es decir, Fc gamma RI). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana seleccionada entre, la clase 2 del MHC y su cadena invariante, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 2, 3, 4 o 5 dianas en la célula, tejido o agente infeccioso de interés. Al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas de la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar ubicadas en una superficie celular. 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden ser un antígeno tumoral (por ejemplo, antígenos tumorales y antígenos asociados con tumores/cáncer). 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. 1, 2, 3, 4, 5 o más de las dianas a las que se une la composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden estar asociadas con una enfermedad o trastorno del sistema esquelético (por ejemplo, osteoporosis), el sistema cardiovascular, el sistema nervioso o una enfermedad infecciosa.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a una diana de interés en una célula cancerosa. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana de interés en una célula inmunitaria. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana de interés en una célula enferma. La composición multiespecífica

multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a una diana de interés en un agente infeccioso (por ejemplo, una célula bacteriana o un virus).

La divulgación abarca un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno administrando a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multivalente y monovalente de la divulgación. La divulgación describe métodos de tratamiento de una enfermedad o trastorno administrando a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) que tiene un solo sitio de unión para una diana (es decir, que se une de manera monovalente a una diana). La composición multiespecífica multivalente y monovalente administrada puede tener un solo sitio de unión para una diana en un leucocito, tal como un linfocito T (por ejemplo, CD3). La composición multiespecífica multivalente y monovalente administrada puede tener un solo sitio de unión para una diana en un leucocito, tal como un linfocito T (por ejemplo, CD3) y múltiples sitios de unión para (es decir, es capaz de unirse de manera multivalente a) una diana ubicada en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral).

La divulgación describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) que tiene un solo sitio de unión para una diana (es decir, que se une de manera monovalente a una diana) y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes.

La divulgación describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno administrando a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) que tiene un solo sitio de unión para CD3 (por ejemplo, CD3 épsilon) que se une de manera monovalente a CD3 y múltiples sitios de unión para 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas diferentes.

La célula tumoral puede ser de un cáncer seleccionado entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer de tiroides.

Los MRD y el anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD pueden ser antagonistas en sus dianas respectivas. Los MRD y el anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD pueden ser agonistas de su diana respectiva. Al menos uno de los MRD en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un antagonista de su molécula diana y el anticuerpo puede ser un agonista de su molécula diana. Al menos uno de los MRD en el anticuerpo que contiene MRD puede ser un agonista de su molécula diana y el anticuerpo puede ser un antagonista de su molécula diana.

Tanto los MRD como el anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD pueden unirse a factores solubles. Tanto los MRD como el anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD pueden unirse a moléculas de la superficie celular. Al menos un MRD en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una molécula de la superficie celular y el anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse a un factor soluble. Al menos un MRD en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse a un factor soluble y el anticuerpo en el anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una molécula de la superficie celular.

También puede prepararse una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) que se une de manera específica a una diana o dianas deseadas basándose en un MRD previamente conocido o una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD). Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-150 o más de 150 sustituciones de aminoácidos, eliminaciones o inserciones pueden introducirse en un MRD o una secuencia de composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) y el MRD resultante o la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, el anticuerpo que contiene MRD) puede explorarse respecto de su unión a la diana o las dianas deseadas, respecto de el antagonismo de la actividad diana o respecto del antagonismo de la actividad diana como se describe en los ejemplos o usando técnicas conocidas en la materia.

Pueden añadirse secuencias de péptido adicionales, por ejemplo, para potenciar la estabilidad *in vivo* del MRD o la afinidad del MRD por su diana.

Puede potenciarse la unión de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) a su diana (por ejemplo, una célula) en comparación con la unión del MRD solo, el anticuerpo solo y/o la combinación del MRD y el anticuerpo. La unión puede estar al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces mejorada.

Además, la unión de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) a una diana (por ejemplo, una célula o una molécula que contiene múltiples epítomos) que expresa tanto la diana del MRD como la diana del anticuerpo puede mejorarse en comparación con la unión de la

composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) a una diana (por ejemplo, una célula o una molécula que contiene múltiples epítopos) que expresan únicamente la diana del MRD o únicamente la diana del anticuerpo. La unión puede estar al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces mejorada. Esta avidéz aumentada puede permitir que las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se unan a dianas que han sido difíciles de alcanzar con anterioridad, por ejemplo, receptores acoplados a proteína G y moléculas de carbohidratos.

Además, la unión de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) a una diana de MRD puede mejorarse en una región (por ejemplo, del organismo) donde se localiza la diana del anticuerpo en comparación con una región donde no se expresa la diana del anticuerpo o se expresa a un nivel menor. La unión de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) a una diana de anticuerpo puede mejorarse en una región (por ejemplo, del organismo) donde se localiza la diana del MRD en comparación con una región donde no se expresa la diana del MRD o se expresa a un nivel menor. La unión puede estar al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces mejorada.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede conservar actividades particulares del anticuerpo original. Por lo tanto, la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser capaz de inducir citotoxicidad dependiente de complemento. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser capaz de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser capaz de inducir apoptosis. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser capaz de reducir el volumen tumoral. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser capaces de inhibir el crecimiento tumoral.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede mostrar propiedades de actividad o farmacocinéticas mejoradas en comparación con el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido. Por lo tanto, la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener mayor avidéz que el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede dar como resultado una mayor agregación del receptor en comparación con el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede antagonizar la actividad diana en mayor medida que el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede agonizar la actividad de la diana en mayor medida que el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener un perfil farmacodinámico mejorado en comparación con el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido.

El anticuerpo que contiene MRD puede tener una mayor eficacia terapéutica que el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden tener uno o más de los siguientes efectos: inhibir la proliferación de células tumorales, reducir la tumorigenicidad de un tumor, inhibir el crecimiento tumoral, aumentar la supervivencia del paciente, provocar la muerte celular de células tumorales, diferenciar células tumorogénicas en un estado no tumorogénico o prevenir la metástasis de células tumorales.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser al menos igual de estable que el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser más estable que el anticuerpo correspondiente sin el MRD unido. Puede medirse la estabilidad del MRD-anticuerpo usando métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, técnicas ELISA. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser estable en sangre completa a 37°C durante al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 15 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 25 horas, al menos aproximadamente 30 horas, al menos aproximadamente 35 horas, al menos aproximadamente 40 horas, al menos aproximadamente 45 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 50 horas, al menos aproximadamente 55 horas, al menos aproximadamente 60 horas, al menos aproximadamente 65 horas, al menos aproximadamente 70 horas, al menos aproximadamente 72 horas, al menos aproximadamente 75 horas, al menos aproximadamente 80 horas, al

menos aproximadamente 85 horas, al menos aproximadamente 90 horas, al menos aproximadamente 95 horas o al menos aproximadamente 100 horas.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener al menos la misma afinidad por receptores de Fc que el anticuerpo original correspondiente. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener al menos la misma afinidad por receptores de complemento que el anticuerpo original correspondiente. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener al menos la misma semivida que el anticuerpo original correspondiente. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede expresarse a niveles proporcionales a los del anticuerpo original.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener una afinidad aumentada por receptores de Fc en comparación con el anticuerpo original correspondiente. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener una afinidad aumentada por los receptores de complemento en comparación con el anticuerpo original correspondiente. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede tener una semivida aumentada en comparación con el anticuerpo original correspondiente. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede expresarse a niveles aumentados en comparación con los del anticuerpo original correspondiente.

Inmunoconjugados (conjugados de anticuerpo que contiene MRD-fármaco)

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos, permite el suministro dirigido de los fármacos a tumores y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados pueden dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células que se desea eliminar (Baldwin et al., Lancet páginas 603-05 (1986); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al., (ed.), págs. 475-506) (1985)).

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse de manera covalente o de otro modo asociarse con un agente citotóxico (carga) (es decir, en forma de complejos de composición multiespecífica multivalente y monovalente-agente citotóxico (por ejemplo, complejos de anticuerpo que contiene MRD-agente citotóxico). El agente citotóxico puede unirse covalentemente a una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) mediante un enlazador. El enlazador que une la composición multiespecífica multivalente y monovalente y el agente citotóxico puede ser escindible por una proteasa. El agente citotóxico puede ser un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas), un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado) o un profármaco. Los métodos para usar inmunoconjugados (conjugados de anticuerpo que contiene MRD-fármaco) también están abarcados por la divulgación.

Los agentes citotóxicos que pueden asociarse covalentemente o de otro modo con las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) incluyen, pero sin limitación, cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, que las elimine). Las citotoxinas útiles en las composiciones y métodos de la divulgación incluyen, *entre otras cosas*, agentes alquilantes, agentes intercalantes, agentes antiproliferativos, agentes antimetabólicos, agentes de unión a tubulina, alcaloides de la vinca, enediinas, tricotecenos, podofilotoxinas o derivados de podofilotoxinas, la familia de fármacos de pteridina, taxanos, antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina, dolastatinas (por ejemplo, dolastatina 10, dolastatina 11 y dolastatina 15)), inhibidores de topoisomerasa y agentes quimioterapéuticos de complejo de platino (por ejemplo, cis-platino).

Las composiciones de la invención pueden incluir un agente citotóxico que es un agente despolimerizante de la tubulina. Por lo tanto, algunas composiciones de la invención pueden incluir una auristatina o un derivado o análogo de auristatina. Las composiciones pueden contener monometil auristatina E (MMAE). Las composiciones pueden contener monometil auristatina F (MMAF). Una composición de inmunoconjugado de la invención puede contener dolastatina o un análogo peptídico o derivado de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.635.483, 5.780.588 y 5.663.149).

Las composiciones de la invención pueden incluir una molécula de maitansinoide. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. Los métodos para producir maitansinoides y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.208.020; 5.416.064, 6.441.163 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1.

Por lo tanto, la citotoxina puede ser un maitansinoide o un derivado o análogo de maitansinoide. Los restos de fármaco de maitansinoide son restos de fármacos atractivos en los conjugados de anticuerpo-fármaco ya que son: (i)

relativamente fáciles de preparar por fermentación o modificación o derivatización química de los productos de fermentación, (ii) susceptibles a la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de enlaces no de disulfuro a los anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra una variedad de líneas de células tumorales. Los compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos de fármaco de maitansinoide se conocen bien en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al PNAS 99:7968-7973 (2002)) o pueden prepararse maitansinol y análogos de maitansinol sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

Las composiciones de la invención pueden incluir el maitansinoide DM1 (N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina). Las composiciones de la invención pueden incluir el maitansinoide DM2. Las composiciones de la invención pueden incluir el maitansinoide DM3 (N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina) o DM4 (N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina).

Las composiciones de la invención pueden incluir un agente citotóxico que es un agente alquilante. El agente citotóxico puede seleccionarse entre mecloretamina, tiotepa, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), BCNU lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol y estreptozaicina.

Las composiciones de la invención pueden incluir un agente citotóxico que es un antimetabolito. El agente citotóxico puede seleccionarse entre metotrexato, diclorometotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo t 5-fluorouracilo decarbazina.

El conjugado de composición multivalente y multiespecífica-fármaco (por ejemplo, conjugado de anticuerpo que contiene MRD-fármaco) puede ser capaz de producir roturas de ADN bicatenarias. El conjugado de anticuerpo que contiene MRD-fármaco puede contener un miembro de la familia de caliceamicina de antibióticos capaces de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones subpicomolares. Un conjugado de composición multivalente y multiespecífica-fármaco (por ejemplo, conjugado de anticuerpo que contiene MRD-fármaco) puede contener caliceamicina. Para la preparación de conjugados de la familia de caliceamicina, véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliceamicina que pueden estar contenidos en el conjugado de composición multivalente y multiespecífica-fármaco (por ejemplo, conjugado de anticuerpo que contiene MRD-fármaco) de la divulgación incluyen, pero sin limitación, γ_1 , α_2 , α_3 , N-acetil γ_1 , PSAG y θ_1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993) y Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)).

Las composiciones de conjugado de composición multivalente y multiespecífica-fármaco (por ejemplo, conjugado de anticuerpo que contiene MRD-fármaco) de la invención pueden incluir un agente citotóxico seleccionado entre adriamicina, doxorubicina, mitomicina C, busulfán, citoxina, clorambucilo, etopósido, fosfato de etopósido, CC-1065, duocarmicina, KW-2189, CC1065, taxotere (docetaxel), metopterina, aminopterina, topotecán, camptotecina, porfiromicina, bleomicina, tenipósido, esperamicinas, mitramicina, antramicina (AMC), fludarabina, tamoxifeno, taxotere (docetaxel), citosina arabinósido (Ara-C), arabinósido de adenosina, cisplatino, carboplatino, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, cloroquina, ciclosporina A, docetaxel, paclitaxel, taxol, vinorelbina, vindesina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, ifosfamida, ciclofosfamida, tenopósido, carminomicina, porfiromicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, dactinomicina, actinomicina D, puromicina 1-deshidrottestosterona, adriamicina, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, epitiolona, QFA, combretastatina, combretastatina A4 fosfato, vinblastina, vincristina, colchicina, geldanamycin, doxorubicinclorambucilo, auristatina F fenileno diamina (AFP)), monometilauristatina, la familia de agentes conocida de manera colectiva como el complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de los Estados Unidos n.º 5.877.296) o un derivado o análogo de las mismas y derivados y análogos de las mismas.

Se describen toxinas adicionales adecuadas y agentes quimioterapéuticos se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed. (Mack Publishing Co. 1995) y en Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7.ª Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Además, para una descripción adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y otros métodos que pueden usarse o adaptarse de manera rutinaria para conjugar agentes terapéuticos al complejo de anticuerpo que comprende MRD, véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud Internacional WO2007/059404; Saito et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215 (2003); Trail et al., Cancer Immunol Immunother. 52:328-337 (2003); Payne, Cancer Cell 3:207-212 (2003); Allen, Nat. Rev. Cancer 2:750-763(2002); Pastan et al., Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091 (2002); y Senter et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264 (2001).

Los agentes quimioterapéuticos de citotoxinas que pueden usarse en los inmunoconjugados de la invención (por ejemplo, conjugados de composición multivalente y multiespecífica-fármaco, tales como conjugados de anticuerpo que contiene MRD-fármaco) incluyen lectinas venenosas y toxinas vegetales y otras (por ejemplo, ricina, abrina, modecina, botulina y toxinas de difteria). Se prevé que puedan acoplarse opcionalmente múltiples copias de una toxina o combinaciones de varias toxinas a una composición multiespecífica y multivalente de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD), proporcionando de este modo citotoxicidad adicional. Las toxinas

enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse en composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), exotoxina de *Pseudomonas*, endotoxina de *Pseudomonas*, la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, las proteínas de *Aleurites fordii*, ribonucleasa, DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47:641 (1986), Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994) y las Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO93/21232 y WO93/21232.

Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lubke, "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de: las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.635.483 y 5.780.588; Pettit et al., J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465 (1989); Pettit et al., Anti-Cancer Drug Design 13:243-277 (1998); Pettit et al., Synthesis 719-725 (1996); Pettit et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863 (1996); y Doronina et al., Nat. Biotechnol 21(7):778-784 (2003).

Las composiciones de la invención pueden comprender un átomo altamente radiactivo. Se encuentra disponible una variedad de isótopos radiactivos para la producción de composiciones multivalentes y multiespecíficas radioconjugadas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD). Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centellografía, por ejemplo, tc^{99m} o I^{123} o un marcador de spin para obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes por resonancia magnética, IRM), tales como nuevamente, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros pueden incorporarse en el conjugado usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, puede sintetizarse el péptido de manera biológica o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que incluyen, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e ln^{111} pueden unirse a través de un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 (1978)) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe en detalle otros métodos que pueden aplicarse de manera rutinaria para marcar las composiciones de la invención.

Un enlazador puede ser un "enlazador escindible", que facilita la liberación de un fármaco en el interior de la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil a ácidos (por ejemplo, hidrazona), un enlazador sensible a proteasas (por ejemplo, sensible a peptidasa), un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos n.º 5.208.020; Publicación de Solicitud de los Estados Unidos n.º 20110293513). Por lo tanto, la invención abarca composiciones multivalentes y multiespecíficas que contienen uno o más enlazadores que pueden contener cualquiera de una serie de grupos como parte de su cadena que se escindirán *in vivo*, por ejemplo, en una célula, a una velocidad que está mejorada en relación con la de las construcciones que carecen de dichos grupos. También se proporcionan conjugados de los brazos de enlazador con agentes terapéuticos y diagnósticos. Los enlazadores son útiles para formar análogos de profármaco de agentes terapéuticos y para unir de manera reversible un agente terapéutico o diagnóstico (por ejemplo, una citotoxina o MRD) a un agente de direccionamiento, un marcador detectable o un soporte sólido. Los enlazadores pueden ser estables en plasma, a fin de no liberar un MRD o agente citotóxico. En el caso de las citotoxinas, los enlazadores pueden ser estables en plasma y lábiles una vez internalizados, a fin de liberar la citotoxina en una forma activa.

Los MRD y/o los agentes citotóxicos están unidos opcionalmente entre sí o a la composición multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) de la invención con un enlazador, como se describe en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica. Los conjugados del anticuerpo que contiene MRD con un MRD o un agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteína bifuncionales conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, agentes de acoplamiento que contienen un grupo seleccionado entre: 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidocaproil-poli(etilenglicol) ("MC(PEG)6-OH" (susceptible a la unión a cisteínas del anticuerpo)), maleimidopropanoilo (MP), MPBH, valina-citrulina (val-cit (dipéptido ejemplar en un enlazador escindible por proteasas)), metil-valina-citrulina ("Me-Val-CitN," un enlazador en el que se ha modificado un enlace peptídico para prevenir su escisión por catepsina B) alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxicarbonilo (PAB (un ejemplo de un componente enlazador "autoinmolador")), valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo ("vc-PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo (SMCC), LC-SMCC, (4-yodoacetil) aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), IT (iminotiolano), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato), 6-maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (MC-vc-PAB), etilenoxi-CH₂CH₂O-- en forma de una o más unidades repetidas

("EO" o "PEO"), BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, MBS, SBAP, SIA, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SMCC, sulfo-SIAB, sulfo-SMPB, SVSB (benzoato de succinimidil-(4-vinilsulfona)), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Se conocen en la técnica componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en el presente documento.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede estar unida covalentemente a un agente citotóxico a través de un enlazador en 1-5, 5-10, 1-10 o 1-20 sitios en la composición multivalente y multiespecífica. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede estar unida covalentemente a un agente citotóxico a través de un enlazador en más de 2, 5 o 10 sitios en la composición multivalente y multiespecífica.

El complejo de la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede estar asociado con un profármaco. Las síntesis de profármaco, la unión química a anticuerpos y las propiedades farmacodinámicas se conocen en la técnica y pueden aplicarse de manera rutinaria para producir y usar composiciones multivalentes de la invención que contienen profármacos, tal como, composiciones de anticuerpo que contiene MRD-profármaco. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional n.º WO96/05863 y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.962.216.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican las porciones de anticuerpo y citotóxicas del conjugado, ya se encuentren adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) de la invención también puede conjugarse a un isótopo radiactivo para generar agentes radiofarmacéuticos citotóxicos, también citados como radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse a composiciones multiespecíficas multivalentes y monovalentes (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰, y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados se encuentran establecidos en la técnica. Se encuentran disponibles comercialmente ejemplos de radioinmunoconjugados, incluyendo Zevalin™. (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals) y pueden usarse métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos que contienen MRD de la invención.

Los métodos para la conjugación de restos de enlazador-fármaco a proteínas diana de células, tales como anticuerpos, se conocen en la técnica e incluyen los descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.208.020 y 6.441.163; Publicaciones de Solicitud Internacional n.º WO2005037992, WO2005081711 y WO2006/034488. Véase, también, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2.ª Ed.), Robinson et al., (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Saito et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215 (2003); Trail et al., Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337 (2003); Payne, Cancer Cell 3:207-212 (2003); Allen et al., Nat. Rev. Cancer 2:750-763 (2002); Pastan et al., Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091 (2002); y Senter et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264 (2001).

Una composición multiespecífica multivalente y monovalente de la invención puede comprender un agente citotóxico (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo que contiene MRD-agente citotóxico) y puede citarse generalmente en el presente documento como un inmunoconjugado. Un inmunoconjugado de la invención puede unirse a una diana de la superficie celular que se internaliza en el interior de la célula. La unión de un inmunoconjugado de la invención (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo que contiene MRD-agente citotóxico) a una diana de la superficie celular puede dar como resultado la internalización del inmunoconjugado dentro de la célula *in vitro*. La unión del inmunoconjugado a una diana de la superficie celular puede dar como resultado la internalización de la composición dentro de la célula *in vivo*. Los métodos descritos en el presente documento para tratar a un paciente pueden comprender: administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un inmunoconjugado (por ejemplo, una composición multiespecífica multivalente y monovalente de la invención que comprende un agente citotóxico, tal como un conjugado de anticuerpo que contiene MRD-agente citotóxico) que comprende un agente citotóxico y se une a una diana que se internaliza en una célula. El inmunoconjugado puede comprender un agente citotóxico divulgado en el presente documento. El inmunoconjugado puede comprender un agente citotóxico seleccionado entre un agente alquilante, agente antiproliferativo, agente de unión a tubulina, alcaloide de la vinca, enedina, podofilotoxina, derivado de podofilotoxina, un miembro de la familia de fármacos de pteridina, taxano, una dolastatina, inhibidor de topoisomerasa o un agente quimioterapéutico de complejo de platino. El agente citotóxico puede ser un maitansinoide o un derivado o análogo de maitansinoide. El agente citotóxico puede ser el maitansinoide DM1, DM2 o DM3. El agente citotóxico puede ser auristatina o un derivado o análogo de la auristatina. El agente citotóxico puede ser MMAE o MMAF. Los agentes citotóxicos están unidos opcionalmente a los otros

componentes del inmunoconjugado mediante un enlazador. El agente citotóxico puede estar unido a otros componentes del inmunoconjugado mediante un enlazador escindible por enzimas. El agente citotóxico puede estar unido a los otros componentes del inmunoconjugado mediante un enlazador lábil a ácidos.

- 5 El agente citotóxico de un inmunoconjugado de la invención puede tener una potencia de fármaco libre de menos de 10^{-7} M, 10^{-8} M o 10^{-9} M. La citotoxina puede tener una potencia de fármaco libre de 10^{-8} a 10^{-11} M.

Una diana a la que se une el inmunoconjugado puede seleccionarse entre CD19, CD22, CD30, CD33, CD56, CD70, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, PSMA, EphA2, ErbB2 (CD340), SLC44A4, MN (anhidrasa carbónica IX), GPNMB (glucoproteína de proteína de melanoma no metastásico), Cripto y α V integrina. Una diana a la que se une el inmunoconjugado puede seleccionarse entre CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD25, TNFRSF5 (CD40), CD64, CD74, CD79, CD105, CD174, CD205, CD227, CD326, CD340, MUC16, EGP-1, EGP-2, receptor de EGF (ErbB1), ErbB2, ErbB3, Factor H, FHL-1, flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), HM1.24, HER-2/neu, factor de crecimiento de tipo insulina (ILGF), IFN-gamma, IFN-alfa, IFN-beta, IL2R, IL4R, IL6R, IL13R, IL15R, IL17R, IL18R, IL2, IL6, IL8, IL12, IL15, IL17, IL18, IL25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1.24, HCG, HLA-DR, ED-B, TMEFF2, EphB2, FAP (proteína de activación de fibroblastos), mesotelina, EGFR, TAG-72, GD2 (codificado por el en B4GALNT1) y 5T4. Una diana a la que se une el inmunoconjugado puede ser una diana mieloide y hematopoyética seleccionada entre CD33, CD64, TNFRSF5 (CD40), CD56 y CD138. Una diana a la que se une el inmunoconjugado puede ser una diana de carcinoma seleccionada entre EpCam, GD2, EGFR, CD74, CD227, CD340, MUC16, GD2, GPNMB, PSMA, crypto, TMEFF2, EphB2, 5t4, mesotelina, TAG-72 y MN.

Una diana a la que se une el inmunoconjugado puede ser una diana de linfocitos B seleccionada entre CD19/CD21, CD20, CD22, TNFRSF5 (CD40), CD70, CD79a, CD79b y CD205. Una diana a la que se une el inmunoconjugado puede ser una diana de linfocitos T seleccionada entre CD25, CD30, TNFRSF5 (CD40), CD70 y CD205. Una diana a la que se une una diana celular endotelial puede seleccionarse entre CD105, el factor de células estromales, FAP y la diana vascular, ED-B.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, ya se encuentren adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

Lo siguiente se proporciona adicionalmente para cualquiera de los inmunoconjugados anteriores. Un inmunoconjugado puede tener actividad de eliminación de células *in vitro* o *in vivo*. El enlazador puede unirse al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo. El enlazador puede ser escindible por una proteasa. El enlazador puede comprender un dipéptido de val-cit. El enlazador puede comprender una unidad de p-aminobencilo. La unidad de p-aminobencilo puede estar dispuesta entre el fármaco y el sitio de escisión por proteasas. La unidad de p-aminobencilo puede ser p-aminobenciloxicarbonilo (PAB). El enlazador puede comprender 6 maleimidocaproilos. El 6-maleimidocaproilo puede estar dispuesto entre el anticuerpo y un sitio de escisión de proteasa en el enlazador. Lo anterior puede producirse de manera individual o en cualquier combinación entre sí.

El anticuerpo que contiene MRD de la presente divulgación también puede conjugarse a una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase, por ejemplo, el documento WO81/01145) en un fármaco anticáncer activo. Véase, por ejemplo, el documento WO88/07378 y la Patente de los Estados Unidos n.º 4.975.278. El componente enzimático del inmunoconjugado es capaz, preferentemente, de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierte en su forma citotóxica más activa. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell, 47:641 (1986) y Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de la misma que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, el inhibidor de *Saponaia officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO93/21232.

Las composiciones multivalentes y multispecíficas de la invención (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden estar conjugadas a un radioisótopo, tal como, ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re y ^{188}Re usando uno cualquiera de una serie de quelantes bien conocidas o mediante marcaje directo. El anticuerpo que contiene MRD puede acoplarse a fármacos, profármacos o linfocinas, tales como, interferón. Las composiciones de la invención pueden marcarse con reactivos para el ligando respectivo, quelarlas o de otro modo complejarlas a un radioisótopo metálico, donde el reactivo reacciona cisteína tiol modificada del anticuerpo, usando técnicas conocidas en la materia, tales como, las descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que pueden formar complejos con un ion metálico y que pueden ser útiles en las composiciones y métodos de la invención incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, Tex.). Pueden usarse como diana radionúclidos mediante complejación con los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención (Wu et al Nature Biotechnology

23(9): 1137-1146 (2005)). Los reactivos enlazadores, tales como, DOTA-maleimida (4-maleimidobutiramidobencil-DOTA) pueden prepararse mediante la reacción de aminobencil-DOTA con ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con isopropilcloroformato (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807 (2000)). Los reactivos de DOTA-maleimida reaccionan con los anticuerpos con aminoácidos de cisteína libres y proporcionan un ligando de complejación con metales en el anticuerpo (Lewis et al., Bioconj. Chem. 9:72-86 (1998)). Los reactivos de marcaje de enlazador quelante tales como, DOTA-NHS (mono (éster de N-hidroxisuccinimida) del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético se encuentran disponibles comercialmente (Macrocyclics, Dallas, Tex.).

Los conjugados de las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) y citotoxina pueden prepararse de manera rutinaria usando una serie de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales, tales como, 3-(2-piridilditiol) propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoyl) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor biactivos (tales como, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). La toxina puede estar conjugada a un anticuerpo que contiene MRD a través de un sistema de enlazador escindible por enzimas (por ejemplo, tal como, el presente en SGN-35). También pueden usarse conjugados de un anticuerpo que contiene MRD y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como, una caliceamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tengan actividad de toxina, o similares.

El anticuerpo que contiene MRD puede estar complejoado o tener MRD que se unen a otros ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, quimiocinas, citocinas y anticuerpos o fragmentos de los mismos) en donde la molécula resultante se une a la célula neoplásica o a otra diana, así como la quimiocina, citocina o una célula efectora, tal como, un linfocito T. Estos conjugados pueden generarse en forma de proteínas de fusión. Las enzimas de la presente invención pueden unirse covalentemente al anticuerpo mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como, el uso de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales analizados anteriormente. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención, unidas a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención, usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica.

El extremo N-terminal o C-terminal del anticuerpo al que se une operablemente un MRD en las fusiones de MRD-anticuerpo puede estar truncado. Este truncamiento puede no prevenir o reducir la capacidad del anticuerpo para unirse a su antígeno diana a través de su dominio de unión a antígeno. El truncamiento puede no prevenir o reducir la función efectora de Fc, la semivida y/o la actividad de ADCC. Los MRD pueden estar unidos en la región terminal de la cadena de anticuerpo. Más particularmente, el MRD puede estar unido a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 restos del aminoácido C-terminal de la cadena pesada. El MRD puede estar unido a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 restos del aminoácido C-terminal de la cadena ligera. El MRD puede estar unido a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 restos del aminoácido N-terminal de la cadena pesada. El MRD puede estar unido a una distancia de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 restos del aminoácido N-terminal de la cadena ligera. Por lo tanto, por ejemplo, un MRD que está unido al extremo N-terminal de la cadena pesada puede estar unido al primer, segundo, tercero, cuarto, quinto o décimo aminoácido de la cadena N-terminal de la cadena pesada. Por ejemplo, una fusión de MRD-anticuerpo que contiene un MRD unido al extremo N-terminal de la cadena pesada puede contener los aminoácidos 1-3 de la secuencia de cadena pesada unida al MRD, que está unido al aminoácido 4 de la secuencia de cadena pesada.

Pueden unirse uno o más MRD a un anticuerpo en ubicaciones distintas a los extremos de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. El MRD puede estar unido a cualquier porción del anticuerpo que no impida la capacidad del anticuerpo para unirse a su diana. Por lo tanto, el MRD puede estar ubicado fuera del sitio de combinación del anticuerpo. Por ejemplo, el MRD puede estar ubicado dentro de una secuencia de cadena pesada o dentro de una secuencia de cadena ligera. Únicamente a modo de ejemplo, el MRD puede estar ubicado entre el dominio Fc y la región bisagra, entre la región bisagra y el dominio CH1 de la cadena pesada, entre el dominio CH1 y la región variable de la cadena pesada o entre la región constante y la región variable de la cadena ligera.

Se ha observado que los inhibidores de la angiogénesis que actúan de manera selectiva sobre el factor de crecimiento proporcionan en los mejores casos beneficios terapéuticos transitorios seguidos de la restauración del crecimiento tumoral y la progresión causada por una capacidad aparente de adaptación de estos. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que las propiedades multivalentes y multiespecíficas de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a una diana de la angiogénesis proporcionan estos compuestos con una capacidad para prolongar los beneficios más allá de los observados mediante, por ejemplo, las terapias de anticuerpo monoclonal convencionales, mediante la unión a múltiples dianas distintas relacionadas con la angiogénesis y de este modo alteran los mecanismos de resistencia al desmembramiento.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas seleccionadas entre: VEGF (es decir, VEGFA), VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TIE2, TNFSF2 (TNFa), FGFR3, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL6, IL8, IL18, HGF, PDGFA, PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Notch 1, DLL4, EGFL7, $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha v\beta 3$ integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAUI, VCAM1, PDGFRA u PDGFRB. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a VEGF y a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser bevacizumab. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a VEGF y a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la divulgación. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser bevacizumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF (es decir, VEGFA) y además puede unirse a una diana angiogénica seleccionada entre: VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-MIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TNFSF2 (TNFa), FGFR3, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL-6, IL-8, IL-18, HGF, TIE2, PDGFA, P1GF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Notch 1, DLL4, EGFL7, $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha v\beta 3$ integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAUI, VCAM1, PDGFRA u PDGFRB. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a VEGF y a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser bevacizumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de VEGF a bevacizumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF alfa y además, puede unirse a una diana seleccionada entre: Te38, IL-12, IL-12p40, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-1beta, IL-23, MIF, PEG2, PGE4, VEGF, TNFSF11 (RANKL), TNFSF13B (BLYS), GP130, CD-22 y CTLA-4. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF alfa, IL6 y TNFSF13B (BLYS). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a TNF y a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser adalimumab, certolizumab, golimumab o AME-527. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de TNF a adalimumab, certolizumab, golimumab o AME-527.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL1 alfa e IL1 beta. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL1 beta y TNFSF11 (RANKL). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL1 beta y a una diana seleccionada entre IL13, IL17A, TNF, VEGF, PGE2, VEGFR1, VEGFR2, TNFSF12 (TWEAK) y TNF. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a IL1 beta y a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL1 beta. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser catumaxomab, Xoma052, canakinumab o ACZ885. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de IL1 alfa o IL1 beta a catumaxomab, Xoma052, canakinumab o ACZ885.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL12. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL12 además unirse a IL18 o TNFSF12 (TWEAK). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CTLA-4 y a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CTLA-4. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD es briakinumab o ustekinumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de IL12 a briakinumab o ustekinumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CTLA-4. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CTLA4 y además unirse a PDL-1 o BTO2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CTLA-4 y a una o ambas de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CTLA-4. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser tremelimumab o ipilimumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de CTLA-4 a tremelimumab o ipilimumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL13. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL13 y además, puede unirse a una diana seleccionada entre: IL1beta, IL4, IL9, IL13, IL25, un agonista de LHR, MDC, MIF, PED2, SPRR2a, SPRR2b; TARC, TGF-beta e IL25. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL13 y a una diana seleccionada entre IL5, ADAM8, un LHR (agonista), IL23p19 e IgE. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a IL13 y al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de

estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL13. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser TNX-650, lebrizumab o CAT354. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de IL13 a TNX-650, lebrizumab o CAT354.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a RGM A. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a RGM A y además, puede unirse a una diana seleccionada entre: RGM B, MAG, NgR, NogoA, OMGP y CSPGs. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a RGM A y a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a RGM A.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD38 y además, puede unirse a una diana seleccionada entre CD20, TNFRSF5 (CD40) ALK1, TNF, VEGF, VEGFA, VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TNFSF2 (TNFa), FGFR3, VEGFR1, VEGFR2 y CD138. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CD38 y a al menos 1, 2 o las 3 de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD38. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a MOR202 o daratumumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de CD38 a MOR202 o daratumumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB1 (EGFR) y además, puede unirse a ErbB3. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB1. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD es ERBITUX®. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB1 a ERBITUX®. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a ErbB1 seleccionado entre: nimotuzumab, zalutumumab, matuzumab, panitumumab, MEDX-214 y ABX-EGF. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB1 a un anticuerpo seleccionado entre: nimotuzumab, zalutumumab, matuzumab, panitumumab, MEDX-214 y ABX-EGF.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y a IGF1R. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2, Ang2 e IGF1R. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser HuMax-Her2™ o trastuzumab-DM1. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser trastuzumab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB2 a trastuzumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y además, se une a una diana seleccionada entre: ErbB3, EGFR, IGF1R, cMet, VEGF, RON (MST1R), DLL4, PLGF, CDCP1 (CD318), NRP1, TNFRSF10A (DR4) y TNFRSF10B (DR5). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y además, puede unirse a una diana seleccionada entre: CD2, CD3, CD4 y NKG2D. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 e IGF1, IGF2 o IGF1.2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a ErbB2 y además se unen a 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser HuMax-Her2™ o trastuzumab-DM1. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser trastuzumab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB2 a trastuzumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y además, puede unirse a ErbB3. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser HuMax-Her2™ o trastuzumab-DM1. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser trastuzumab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB2 a trastuzumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser un anticuerpo de unión a ErbB2 seleccionado entre: MDX-210 (Medarex), tgDCC-E1A (Targeted Genetics), MGAH22 (MacroGenics) y pertuzumab (OMNITARG™). El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de ErbB2 a un anticuerpo seleccionado entre: MDX-210, tgDCC-E1A, MGAH22 y pertuzumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y a HER2/3. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y a HER2/3 de manera simultánea.

Se ha observado que los inhibidores de la angiogénesis que actúan de manera selectiva sobre el factor de crecimiento proporcionan en los mejores casos beneficios terapéuticos transitorios seguidos de la restauración del crecimiento tumoral y la progresión causada por una capacidad aparente de adaptación de estos. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que las propiedades multivalentes y multiespecíficas de los anticuerpos que contienen MRD que se unen a una diana de la angiogénesis proporcionan estos compuestos con una capacidad para prolongar los beneficios más allá de los observados mediante, por ejemplo, las terapias de anticuerpo

monoclonal convencionales, mediante la unión a múltiples dianas distintas relacionadas con la angiogénesis y de este modo alteran los mecanismos de resistencia al desmembramiento.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a PDGFRA y además, puede unirse a una diana seleccionada entre: VEGFA, VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TNFSF2 (TNFa), FGFR3, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL6, IL8, IL18, IGF1, IGF2, IGF1.2, HGF, TIE2, PDGFA, PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, EGFR, cMET, Notch 1, DLL4, EGFL7, $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha v\beta 3$ integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAUI, VCAM1 y PDGFRB. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a PDGFRA y se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a PDGFRA. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser olaratumab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de PDGFRA a olaratumab. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser MEDI-575. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de PDGFRA a MEDI-575.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a PDGFRB y además, puede unirse a una diana seleccionada entre: VEGFA, VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TNFSF2 (TNFa), FGFR3, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL6, IL8, IL18, IGF1, IGF2, IGF1.2, HGF, TIE2, PDGFA, PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, EGFR, cMET, Notch 1, DLL4, EGFL7, $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha v\beta 3$ integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAUI, VCAM1 y PDGFRA. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a PDGFRB y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a PDGFRB.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGFR1 y además, puede unirse a una diana angiogénica seleccionada entre: VEGF (es decir, VEGFA), VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TNFSF2 (TNFa), FGFR3, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL6, IL8, IL18, HGF, PDGFA, PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR2, VEGFR3, Notch 1, DLL4, EGFL7, $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha v\beta 3$ integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAUI, VCAM1, PDGFRA u PDGFRB. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a VEGFR1 y que además se unen a 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGFR1. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser IMC-18F1. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de VEGFR1 a IMC-18F1.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGFR2 y además, puede unirse a una diana seleccionada entre: VEGF (es decir, VEGFA), VEGFB, FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, TNFSF2 (TNFa), FGFR3, NRP1, ROBO4, CD30, CD33, CD55, CD80, KIT, CXCL12, Notch1EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL6, IL8, IL18, HGF, PDGFA, PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR3, Notch 1, DLL4, EGFL7, $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha v\beta 3$ integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAUI, VCAM1, PDGFRA u PDGFRB. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a VEGFR2 y que además se unen a 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la divulgación. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGFR2. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser IMC-1C11 DC101. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de VEGFR2 a IMC-1C11 o DC101.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGFR2 y además unirse a ANG2 o TIE2. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGFR2. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser IMC-1C11, DC101 o TTAC-0001. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de VEGFR2 a IMC-1C11, DC101 o TTAC-0001. El componente de unión a TIE2 puede comprender un fragmento de ANG2 que se une a TIE2. El componente de unión a TIE2 puede comprender los aminoácidos 283-449 de la ANG2 divulgada en la Referencia de Secuencia del NCBI n.º NP_001138.1.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a DLL4 y además, puede unirse a una diana seleccionada entre: EGFR, PLGF, VEGFR1, VEGFR2 y VEGF. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a DLL4 y al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser REGN421. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de DLL4 a REGN421.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana anti-angiogénica y a una de cáncer metastásico o invasivo. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana angiogénica y también puede unirse a una diana de cáncer metastásico o invasivo seleccionada entre: CXCL12, CXCR4 (por ejemplo, CXCR4b), CCR7 (por ejemplo, CXCR7b), CD44 (por ejemplo, CD44v3 y CD44v6), $\alpha 2\beta 1$ integrina, $\alpha 4\beta 1$ integrina, $\alpha 5\beta 1$ integrina, $\alpha \nu\beta 1$ integrina, $\alpha \nu\beta 3$ integrina, TGF β , $\alpha \nu\beta 5$ integrina, $\alpha 9\beta 1$ integrina, $\alpha 6\beta 4$ integrina, $\alpha M\beta 2$ integrina, PD-1, HGF, cMET, MMP2, MMP-7, MMP-9, MMP-12, VEGFA, VEGFB e IGF1. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a una diana angiogénica y que también se unen a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas de cáncer metastásico o invasivo también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a VEGF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser bevacizumab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de VEGF a bevacizumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con distintas vías de señalización celular. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con vías de señalización redundantes, solapantes o intercomunicadas. Por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de PI3K/AKT/mTOR (por ejemplo, ErbB2, EGFR, IGF1R, Notch, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIB y FGFR2-IIIB), FGFR3, FGFR4, GPCR y/o c-MET). La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de tirosina receptora Raf/MEK/MAPK (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIB y FGFR2-IIIB), FGFR3, FGFR4, CD28, RET, cMET, EGFR, ErbB2, Notch, Notch1, Notch3, Notch4, DLL1, DLL4, Jagged, Jagged1, Jagged2 y Jagged3. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de SMAD (por ejemplo, Notch, TGF β , TGF β R1, TGF β R2 y BMP). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de JAK/STAT (por ejemplo, IFN γ R1, IFN γ R3, IFN γ , IFN-AR2, IFN-AR1, IFN alfa, IFN beta, receptor de IL6a (GP130), IL6, IL12RB1, IL12 y EGFR). Por lo tanto, la invención abarca un anticuerpo que contiene MRD que se une a 2 o más dianas seleccionadas entre WNT1, WNT2, WNT2b, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, FZD1, FZD2, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, Notch, Notch1, Notch3, Notch4, DLL1, DLL4, Jagged, Jagged1, Jagged2 y Jagged3. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de NF κ B (por ejemplo, BCR, TCR, IL1R, IL1, FZD1, FZD2, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, Notch, Notch1, Notch3, Notch4, DLL4, Jagged, Jagged1, Jagged2, Jagged3, TNFRSF1 (TNF β , LTa), TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFRSF6 (ligando de Fas), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF6B (DcR3), TNFRSF7 (ligando de CD27, CD70), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (ligando de CD30), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF11 (RANKL), TNFRSF11A (RANK), TNFRSF12 (TWEAK), TNFRSF12 (TWEAKR), TNFRSF13 (APRIL), TNFRSF13B (BLYS), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFRSF15 (TL1A), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF19 (TROY), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF25 (DR3), TNFRSF5 (ligando de CD40), TNFRSF5 (CD40), TNFRSF2 (TNF α), TNFRSF3 (LT β), TNFRSF3 (LTBR), TNFRSF14 (LIGHT, ligando de HVEM), TNFRSF14 (HVEM), TNFRSF18 (ligando de GITR), TNFRSF18 (GITR), TNFRSF4 (ligando de OX40), TNFRSF4 (OX40), TNFRSF9 (ligando de 41BB), TNFRSF9 (41BB) y BMP, NGF y TGF alfa). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la proliferación celular (por ejemplo, FGF1, FGF2, FGF7, FGF4, FGF10, FGF18b, FGF19, FGF23, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR1IIB y FGFR-IIIC), FGFR3, FGFR4, TCR, TNFRSF5 (CD40), TLR1, TLR2, TLR3, TLR 4, TLR5 y TLR6). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de receptor de tipo toll (por ejemplo, TLR1, TLR2, TLR3, TLR 4, TLR5 y TLR6).

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de linfocitos B (por ejemplo, mlg, heterodímeros de Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) (α / β), CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD27, CD30, CD46, CD80, CD86, ICOSL (B7-H2), HLA-DR (CD74), PD1, PDL1, TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFRSF17 (BCMA), BTLA, TNFRSF5 (CD40), TLR4, TNFRSF14 (HVEM), Fc gamma RIIB, IL4R y CRAC. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD19 e CD20.

El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD19, CD20 y CD22. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 1 o más marcadores de la superficie de linfocitos B seleccionados entre: CD10, CD24, CD37, CD53, CD72, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD81, CD82, CD83, CD84 (SLAMF5) y CD85. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 1 o más marcadores de la superficie de linfocitos B seleccionados entre: CD10, CD24, CD37, CD53, CD72, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD81, CD82, CD83, CD84 (SLAMF5) y CD85. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estos marcadores de la superficie de linfocitos B.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD19 y a una diana seleccionada entre: CD20, CD22, CD30, CD33, TNFRSF5 (CD40), CD52, CD74, CD80, CD138, VEGFR1, VEGFR2, EGFR, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), TNF, NGF, VEGF, IGF1.2, IGF2, IGF1 y TNFSF11 (RANKL). Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD20 y a una diana seleccionada entre: CD3, CD4 y NKG2D. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CD19 y que también se unen a al menos 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD19. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser MDX-1342, SGN-CD19A, XMAB@5574, SGN-19A, ASG-5ME o MEDI-551. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de CD19 a MDX-1342, SGN-CD19A, XMAB@5574, SGN-19A, ASG-5ME o MEDI-551.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD22 y a una diana seleccionada entre: CD19, CD20, CD23, CD30, CD33, TNFRSF5 (CD40), CD52, CD74, CD80, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), VEGF, TNF y NGF. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD22 y a una diana seleccionada entre: CD3, CD4 y NKG2D. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CD22 y que también se unen a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD22. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser epratuzumab o inotuzumab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de CD22 a epratuzumab o inotuzumab.

El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser moxetumomab (CAT-8015, Cambridge Antibody Technologies). El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de CD22 a moxetumomab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNFRSF5 (CD40) y a una diana seleccionada entre: BCMA, TNFSF11 (RANKL), VEGFR1, VEGFR2, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), CD22, CD30, CD38, CD56 (NCAM), CD70, CD80, CD138, IL6, IGF1, IGF2, IGF1.2, BlyS, APRIL y NGF. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD40 y a una diana seleccionada entre: CD3, CD4 y NKG2D. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CD40 y también se unen a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD40. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser CP870893, dacetuzumab, ANTOVA®, lucatumumab, XMAB@5485 o teneliximab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de CD40 a CP870893, dacetuzumab, ANTOVA®, lucatumumab, XMAB@5485 o teneliximab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD33 y a una diana seleccionada entre: FLT3, CD44, TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5), CD80, MGC, VEGFR1, VEGFR2, IL1, IL6, TNF y VEGF. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a TNFRSF10B y que también se unen a al menos 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la divulgación. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD33. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser gemtuzumab o lintuzumab. El componente de anticuerpo, el componente de MRD y/o el anticuerpo que contiene MRD puede competir por la unión de CD33 a gemtuzumab o lintuzumab.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de células presentadoras de antígeno (por ejemplo, mlg, heterodímeros de Igα/Igβ (CD79a/CD79b) (α/β), CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD27, CD28, CD30, CD30L, TNFSF14 (LIGHT, ligando de HVEM), CD70, ICOS, ICOSL (B7-H2), CTLA4, PD-1, PDL1 (B7-H1), B7-H4, B7-H3, PDL2 (B7-DC), BTLA, CD46, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), HLA-DR, CD74, PD1, TNFRSF4 (OX40), TNFRSF9 (41BB), TNFSF4 (ligando de OX40), TNFSF9 (ligando de 41BB), TNFRSF9 (41BB), TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFRSF17 (BCMA), BTLA, TNFRSF18 (GITR), MHC-1, TNFRSF5 (CD40), TLR4, TNFRSF14 (HVEM), FcγRIIb, IL4R y CRAC). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a 2 o más dianas asociadas con la señalización de receptores de linfocitos T (por ejemplo, CD3, CD4, CD27, CD28, CD70, IL2R, LFA-1, C4, ICOS, CTLA-4, CD45, CD80, CD86, PG-1, TIM1, TIM2, TIM3, TIM4, galectina 9, TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFRSF21 (DR6),

TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF25 (DR3), TNFRSF14 (HVEM), TNFSF18, TNFRSF18 (GITR), TNFRSF4 (OX40), TNFSF4 (ligando de OX40), PD1, PDL1, CTLA4, TNFSF9 (ligando de 41BB), TNFRSF9 (41BB), TNFSF14 (LIGHT, ligando de HVEM), TNFSF5 (ligando de CD40), BTLA y CRAC). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana terapéutica y a una segunda diana que está asociada con una vía de escape para resistir al efecto terapéutico resultante del uso como diana de la diana terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a EGFR y a una diana seleccionada entre MDR1, cMET, Notch, Notch1, Notch3, Notch4, DLL1, DLL4, Jagged, Jagged1, Jagged2 y Jagged3. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede unirse a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas.

El anticuerpo que contiene MRD puede actuar de manera selectiva sobre ErbB2 y un factor angiogénico. El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a ErbB2 e IGF1R. El anticuerpo puede dirigirse a ErbB2 y al menos un MRD puede dirigirse a un factor angiogénico y/o IGF1R. Un anticuerpo que se une al mismo epítipo de ErbB2 que trastuzumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico y/o a IGF1R. Un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión a trastuzumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico y/o a IGF1R. Un anticuerpo que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 59-64 puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico y/o a IGF1R. El anticuerpo trastuzumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico y/o a IGF1R.

Un anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2. El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD de unión a Ang2 que se une al mismo epítipo de Ang2 que el MRD que comprende la secuencia de MGAQTNFMPMDNDELLLYEQFILQQGLE SEQ ID NO: 8. El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD de unión a Ang2 que inhibe de manera competitiva a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8.

Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2.

Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a ErbB2 a través de un enlazador.

Un anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a IGF1R. El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD de unión a IGF1R que se une al mismo epítipo de IGF1R que el MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14. El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD de unión a IGF1R que inhibe de manera competitiva a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14. El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14. El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD que codifica la secuencia SLFVPRPERK (SEQ ID NO: 103). El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD que codifica la secuencia ESDVLHFTST (SEQ ID NO: 104). El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD que codifica la secuencia LRKYADGTL (SEQ ID NO: 105).

Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2.

Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a ErbB2 a través de un enlazador.

Un anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a ErbB2 y a HER2/3. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y a HER2/3 de manera simultánea. Un anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a HER2/3. Al menos un MRD de unión a HER2/3 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a HER2/3 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo

que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a HER2/3 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a HER2/3 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2.

- 5 Al menos un MRD de unión a HER2/3 puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a ErbB2. Al menos un MRD de unión a HER2/3 puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a ErbB2 a través de un enlazador.

- 10 Un anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a ErbB2 y a HER2/3. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a ErbB2 y a HER2/3 de manera simultánea. Un anticuerpo que se une a HER2/3 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a ErbB2. Al menos un MRD de unión a ErbB2 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a HER2/3. Al menos un MRD de unión a ErbB2 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a HER2/3. Al menos un MRD de unión a ErbB2 está unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a HER2/3. Al menos un MRD de unión a ErbB2 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a HER2/3.

- Al menos un MRD de unión a ErbB2 puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a HER2/3. Al menos un MRD de unión a ErbB2 puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a HER2/3 a través de un enlazador.

- El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a ErbB2, Ang2 e IGF1R. El anticuerpo que contiene MRD puede comprender un anticuerpo que se dirige a ErbB2, un MRD que se dirige a Ang2 y un MRD que se dirige a IGF1R. Los MRD de Ang2 e IGF1R pueden estar unidos a la misma ubicación en el anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2 e IGF1R pueden estar unidos a diferentes ubicaciones en el anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2 e IGF1R pueden estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2 e IGF1R pueden estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para Ang2 puede estar en la cadena ligera del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de IGF1R puede estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para Ang2 puede estar en la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de IGF1R puede estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para Ang2 puede estar en el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de IGF1R puede estar en el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para IGF1R puede estar en el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de Ang2 puede estar en el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un anticuerpo que se dirige a Ang2, un MRD que se dirige a ErbB2 y un MRD que se dirige a IGF1R; y las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un anticuerpo que se dirige a IGF1R, un MRD que se dirige a ErbB2 y un MRD que se dirige a Ang2 también están abarcadas por la invención.

- El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a ErbB2, Ang2 y HER2/3. El anticuerpo que contiene MRD puede comprender un anticuerpo que se dirige a ErbB2, un MRD que se dirige a Ang2 y un MRD que se dirige a HER2/3. Los MRD de Ang2 HER2/3 pueden estar unidos a la misma ubicación en el anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2 HER2/3 pueden estar unidos a diferentes ubicaciones en el anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2 HER2/3 pueden estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2 HER2/3 pueden estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para Ang2 puede estar en la cadena ligera del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de HER2/3 puede estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para Ang2 puede estar en la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de HER2/3 puede estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para Ang2 puede estar en el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de HER2/3 puede estar en el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para HER2/3 puede estar en el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de Ang2 puede estar en el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un anticuerpo que se dirige a HER2/3, un MRD que se dirige a ErbB2 y un MRD que se dirige a Ang2; y las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un anticuerpo que se dirige a Ang2, un MRD que se dirige a ErbB2 y un MRD que se dirige a HER2/3 también están abarcadas por la invención.

- El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a ErbB2, HER2/3 e IGF1R. El anticuerpo que contiene MRD puede comprender un anticuerpo que se dirige a ErbB2, un MRD que se dirige a HER2/3 y un MRD que se dirige a IGF1R. Los MRD de HER2/3 e IGF1R pueden estar unidos a la misma ubicación en el anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de HER2/3 e IGF1R pueden estar unidos a diferentes ubicaciones en el anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de HER2/3 e IGF1R pueden estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de HER2/3 e IGF1R pueden estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para HER2/3 puede estar en la cadena ligera del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de IGF1R puede estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para HER2/3 puede estar en la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de IGF1R puede estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para HER2/3 puede estar en el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2 y el MRD de IGF1R puede estar en el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. El MRD para IGF1R puede estar en el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de ErbB2.

y el MRD de HER2/3 puede estar en el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un anticuerpo que se dirige a HER2/3, un MRD que se dirige a ErbB2 y un MRD que se dirige a IGF1R; y las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un anticuerpo que se dirige a IGF1R, un MRD que se dirige a ErbB2 y un MRD que se dirige a HER2/3 también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a ErbB2, Ang2, HER2/3 e IGF1R. El anticuerpo que contiene MRD puede comprender un anticuerpo que se dirige a ErbB2, un MRD que se dirige a Ang2, un MRD que se dirige a HER2/3 y un MRD que se dirige a IGF1R. Los MRD de Ang2, HER2/3 e IGF1R pueden estar unidos a la misma cadena del anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2, HER2/3 e IGF1R pueden estar unidos a diferentes cadenas del anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2, HER2/3 e IGF1R pueden estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2, HER2/3 e IGF1R pueden estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2, HER2/3 e IGF1R pueden estar unidos al mismo extremo del anticuerpo anti-ErbB2. Los MRD de Ang2, HER2/3 e IGF1R pueden estar unidos a diferentes extremos del anticuerpo anti-ErbB2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden: un anticuerpo que se dirige a HER2/3, un MRD que se dirige a ErbB2, un MRD que se dirige a Ang2 y un MRD que se dirige a IGF1R; las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un anticuerpo que se dirige a Ang2, un MRD que se dirige a ErbB2, un MRD que se dirige a HER2/3 y un MRD que se dirige a IGF1R; y las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un anticuerpo que se dirige a IGF1R, un MRD que se dirige a ErbB2, un MRD que se dirige a HER2/3 y un MRD que se dirige a Ang2 también están abarcadas por la invención.

El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede unirse simultáneamente tanto a ErbB2 como a Ang2. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a un MRD de unión a IGF1R puede unirse simultáneamente tanto a ErbB2 como a IGF1R. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a un MRD de unión a HER2/3 puede unirse simultáneamente tanto a ErbB2 como a HER2/3. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a un MRD para Ang2, un MRD para IGF1R y/o un MRD para HER2/3 puede unirse a ErbB2, Ang2, IGF1R y/o HER2/3 simultáneamente. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a MRD para Ang2, IGF1R y/o HER2/3 puede mostrar actividad ADCC. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a MRD para Ang2, IGF1R y/o HER2/3 puede regular negativamente la señalización de Akt. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede inhibir la unión de Ang2 a TIE2. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a un MRD de unión a IGF1R puede regular negativamente la señalización de IGF1R. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a MRD para Ang2, IGF1R y/o HER2/3 puede inhibir la proliferación celular. El anticuerpo anti-ErbB2 unido operablemente a MRD para Ang2, IGF1R y/o HER2/3 puede inhibir el crecimiento tumoral.

El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a VEGF y a un factor angiogénico. El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a VEGF y a IGF1R. El anticuerpo puede dirigirse a VEGF y al menos un MRD puede dirigirse a un factor angiogénico y/o IGF1R. Un anticuerpo que se une al mismo epítipo de VEGF que bevacizumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico y/o a IGF1R. Un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión a bevacizumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico y/o a IGF1R. Un anticuerpo que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 78-79 puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico y/o a IGF1R. El anticuerpo bevacizumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico y/o a IGF1R.

Un anticuerpo que se une a VEGF puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2. El anticuerpo que se une a VEGF puede estar unido a un MRD de unión a Ang2 que se une al mismo epítipo de Ang2 que el MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. El anticuerpo que se une a VEGF puede estar unido a un MRD de unión a Ang2 que inhibe de manera competitiva a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. El anticuerpo que se une a VEGF puede estar unido a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8.

Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a VEGF. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a VEGF. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a VEGF. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a VEGF.

Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a VEGF. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a VEGF a través de un enlazador.

Un anticuerpo que se une a VEGF puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a IGF1R. El anticuerpo que se une a VEGF puede estar unido a un MRD de unión a IGF1R que se une al mismo epítipo de IGF1R que el MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14. El anticuerpo que se une a VEGF puede estar unido a un

MRD de unión a IGF1R que inhibe de manera competitiva a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14. El anticuerpo que se une a VEGF puede estar unido a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14. El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD que codifica la secuencia SLFVPRPERK (SEQ ID NO: 103). El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD que codifica la secuencia ESDVLHFTST (SEQ ID NO: 104). El anticuerpo que se une a ErbB2 puede estar unido a un MRD que codifica la secuencia LRKYADGTL (SEQ ID NO: 105).

Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a VEGF. Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a VEGF. Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a VEGF. Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a VEGF.

Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a VEGF. Al menos un MRD de unión a IGF1R puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a VEGF a través de un enlazador.

El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a VEGF, Ang2 e IGF1R. El anticuerpo que contiene MRD puede comprender un anticuerpo que se dirige a VEGF, un MRD que se dirige a Ang2 y un MRD que se dirige a IGF1R. Los MRD de Ang2 e IGF1R pueden estar unidos a la misma ubicación en el anticuerpo anti- VEGF. Los MRD de Ang2 e IGF1R pueden estar unidos a diferentes ubicaciones en el anticuerpo anti-VEGF. Los MRD de Ang2 e IGF1R pueden estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-VEGF. Los MRD de Ang2 e IGF1R pueden estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF. El MRD para Ang2 puede estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-VEGF y el MRD de IGF1R puede estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF. El MRD para Ang2 puede estar en la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF y el MRD de IGF1R puede estar en la cadena ligera del anticuerpo anti-VEGF. El MRD para Ang2 puede estar en el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF y el MRD de IGF1R puede estar en el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo anti-VEGF. El MRD para IGF1R puede estar en el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF y el MRD de Ang2 puede estar en el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo anti-VEGF.

El anticuerpo anti-VEGF unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede unirse simultáneamente tanto a anti-VEGF como a Ang2. El anticuerpo anti-VEGF unido operablemente a un MRD de unión a IGF1R puede unirse simultáneamente tanto a anti-VEGF como a IGF1R. El anticuerpo anti-VEGF unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 y a un MRD de unión a IGF1R puede unirse a VEGF, Ang2 e IGF1R simultáneamente. El anticuerpo anti- VEGF unido operablemente a MRD para Ang2 y/o IGF1R puede mostrar actividad ADCC. El anticuerpo anti-VEGF unido operablemente a MRD para Ang2 y/o IGF1R puede regular negativamente la señalización de VEGF. El anticuerpo anti- VEGF unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede inhibir la unión de Ang2 a TIE2. El anticuerpo anti- VEGF unido operablemente a un MRD de unión a IGF1R puede inhibir la señalización de IGF1R. El anticuerpo anti- VEGF unido operablemente a MRD para Ang2 y/o IGF1R puede inhibir la proliferación celular. El anticuerpo anti- VEGF unido operablemente a MRD para Ang2 y/o IGF1R puede inhibir el crecimiento tumoral.

El anticuerpo anti-ErbB2 o el anticuerpo para VEGF pueden contener un MRD que inhibe la unión de pertuzumab a ErbB2. Un anticuerpo anti-ErbB2 puede contener al menos un MRD que se une a Ang2 o IGF1R y un MRD que inhibe la unión de pertuzumab a ErbB2. Un anticuerpo anti-VEGF puede contener al menos un MRD que se une a Ang2 o IGF1R y un MRD que inhibe la unión de pertuzumab a ErbB2. Un anticuerpo anti-ERbB2 puede contener un MRD que se une a Ang2, un MRD que se une a IGF1R y un MRD que inhibe la unión de pertuzumab a ErbB2. Un anticuerpo anti-VEGF puede contener un MRD que se une a Ang2, un MRD que se une a IGF1R y un MRD que inhibe la unión de pertuzumab a ErbB2.

El anticuerpo que contiene MRD puede actuar de manera selectiva sobre TNF y un factor angiogénico. El anticuerpo puede dirigirse a TNF y al menos un MRD se dirige a un factor angiogénico. Un anticuerpo que se une al mismo epítipo de TNF que adalimumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico. Un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión a adalimumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico. Un anticuerpo que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 80-85 puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico. El anticuerpo adalimumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico. Un anticuerpo que se une al mismo epítipo de TNF que golimumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico. Un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión a golimumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico. El anticuerpo golimumab puede estar unido operablemente a al menos un MRD que se dirige a un factor angiogénico.

Un anticuerpo que se une a TNF puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2. El anticuerpo que se une a TNF puede estar unido a un MRD de unión a Ang2 que se une al mismo epítipo de Ang2 que el MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. El anticuerpo que se une a TNF puede estar unido a un MRD de

unión a Ang2 que inhibe de manera competitiva a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. El anticuerpo que se une a TNF puede estar unido a un MRD que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8.

Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a TNF.

Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a Ang2 puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a TNF a través de un enlazador.

El anticuerpo anti-TNF unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede unirse simultáneamente tanto a TNF como a Ang2. El anticuerpo anti-TNF unido operablemente a un de unión a Ang2 puede mostrar actividad ADCC. El anticuerpo anti-TNF unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede inhibir la unión de TNF a los receptores de TNF de la superficie celular p55 y p75. El anticuerpo anti-TNF unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede lisar la superficie de células que expresan TNF *in vitro* en presencia de complemento. El anticuerpo anti-TNF unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede inhibir la unión de Ang2 a TIE2. El anticuerpo anti-TNF unido operablemente a un MRD de unión a Ang2 puede reducir los signos y los síntomas de la artritis.

El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a TNF e IL6. El anticuerpo que contiene MRD puede ser capaz de unirse simultáneamente a TNF e IL6. Por lo tanto, un anticuerpo que se une a TNF puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a IL6. Un anticuerpo que se une a IL6 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a TNF.

Al menos un MRD de unión a IL6 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a IL6 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a IL6 puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a IL6 puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a TNF.

Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a IL6. Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a IL6. Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a IL6. Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a IL6.

Al menos un MRD de unión a IL6 puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a IL6 puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a TNF a través de un enlazador.

Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a IL6. Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a IL6 a través de un enlazador.

El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a TNF y BLYS. El anticuerpo que contiene MRD puede ser capaz de unirse simultáneamente a TNF y BLYS. Un anticuerpo que se une a TNF puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a BLYS. Un anticuerpo que se une a BLYS puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a TNF.

Al menos un MRD de unión a BLYS puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a BLYS puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a BLYS puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a BLYS puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a TNF.

Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a BLYS. Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a BLYS. Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente al extremo C-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a BLYS. Al menos

un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo que se une a BLYS.

Al menos un MRD de unión a BLYS puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a TNF. Al menos un MRD de unión a BLYS puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a TNF a través de un enlazador.

Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente de manera directa a un anticuerpo que se une a BLYS. Al menos un MRD de unión a TNF puede estar unido operablemente a un anticuerpo que se une a BLYS a través de un enlazador.

El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a Ang2, TNF e IL6. El anticuerpo que contiene MRD puede ser capaz de unirse a Ang2, TNF e IL6 de manera simultánea. Un anticuerpo que se une a TNF puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2 y a un MRD que se dirige a IL6. Los MRD de unión a Ang2 e IL6 pueden estar ubicados en la misma cadena de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2 e IL6 pueden estar ubicados en el mismo extremo de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2 e IL6 pueden estar ubicados en diferentes cadenas de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2 e IL6 pueden estar ubicados en diferentes extremos de anticuerpo.

Un anticuerpo que se une a Ang2 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a TNF y a un MRD que se dirige a IL6. Los MRD de unión a TNF e IL6 pueden estar ubicados en la misma cadena de anticuerpo. Los MRD de unión a TNF e IL6 pueden estar ubicados en el mismo extremo de anticuerpo. Los MRD de unión a TNF e IL6 pueden estar ubicados en diferentes cadenas de anticuerpo. Los MRD de unión a TNF e IL6 pueden estar ubicados en diferentes extremos de anticuerpo.

Un anticuerpo que se une a IL6 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2 y a un MRD que se dirige a TNF. Los MRD de unión a Ang2 y TNF pueden estar ubicados en la misma cadena de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2 y TNF pueden estar ubicados en el mismo extremo de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2 y TNF pueden estar ubicados en diferentes cadenas de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2 y TNF pueden estar ubicados en diferentes extremos de anticuerpo.

El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a Ang2, TNF y BLYS. El anticuerpo que contiene MRD puede ser capaz de unirse a Ang2, TNF y BLYS de manera simultánea. Un anticuerpo que se une a TNF puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2 y a un MRD que se dirige a BLYS. Un anticuerpo que se une a BLYS puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a TNF y a un MRD que se dirige a Ang2. Un anticuerpo que se une a Ang2 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a TNF y a un MRD que se dirige a BLYS. Los MRD de unión a Ang2, BLYS y/o TNF pueden estar ubicados en la misma cadena de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2, BLYS y/o TNF pueden estar ubicados en el mismo extremo de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2, BLYS y/o TNF pueden estar ubicados en diferentes cadenas de anticuerpo. Los MRD de unión a Ang2, BLYS y/o TNF pueden estar ubicados en diferentes extremos de anticuerpo.

El anticuerpo que contiene MRD puede dirigirse a Ang2, TNF, IL6 y BLYS. El anticuerpo que contiene MRD puede ser capaz de unirse a Ang2, TNF, IL6 y BLYS de manera simultánea. Un anticuerpo que se une a TNF puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2, un MRD que se dirige a IL6 y un MRD que se dirige a BLYS. Un anticuerpo que se une a Ang2 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a TNF, un MRD que se dirige a IL6 y un MRD que se dirige a BLYS. Un anticuerpo que se une a IL6 puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2, un MRD que se dirige a TNF y un MRD que se dirige a BLYS. Un anticuerpo que se une a BLYS puede estar unido operablemente a un MRD que se dirige a Ang2, un MRD que se dirige a IL6 y un MRD que se dirige a TNF. Los MRD de unión a TNF, Ang2, IL6 y/o BLYS pueden estar ubicados en la misma cadena de anticuerpo. Los MRD de unión a TNF, Ang2, IL6 y/o BLYS pueden estar ubicados en el mismo extremo de anticuerpo. Los MRD de unión a TNF, Ang2, IL6 y/o BLYS pueden estar ubicados en diferentes cadenas de anticuerpo. Los MRD de unión a TNF, Ang2, IL6 y/o BLYS pueden estar ubicados en diferentes extremos de anticuerpo.

VI. Métodos para producir fusiones de anticuerpo-MRD

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) y los MRD pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, polipéptidos, inmunocójugados y citotoxinas, en particular, mediante técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. Una ventaja de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) es que pueden producirse usando protocolos que se conocen en la técnica para producir anticuerpos. Las moléculas de fusión de anticuerpo-MRD pueden estar codificadas por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos. Por lo tanto, los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden codificar un MRD, una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, una proteína de fusión que comprende una cadena pesada de anticuerpo y al menos un MRD y/o una proteína de fusión que comprende una cadena ligera de anticuerpo y al menos un MRD.

Por consiguiente, la divulgación proporciona construcciones de vector que comprenden secuencias de polinucleótido que codifican composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) y una célula hospedadora que comprende estas construcciones de vector. Pueden usarse técnicas convencionales de clonación y transformación en la preparación de líneas celulares que expresan las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) de la invención.

Los vectores de expresión recombinantes que contienen secuencias de polinucleótido que codifican composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) de la invención pueden prepararse usando técnicas bien conocidas. Los vectores de expresión incluyen un polinucleótido que codifica una secuencia unida operablemente a secuencias de nucleótidos reguladoras transcripcionales o traduccionales, tales como, aquellas procedentes de genes de mamífero, microbianos, víricos o de insecto. Las secuencias reguladoras ejemplares presentes en las construcciones de vector de expresión incluyen promotores transcripcionales, operadores, potenciadores, sitios de unión ribosómicos de ARNm y/u otras secuencias adecuadas que controlan la transcripción y el inicio y la terminación de la traducción. Las secuencias de nucleótidos se encuentran "unidas operativamente" cuando la secuencia reguladora está relacionada funcionalmente con la secuencia de nucleótidos para el polipéptido adecuado. Por lo tanto, una secuencia promotora está unida operablemente a, por ejemplo, una secuencia de cadena pesada de anticuerpo-MRD en caso de que la secuencia de nucleótidos del promotor controle la transcripción de la secuencia de nucleótidos adecuada.

La secuencia de polinucleótido codificante en el vector de expresión puede incluir secuencias heterólogas adicionales que codifican polipéptidos, tales como, péptidos de señal que no están asociados de manera natural con las secuencias de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido de señal (líder de secreción) puede fusionarse en fase a la secuencia de polipéptido, de tal forma que el anticuerpo que contiene MRD se secreta del espacio periplásmico al medio. Un péptido de señal que es funcional en las células hospedadoras previstas potencia la secreción extracelular del anticuerpo adecuado. El péptido de señal puede escindirse del polipéptido tras la secreción del anticuerpo por la célula. Los ejemplos de secuencia que codifican señales secretoras que pueden incluirse en los vectores de expresión incluyen aquellas descritas en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.698.435, 5.698.417 y 6.204.023.

Puede utilizarse una serie de sistemas de vector de expresión para expresar la secuencia codificante de un anticuerpo que contiene MRD.

Las células hospedadoras útiles en la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como, bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plásmido o ADN cósmido que contienen secuencias de codificación de anticuerpo; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión en levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo que contiene MRD. Pueden usarse los sistemas de células de mamífero para producir las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD). Los sistemas de células de mamífero utilizan normalmente construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores procedentes del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero útiles para producir las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención incluyen, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6, células COS, células 293, células 3T3 y células de hibridoma.

Los vectores que contienen los polinucleótidos que codifican las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) o porciones o fragmentos de los mismos, incluyen vectores plasmídicos, vectores de fago mono y bicatenarios, así como vectores víricos de ARN o ADN mono y bicatenario. Los vectores pueden introducirse de manera rutinaria en células hospedadoras usando técnicas conocidas para introducir ARN y ADN en las células. Los vectores de fago y víricos también pueden introducirse en células hospedadoras en forma de virus empaquetado o encapsulado usando técnicas conocidas para la infección y transducción. Además, los vectores víricos pueden ser competentes para la replicación o como alternativa, defectuosos para la replicación. Como alternativa, también pueden usarse sistemas de traducción sin células para producir la proteína usando ARN procedentes de las construcciones de expresión de ADN de la divulgación (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud Internacional WO86/05807 y WO89/01036; y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.122.464).

Asimismo, en el presente documento se describen métodos para producir un anticuerpo que contiene MRD, comprendiendo el método: cultivar una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos o un vector de expresión que comprende uno o más polinucleótidos aislados en un medio en condiciones que permiten la expresión

de dichos uno o más polinucleótidos, en donde dichos uno o más polinucleótidos codifican uno o más polipéptidos que forman parte de un anticuerpo que contiene MRD; y recuperar dicho anticuerpo que contiene MRD.

Los procariotas útiles como células hospedadoras en la producción de composiciones de la invención (por ejemplo, MRD) incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, tales como, *E. coli* y *B. subtilis*. Los vectores de expresión para su uso en células hospedadoras contienen generalmente uno o más genes marcadores de selección fenotípica (por ejemplo, genes que codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos o que suministran un requisito autótrofo). Los ejemplos de vectores de expresión en procariotas útiles incluyen los vectores de la serie pKK223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega, Wis., EE. UU.), pET (Novagen, Wis., EE. UU.) y pRSET (Invitrogen, Calif., EE. UU.) (véase, por ejemplo, Studier, J. Mol. Biol. 219:37 (1991) y Schoepfer, Gene 124:83 (1993)). Las secuencias promotoras normalmente usadas en los vectores de expresión en células hospedadoras procariotas incluyen T7, (Rosenberg et al., Gene 56: 125-135 (1987)), beta-lactamasa (penicilinas), el sistema de promotor de lactosa (Chang et al., Nature 275:615 (1978)); y Goeddel et al., Nature 281:544 (1979)), el sistema de promotor de triptófano (trp) (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, (1980)) y el promotor tac (Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Pueden usarse sistemas de células hospedadoras eucariotas, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de un anticuerpo que contiene MRD de la presente invención, tal como, los sistemas de expresión enseñados en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos n.º 60/344.169 y WO03/056914 (métodos para producir glucoproteína similar a humana en una célula hospedadora eucariota no humana). Las levaduras ejemplares que pueden usarse para producir composiciones de la invención, tal como, los MRD, incluyen levaduras del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces* y *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contienen típicamente una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levadura 2mu, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción y un gen marcador de selección. Los ejemplos de secuencias promotoras en las construcciones de expresión en levadura incluyen, promotores de metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, (1980)) y otras enzimas glucolíticas, tal como, enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Se conocen en la técnica vectores y promotores adecuados adicionales para su uso en la expresión en levadura, así como protocolos de transformación en levaduras. Véase, por ejemplo, Fleer et al., Gene, 107:285-195 (1991) y Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75:1929 (1978).

También son útiles para producir las composiciones de la invención sistemas de cultivo de células hospedadoras de insectos y vegetales. Dichos sistemas de células hospedadoras incluyen, por ejemplo, sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen la secuencia codificante de un anticuerpo que contiene MRD; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen la secuencia codificante de un anticuerpo que contiene MRD, incluyendo, pero sin limitación, los sistemas de expresión enseñados en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.815.184, WO2004/057002, WO2004/024927, las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos n.º 60/365.769, 60/368.047 y WO2003/078614.

Pueden usarse otros sistemas de células hospedadoras eucariotas, incluyendo sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, adenovirus, virus vaccinia) incluyendo líneas celulares modificadas para que contengan múltiples copias del ADN que codifica un anticuerpo que contiene MRD ya se encuentre amplificado de manera estable (CHO/dhfr) o amplificado de manera inestable en cromosomas diminutos dobles (por ejemplo, líneas celulares murinas). El vector que comprende los polinucleótidos que codifican el anticuerpo que contiene MRD de la invención puede ser policistrónico.

Las células de mamífero ejemplares útiles para producir estas composiciones incluyen células 293 (por ejemplo, 293T y 293F), células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 (Crucell, Países bajos) o células de hibridoma, otras células de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero adicionales que son útiles en la práctica de la divulgación incluyen, pero sin limitación, células VERY, Hela, COS, MDCK, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, CRL7030 y HsS78Bst. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y métodos de selección se describen en las siguientes referencias y las referencias citadas en las mismas: Borth et al., Biotechnol. Bioen. 71(4):266-73 (2000-2001), en Werner et al., Arzneimittelforschung/Drug Res. 48(8):870-80 (1998), en Andersen y Krummen, Curr. Op. Biotechnol. 13:117-123 (2002), en Chadd y Chamow, Curr. Op. Biotechnol. 12:188-194 (2001), y en Giddings, Curr. Op. Biotechnol. 12: 450-454 (2001). Los ejemplos adicionales de sistemas de expresión y de métodos de selección se describen en Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359 (1984), Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)). Las secuencias de control transcripcional y traduccional para los vectores de expresión en células hospedadoras de mamífero proceden normalmente de genomas víricos. Las secuencias promotoras y las secuencias potenciadoras comúnmente usadas en los vectores de expresión en mamíferos incluyen, secuencias procedentes de virus Polioma, Adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Los

vectores de expresión en mamíferos ejemplares disponibles comercialmente para su uso en células hospedadoras de mamífero incluyen pCEP4 (Invitrogen®) y pcDNA3 (Invitrogen®).

Puede usarse una serie de sistemas de selección en sistemas de expresión de hospedador de mamífero-vector, incluyendo, pero sin limitación, la timidina cinasa del virus del herpes simple, los genes de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)), que se pueden emplear en células tk, hgp⁺ o apr⁺, respectivamente. Adicionalmente, puede usarse resistencia antimetabolitos como base de la selección para, por ejemplo, dhfr, gpt, neo, hyg^r, trpB, hisD, ODC (ornitina descarboxilasa) y el sistema de glutamina sintasa.

Pueden usarse métodos que se conocen bien por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de un anticuerpo que contiene MRD, junto con señales de control transcripcional/traduccionales adecuadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989) y Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y (1989).

Puede utilizarse una serie de sistemas de vector de expresión para expresar la secuencia codificante de un anticuerpo que contiene MRD. Se puede seleccionar una cepa de célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias de anticuerpo insertadas y que procesa el producto génico de anticuerpo en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos de la proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación posterior a la traducción de las proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas de células adecuadas o sistemas hospedadores para asegurar la modificación y el procesamiento correctos del anticuerpo o una porción del mismo expresada. A tal efecto, se pueden usar células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico.

La expresión estable normalmente logra resultados más reproducibles que la expresión transitoria y también es más susceptible de producción a gran escala; sin embargo, se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la materia la determinación de si es mejor la expresión transitoria para una situación particular. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, pueden transformarse células hospedadoras con los ácidos nucleicos codificantes respectivos controlados por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, promotores, potenciadores, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Después de la introducción de ADN exógeno, pueden dejarse crecer las células diseñadas mediante ingeniería genética durante 1-2 días en un medio enriquecido y a continuación, se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite la selección de células que han integrado el plásmido de manera estable en sus cromosomas y crecen hasta formar focos que a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares.

Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden expresarse a niveles (títulos) comparables con los de los anticuerpos. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden expresarse a al menos aproximadamente 10 µg/ml, al menos aproximadamente 20 µg/ml o al menos aproximadamente 30 µg/ml. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden expresarse a al menos 40 µg/ml o a al menos aproximadamente 50 µg/ml. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden expresarse a al menos aproximadamente 60 µg/ml, al menos aproximadamente 70 µg/ml, al menos aproximadamente 80 µg/ml, al menos aproximadamente 90 µg/ml, al menos aproximadamente 95 µg/ml, al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 110 µg/ml, al menos aproximadamente 120 µg/ml, al menos aproximadamente 130 µg/ml, al menos aproximadamente 140 µg/ml, al menos aproximadamente 150 µg/ml, al menos aproximadamente 160 µg/ml, al menos aproximadamente 170 µg/ml, al menos aproximadamente 180 µg/ml, al menos aproximadamente 190 µg/ml o al menos aproximadamente 200 µg/ml. Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante la amplificación del vector y el uso de métodos recombinantes y herramientas conocidas en la técnica, incluyendo estrategias de remodelado de la cromatina para potenciar la expresión de transgenes.

La presente divulgación se refiere además a un método para modificar el perfil de glicosilación de un anticuerpo que contiene MRD que se produce por una célula hospedadora, que comprende expresar en dicha célula hospedadora un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que contiene MRD y un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad glucosiltransferasa o un vector que comprende dichos ácidos nucleicos. Los genes con actividad glucosiltransferasa incluyen β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTII), α-manosidasa II (ManII), β(1,4)-galactosiltransferasa (GalT), β(1,2)-N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) y β(1,2)-N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnTII). Puede expresarse una combinación de genes con actividad glucosiltransferasa en la célula hospedadora (por ejemplo, GnTII I y Man II). Asimismo, el método también abarca la expresión de uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo que contiene MRD en una célula hospedadora en la que se ha alterado o de otro modo

desactivado un gen de glucosiltransferasa (por ejemplo, una célula hospedadora en la que se ha suprimido génicamente la actividad del gen que codifica α 1-6 fucosiltransferasa de núcleo). El anticuerpo que contiene MRD puede producirse en una célula hospedadora que expresa además un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII para modificar el patrón de glucosilación. El polipéptido que tiene actividad GnTIII puede ser un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido residente en el Golgi. La expresión del anticuerpo que contiene MRD en una célula hospedadora que pueden expresar un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII da como resultado un anticuerpo que contiene MRD con afinidad de unión a receptor Fc aumentada y una función efectora aumentada. Por consiguiente, la presente divulgación puede referirse a una célula hospedadora que comprende (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII; y (b) un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo que contiene MRD de la presente divulgación, tal como, un anticuerpo quimérico, primatizado o humanizado. El polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en el Golgi es el dominio de localización de manosa II. Los métodos para generar dichos polipéptidos de fusión y usarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras aumentadas se divulgan en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos n.º 60/495.142 y la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2004/0241817.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) como glucosilación alterada producidas por las células hospedadoras de la divulgación normalmente muestran afinidad de unión a receptor de Fc aumentada y/o función efectora aumentada, como resultado de la modificación de la célula hospedadora (por ejemplo, mediante la expresión de un gen de glucosiltransferasa). La afinidad de unión del receptor de Fc puede ser afinidad de unión aumentada a un receptor activador de Fc, tal como, el receptor FcγRIIIa. La función efectora aumentada puede ser un aumento en una o más de los siguientes: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCP), secreción de citocinas aumentada, captación de antígeno mediada por complejo inmune por células presentadoras de antígenos aumentada, citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, unión a células NK aumentada, unión a macrófagos aumentada, unión a células polimorfonucleares aumentada (PMN), unión aumentada a monocitos, reticulación aumentada de anticuerpos unidos a la diana, señalización inductora de la apoptosis directa aumentada, maduración de células dendríticas aumentada y cebado aumentado de linfocitos T.

Una vez que se ha producido una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) de la divulgación mediante expresión recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad por el antígeno específico después de la proteína A y cromatografía en columna de exclusión por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica normalizada para la purificación de proteínas. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la presente divulgación o los fragmentos de las mismas pueden fusionarse opcionalmente a secuencias de polipéptido heterólogas descritas en el presente documento o de otro modo descritas en la técnica para facilitar la purificación. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas o los fragmentos de las mismas pueden fusionarse opcionalmente a secuencias de polipéptido heterólogas descritas en el presente documento o de otro modo descritas en la técnica para facilitar la purificación. Más particularmente, se prevé que puedan usarse ligandos (por ejemplo, anticuerpos y otras matrices de afinidad) para los MRD u otros componentes de las composiciones multivalentes y multiespecíficas en columnas de afinidad para la purificación por afinidad y que opcionalmente, los MRD u otros componentes de la composición multiespecífica multivalente y monovalente que están unidos a estos ligandos se retiran de la composición antes de la preparación final de las composiciones multivalentes y multiespecíficas usando técnicas conocidas en la materia.

VII. Usos de fusiones de anticuerpo-MRD

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) descritas en el presente documento son útiles en una serie de aplicaciones que incluyen, pero sin limitación, métodos de tratamiento terapéuticos, tales como, el tratamiento del cáncer. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser útiles para inhibir el crecimiento tumoral, reducir la neovascularización, reducir la angiogénesis, inducir la diferenciación, reducir el volumen tumoral y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor. Los métodos usados pueden ser métodos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Las terapias para el cáncer y sus dosis, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en la bibliografía, tal como en el Physician's Desk Reference (PDR). El PDR divulga dosis de los agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. La pauta posológica y las dosis de los fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer particular que se esté tratando, el grado de la enfermedad y otros factores familiares para un médico experto en la materia y pueden determinarse por el médico. Los contenidos del PDR se incorporan expresamente al presente documento en su totalidad por referencia. La edición de 2006 del Physician's Desk Reference (PDR) divulga el mecanismo de acción y las dosis de tratamiento preferidas y las pautas posológicas para talidomida (p 979-983), VELCADE® (p 2102-2106) y melfalano (p 976-979).

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se formulan, dosifican y administran de un modo coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones multivalentes y multiespecíficas de la invención son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en que se mejoran los síntomas de la enfermedad mediados por la molécula diana. La dosis no ha de ser lo suficientemente grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como, síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. En general, la dosificación variará con la edad, afección, género y grado de la enfermedad del paciente y puede determinarse por un experto en la materia. La dosificación puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.

La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma está bien comprendida en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables estériles en forma de soluciones o suspensiones líquidas, acuosas o no acuosas. Sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensiones, en líquido antes de su uso. La preparación también puede emulsionarse. Por lo tanto, una composición que contiene anticuerpo-MRD puede adoptar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos u otras formas de composición.

Las composiciones de la invención (por ejemplo, composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD)) pueden formularse para asegurar u optimizar la distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos y si así se desea, las composiciones se preparan a fin de aumentar la transferencia a través de la BBB, mediante por ejemplo, formulación en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos n.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más grupos que se transportan de manera selectiva en células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida de fármaco (véase, por ejemplo, Ranade Clin. Pharmacol. 29:685 (1989)).

El ingrediente activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Asimismo, la composición de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y excluyendo el agua. Ejemplos de dichas fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como, aceite de semilla de algodón, ésteres orgánicos, tales como, oleato de etilo y emulsiones de agua-aceite.

Una composición terapéutica puede contener una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) de la presente invención, normalmente en una cantidad de al menos un 0,1 por ciento en peso de la fusión de anticuerpo que contiene MRD por peso de composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una proporción en peso de anticuerpo que contiene MRD por composición total. Por lo tanto, por ejemplo, un 0,1 por ciento en peso es 0,1 gramos de anticuerpo que contiene MRD por cada 100 gramos de composición total.

Los anticuerpos que contienen MRD se formulan, dosifican y administran de un modo coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios.

La pauta de dosificación y las cantidades eficaces para usos terapéuticos y profilácticos, es decir, la "pauta posológica", dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la causa, el estadio y la gravedad de la enfermedad o trastorno, la salud, estado físico, edad del mamífero que se esté tratando y del sitio y el modo de suministro del anticuerpo que contiene MRD. Puede determinarse la eficacia y la toxicidad del complejo y la formación mediante procedimientos farmacéuticos, farmacológicos y toxicológicos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. Igualmente, pueden usarse los datos obtenidos de estos procedimientos en la formulación de una serie de dosis para uso en seres humanos. Además, puede calcularse fácilmente el índice

terapéutico (es decir, la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 por ciento de la población dividida entre la dosis letal para el 50 por ciento de la población (DE_{50}/DL_{50})) usando procedimientos conocidos. La dosis se encuentra preferencialmente dentro de un intervalo de concentraciones que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad y pueden variar dentro de este intervalo, dependiendo de la dosis empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

La pauta posológica también toma en consideración parámetros farmacocinéticos conocidos en la técnica, tales como, velocidad de absorción de fármaco, biodisponibilidad, metabolismo y eliminación (véase, por ejemplo, Hidalgo-Aragones, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617 (1996); Groning et al., Pharmazie 51:337-341 (1996); Fotherby Contraception 54:59-69 (1996); y Johnson et al., J. Pharm. Sci. 84:1144-1146 (1995)). Se encuentra dentro del estado de la técnica que el médico determine la pauta posológica para cada sujeto que se esté tratando. Además, las administraciones individuales o múltiples de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) que contienen las composiciones pueden administrarse dependiendo de la dosis y la frecuencia, según sea necesario y se tolere por el sujeto. La duración del tratamiento profiláctico y terapéutico variará dependiendo de la enfermedad o afección particular que se esté tratando. Algunas enfermedades son susceptibles de un tratamiento agudo, mientras que otras requieren terapia crónica a largo plazo. Cuando se trata con un agente terapéutico adicional, el anticuerpo que contiene MRD puede administrarse de manera seriada o de manera simultánea con el agente terapéutico adicional.

Las cantidades terapéuticamente eficaces del anticuerpo que contiene MRD de la invención varían dependiendo de, por ejemplo, las dianas del anticuerpo que contiene MRD y la potencia de los agentes citotóxicos conjugados, como se describe en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, se espera que una dosis terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) que "barre" un ligando soluble, tal como, TNF alfa, sea mayor que aquella para una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) que redirige la función efectora de los linfocitos T a una diana en una neoplasia hematológica. Asimismo, es probable que las cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que comprenden un agente citotóxico maitansinoide sean menores que la dosis de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) que comprende un agente quimioterapéutico menos potente, tal como, taxol o el homólogo de una composición multiespecífica multivalente y monovalente no contiene un agente citotóxico.

Una dosis terapéuticamente eficaz de una composición multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser una cantidad seleccionada de aproximadamente 0,00001 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,00001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,00001 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg y de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal del paciente, en una o más administraciones de dosis al día, durante uno o varios días.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser una cantidad tal que cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable, es suficiente para lograr una concentración plasmática de aproximadamente 0,1 microgramos (μ g) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 μ g/ml, de aproximadamente 1 μ g/ml a aproximadamente 5 μ g/ml y normalmente, de aproximadamente 5 μ g/ml. Dicho de otro modo, la dosis puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis al día, durante uno o varios días.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede administrarse a de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg.

El intervalo entre la administración de la dosis de la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede ser aproximadamente diaria, aproximadamente dos veces a la semana, aproximadamente cada semana, aproximadamente cada dos semanas o aproximadamente cada tres semanas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse en primer lugar a una mayor dosis de carga y posteriormente a una dosis de mantenimiento menor.

Las composiciones terapéuticas pueden comprender composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) en una cantidad de al menos un 0,1 por ciento en peso de anticuerpo por peso de la composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una relación entre el peso de anticuerpo/la composición total. Por lo tanto, por ejemplo, un 0,1 por ciento en peso es 0,1 gramos de anticuerpo-MRD por 100 gramos de

composición total. Una composición terapéutica que comprende una composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener de aproximadamente 10 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por ml de anticuerpo, en forma de principio activo por volumen de la composición. Una composición terapéutica que comprende una composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (es decir, de aproximadamente un 0,1 a un 1 por ciento en peso) de anticuerpo como principio activo por volumen de composición.

Tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento, una composición multivalente y multiespecífica (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede tener un perfil PK similar al de un anticuerpo correspondiente. Por lo tanto, puede administrarse un anticuerpo-MRD con una pauta de concentración y dosis que es igual que la del componente de anticuerpo de la molécula de anticuerpo-MRD sola (por ejemplo, un anticuerpo comercial o un denominado "biosimilar" o "biomejorado" del mismo). Asimismo, la composición multivalentes y multiespecífica puede tener un perfil PK diferente al de un anticuerpo correspondiente. Por ejemplo, en los casos donde las composiciones multivalentes y multiespecíficas redirijan una respuesta de linfocitos T y/o incluyan un agente citotóxico, se espera que la concentración de dosis sea menor que la del anticuerpo correspondiente. En estos casos, pueden determinarse concentraciones y regímenes de dosis terapéuticamente eficaces de manera rutinaria usando factores y criterios conocidos en la técnica.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) no tienen por qué, pero opcionalmente se formulan con uno o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad de dichos otros agentes depende de la cantidad de la composición multiespecífica multivalente y monovalente presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descritos anteriormente.

Como se analizó anteriormente, la dosis adecuada de las composiciones multiespecíficas multivalentes y monovalentes (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, la terapia previa, el historial clínico del paciente y el criterio del médico tratante. La composición multiespecífica multivalente y monovalente se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Preferentemente, la composición multiespecífica multivalente y monovalente se administra por infusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse por vía parenteral mediante inyección o mediante inyección gradual a lo largo del tiempo. Aunque la molécula diana puede introducirse en el organismo por administración sistémica y por lo tanto, muy a menudo se trata por administración intravenosa de composiciones terapéuticas, se contemplan otros tejidos y medios de suministro donde existe una probabilidad de que el tejido diana contenga la molécula diana. Por lo tanto, la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, intracavidad, transdérmica y pueden suministrarse por medios peristálticos. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas también pueden suministrarse por aerosol a las vías respiratorias y los pulmones. La molécula de anticuerpo-MRD puede administrarse mediante infusión intravenosa. La molécula de anticuerpo-MRD puede administrarse mediante inyección intravenosa.

Las composiciones terapéuticas que contienen una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) pueden administrarse de manera convencional por vía intravenosa, tal como por inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificación unitaria para el paciente, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, excipiente o vehículo. Las composiciones terapéuticas que contienen un anticuerpo monoclonal humano o un polipéptido pueden administrarse por vía subcutánea.

Las composiciones de la invención se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar depende del paciente que se vaya a tratar, la capacidad del sistema del paciente para utilizar el principio activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de principio activo que se necesitan administrar pueden depender del criterio del médico a cargo del tratamiento y pueden ser específicas para cada sujeto. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para aplicación sistémica se divulgan en este documento y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para administración también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida por dosis repetidas a intervalos de una o más horas por una inyección posterior u otra administración. Como alternativa, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para tratamientos *in vivo*.

La divulgación describe un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de la molécula de anticuerpo-MRD a un paciente que lo necesite. La enfermedad, trastorno o lesión puede ser cáncer. La enfermedad, trastorno o lesión puede ser una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario, tal como, inflamación o una enfermedad autoinmunitaria.

Se espera que las composiciones multivalente y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) tengan al menos la misma eficacia terapéutica que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD cuando se administra de manera individual. Por consiguiente, se prevé que las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a un paciente para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión para la que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD o un anticuerpo que funciona del mismo modo que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD, demuestra una actividad beneficiosa razonablemente correlacionada para tratar o prevenir dicha enfermedad, trastorno o lesión. Esta actividad beneficiosa puede demostrarse *in vitro*, en un modelo animal *in vivo* o en ensayos clínicos en seres humanos. Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse a un paciente para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión para la que el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD o un anticuerpo que funciona del mismo modo que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD, demuestra una eficacia terapéutica o profiláctica *in vitro* o en un modelo animal. Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse a un paciente para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión para la que el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD o un anticuerpo que funciona del mismo modo que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD, demuestra eficacia terapéutica o profiláctica en seres humanos. Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse a un paciente para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión para la que el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD o un anticuerpo que funciona del mismo modo que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD, se haya aprobado por una autoridad reguladora para su uso en dicho tratamiento o prevención.

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con otro agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión para la que el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD o un anticuerpo que funciona del mismo modo que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD, en combinación con el agente terapéutico o un agente terapéutico diferente que funciona del mismo modo que el agente terapéutico en combinación, demuestra una eficacia terapéutica o profiláctica *in vitro* o en un modelo animal. Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con otro agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión para la que el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD o un anticuerpo que funciona del mismo modo que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD, en combinación con el agente terapéutico o un agente terapéutico diferente que funciona del mismo modo que el agente terapéutico en combinación, demuestra eficacia terapéutica o profiláctica en seres humanos. Un anticuerpo que contiene MRD, puede administrarse en combinación con otro agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o lesión para la que el componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD o un anticuerpo que funciona del mismo modo que el anticuerpo contenido en el anticuerpo que contiene MRD, en combinación con el agente terapéutico o un agente terapéutico diferente que funciona del mismo modo que el agente terapéutico en combinación, se haya aprobado por una autoridad reguladora para su uso en dicho tratamiento o prevención. La administración de un anticuerpo que contiene MRD en combinación con más de un agente terapéutico, como se ha descrito anteriormente, también está abarcada por la invención.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que promueve la apoptosis, inhibe la apoptosis, promueve la supervivencia celular, inhibe la supervivencia celular, promueve la senescencia de las células enfermas o aberrantes, inhibe la senescencia celular, promueve la proliferación celular, inhibe la proliferación celular, promueve la diferenciación celular, inhibe la diferenciación celular, promueve la activación celular, inhibe la activación celular, promueve el metabolismo celular, inhibe el metabolismo celular, promueve la adhesión celular, inhibe la adhesión celular, promueve el ciclo celular o la división celular, inhibe el ciclo celular o la división celular, promueve la replicación o la reparación del ADN, inhibe la replicación o la reparación del ADN, promueve la transcripción o la traducción o inhibe la transcripción o la traducción.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que promueve la apoptosis o la senescencia de células enfermas o aberrantes. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que agoniza, antagoniza o reduce la actividad de: EGFR, ErbB2, cMET, TNF α , TGF β , integrina $\alpha\beta$ 3, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, TNFR1, TNFRSF10A (TRAIL R1 DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5), TNF, TRAIL, IFN beta, MYC, Ras, BCR, ABL, JNK, CKH2, CHK1, CDK1, RAC1, MEK, MOS, mTOR, AKT, NF κ B, I κ k, IAP1, IAP2, XIAP, b-catenina, survivina, HDAC, HSP70, HSP90, proteasoma 20S, topoisomerasa 1, MDM2, E2F o E2F1.

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un compuesto que inhibe la supervivencia celular. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que antagoniza o reduce la actividad de: VEGF, VEGFR1, VEGFR2, IGF1R, IGF1, IGF2, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-CC, PDGF-C, PDGF-D, PDGFRA, PDGFRB, TGF α , TGFB3, PI3K, TNFSF13B (BLYS), TNFRSF13C (BAFFR), JNK, NF κ B, SIP, integrina $\alpha\beta$ 3 o survivina.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que regula la proliferación celular. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que antagoniza o reduce la actividad de: VEGF, VEGFR, EGFR, ErbB2, NF κ B, HIF, MUC1, MUC2 o HDAC.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que regula la adhesión celular. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que inhibe o reduce la actividad de: MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAU, $\alpha v \beta 1$ integrina, $\alpha v \beta 3$ integrina, $\alpha v \beta 5$ integrina, TGF β , EPCAM, $\alpha 1 \beta 1$ integrina, $\alpha 2 \beta 1$ integrina, $\alpha 4 \beta 1$ integrina, $\alpha 2 \beta 1$ integrina, $\alpha 5 \beta 1$ integrina, $\alpha 9 \beta 1$ integrina, $\alpha 6 \beta 4$ integrina, $\alpha M \beta 2$ integrina, CEA, L1, Mel-CAM o HIF1. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que inhibe o reduce la actividad de $\alpha v \beta 3$ integrina, $\alpha v \beta 5$ integrina o $\alpha 5 \beta 1$ integrina. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con: MEDI-522 (VITAXIN, Abegrin; MedImmune), ATN-161 (Attenuon), EMD 121974 (Merck KGaA), CNTO 95 (Cenotocor) o veloximab (M200, Protein Design Labs).

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que regula la activación celular. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que promueve, inhibe o reduce la actividad de: CD80, CD86, MHC, PDL2 (B7-DC), B7-H1, B7-H2 (ICOSL), B7-H3, B7-H4, CD28, CTLA4, TCR, PD1, CD80 o ICOS.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que regula el ciclo celular, la división celular o la mitosis. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que antagoniza o reduce la actividad de: PI3K, SMO, Ptch, HH, SHH, plk1, plk2, plk3, plk4, aurora A, aurora B, aurora C, CDK1, CDK2, CDK4, CHK1, CHK2, GSK3B, PAK, NEK2A, ROCK 2, MDM2, EGF (KSP), proteasoma 20S, HDAC o survivina.

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un compuesto que regula la replicación o la reparación del ADN. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que antagoniza o reduce la actividad de: BRCA1, CHK1, CHK2, E2F, E2FL, MDM2, MDM4 o PARP1.

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un compuesto que regula la transcripción o la traducción. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que antagoniza o reduce la actividad de: IGF1R, IGF1, IGF2, PDGFRA, PDGFRB, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-CC, PDGF-C, PDGF-D, KIT, MYC, CD28, CDK4, CDK6, mTOR, MDM2, HDAC, E2F, E2F1 o HIF1.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que regula la migración, la invasión o la metástasis. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que inhibe o reduce la actividad de: c-MET, RON, CXCR4, PI3K, AKT, MMP2, FN1, CATHD, AMF, $\alpha v \beta 1$ integrina, $\alpha v \beta 3$ integrina, $\alpha v \beta 5$ integrina, TGF β , $\alpha 1 \beta 1$ integrina, $\alpha 2 \beta 1$ integrina, $\alpha 4 \beta 1$ integrina, $\alpha 2 \beta 1$ integrina, $\alpha 5 \beta 1$ integrina, $\alpha 9 \beta 1$ integrina, $\alpha 6 \beta 4$ integrina, $\alpha M \beta 2$ integrina o HIF1.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que regula el metabolismo celular. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un compuesto que inhibe o reduce la actividad de: ErbB2, EGFR, IGF1R, IGF1, IGF2, TGF α , ICOS, PI3K, VEGFR1, VEGFR2, mTOR, HIF1 o HDAC.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un inhibidor de una o más proteínas cinasas. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a una diana del anticuerpo que contiene MRD (por ejemplo, mediante uno o más de los MRD del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD). El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a una proteína cinasa que no es una diana del anticuerpo que contiene MRD. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a una proteína cinasa. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a más de una proteína cinasa.

Un anticuerpo que contiene MRD puede administrarse en combinación con un inhibidor (por ejemplo, una molécula pequeña, anticuerpo, etc.), de una proteína cinasa seleccionada entre: EGFR, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, ErbB2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PDGFR, PDGFRB, RON y c-Met. El inhibidor puede inhibir una proteína cinasa que no es una diana del anticuerpo que contiene MRD. Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor de una o más proteínas cinasas seleccionadas entre: EGFR, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIc), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIIa, FGFR2-IIIb y FGFR2-IIIc), FGFR3, ErbB2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PDGFRA, PDGFRB, FIT3, ALK, RET, Kit, raf, p38, RON, c-Met, PI3K, ERK, FAK, AKT, SYK, JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, S1P, FAK, PTK7, PKD1, PKA, PKC, PKG, PRKDC, Pim, CDK, plk, p38MAPK, SRC, ABL, FGR, FYN, HCK, LCK, LYN, YES, EPH4, BMK1, ERK5, mTOR, CHK1, CHK2, CSNK1G1, CSNK1G2, CSNK1G3, GSK3, BTK, JNK, Aurora cinasa, Aurora cinasa A, Aurora cinasa B y Aurora cinasa C.

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor de proteína cinasa seleccionado entre: imatinib mesilato (por ejemplo, GLEEVECTM), gefitinib (por ejemplo, IRESSATM, Astra Zeneca), vandetanib (por ejemplo, ZACTIMATM, Astra Zeneca), erlotinib (por ejemplo, TARCEVATM, Genentech/OSI), sunitinib (por ejemplo, SUTENTTM, Pfizer), lapatanib (GSK) y sorafenib (por ejemplo, NEXAVARTM, Bayer).

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor de proteína cinasa seleccionado entre: nilotinib (por ejemplo, AMN107, Novartis), dasatinib (por ejemplo, BMS 354825, BMS), ABT-869, bostatinib (por ejemplo, SKI-606, Wyeth), cediranib, recentib, captastatin, AEE788 (Novartis), AZD0530 (AstraZeneca) Exel 7646/Exel 0999 (Exelixis), cabozantinib (por ejemplo, XL184; Exelixis), XL880/GSK1363089 (Exelixis/GSK), ARQ-197 (Arqule y Daiichi Sankyo), Inno-406 (Innovive), SGS523 (SGX), PF-2341066 (Pfizer), CI-1033 (Pfizer), motesanib (por ejemplo, AMG-706, Amgen), AG-013736 (Axitinib), AMG-705 (Amgen), pegaptanib (OSI/Pfizer), lestaurtinib, ruxolitinib, SB1518, CYT387, LY3009104, TG101348, JANEX-1, tofacitinib (Pfizer), INCB18424, LFM-A13, pazopanib (por ejemplo, GW786034B, GlaxoSmithKline), GW-572016, EKB-569 (Wyeth-Ayerst), vatalanib (por ejemplo, PTK787/ZK), AZD2171, MK-0457 (VX-680, Merck), PHA 739358 (Nerviano), mubritinib (Takeda), E7080 (Eisai), fostamatinib (Rigel/AstraZeneca), SGX523, SNS-032 (Sunesis), XL143, SNS-314 (Sunesis), SU6668 (Pfizer), AV-951 (AVEO), AV-412 (AVEO), tivozanib (AVEO), PX-866 (Oncothyreon), canertinib (CI-1033), NSC 109555, VRX0466617, UCN-01, inhibidor de CHK2 II, EXEL-9844, XL844, CBP501, PF-004777736, desbromohimeralsidina, Go6976, AEG3482, cediranib (por ejemplo, RECENTIN™, AstraZeneca), semaxanib (SU5416), SU5616, CGP,53716, mastinib y ZD6474 (AstraZeneca).

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor de proteína cinasa FGFR seleccionado entre: sunitinib, SU5402, PD173074, TKI258 (Novartis), BIBF 1120 (Boehringer Ingelheim), brivanib (BMS-582.664), E7080 (Eisai) y TSU-68 (Taiho).

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor de proteína cinasa de JAK1, JAK2, JAK3 o SYK. El inhibidor de proteína cinasa puede seleccionarse entre: lestaurtinib, tofacitinib, ruxolitinib, SB1518, CYT387, LY3009104, TG101348, fostamatinib, BAY 61-3606 y sunitinib.

Un anticuerpo que contiene MRD de unión a ErbB2 (HER2) (por ejemplo, un anticuerpo de unión a MRD que se une a ErbB2 mediante uno o más MRD o del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD) puede administrarse en combinación con un inhibidor de proteína cinasa de ErbB2. Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD basado en el anticuerpo trastuzumab, en combinación con un inhibidor de proteína cinasa de ErbB2. Un anticuerpo que contiene MRD de unión a ErbB2 puede administrarse en combinación con lapatinib. Un anticuerpo que contiene MRD basado en trastuzumab puede administrarse en combinación con lapatinib. Un anticuerpo que contiene MRD de unión a ErbB2 puede administrarse en combinación con sunitinib. Un anticuerpo que contiene MRD basado en trastuzumab puede administrarse en combinación con sunitinib. Un anticuerpo que contiene MRD de unión a ErbB2 puede administrarse en combinación con neratinib. Un anticuerpo que contiene MRD basado en trastuzumab puede administrarse en combinación con neratinib. Un anticuerpo que contiene MRD de unión a ErbB2 puede administrarse en combinación con iapatinib. Un anticuerpo que contiene MRD basado en trastuzumab puede administrarse en combinación con iapatinib. Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD de unión a ErbB2 (HER2) en combinación con un inhibidor de proteína cinasa seleccionado entre: canertinib (GW-572016), AV-412 (AVEO), tivozanib (AVEO), vandetanib (por ejemplo, ZACTIMA™, AstraZeneca), AEE788 (Novartis), Exel 7646/Exel 0999 (Exelixis), CI-1033 (Pfizer) y EKB-569 (Wyeth-Ayerst). Se administra un anticuerpo que contiene MRD basado en el anticuerpo trastuzumab, en combinación con un inhibidor de proteína cinasa seleccionado entre: canertinib (GW-572016), AV-412 (AVEO), tivozanib (AVEO), vandetanib (por ejemplo, ZACTIMA™, AstraZeneca), AEE788 (Novartis), Exel 7646/Exel 0999 (Exelixis), CI-1033 (Pfizer), PX-866 (Oncothyreon) y EKB-569 (Wyeth-Ayerst).

Un anticuerpo que contiene MRD de unión a EGFR (por ejemplo, un anticuerpo de unión a MRD que se une a EGFR mediante uno o más MRD o del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD) puede administrarse en combinación con un inhibidor de proteína cinasa de EGFR. Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD basado en el anticuerpo cetuximab, en combinación con un inhibidor de proteína cinasa de EGFR. Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD de unión a EGFR en combinación con gefitinib (por ejemplo, IRESSA™, AstraZeneca). Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD basado en el anticuerpo cetuximab en combinación con gefitinib (por ejemplo, IRESSA™, AstraZeneca). Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD de unión a EGFR en combinación con erlotinib (por ejemplo, TARCEVA™, Genentech/OSI). Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD basado en el anticuerpo cetuximab en combinación con erlotinib (por ejemplo, TARCEVA™, Genentech/OSI). Un anticuerpo que contiene MRD de unión a EGFR puede administrarse en combinación con lapatinib. Un anticuerpo que contiene MRD basado en cetuximab puede administrarse en combinación con lapatinib. Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD de unión a EGFR en combinación con sorafenib (por ejemplo, NEXAVAR™, Bayer). Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD basado en el anticuerpo cetuximab en combinación con sorafenib (por ejemplo, NEXAVAR™, Bayer). Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD de unión a EGFR en combinación con un inhibidor de proteína cinasa seleccionado entre: canertinib (GW-572016), ZD6474, AV-412 (AVEO), tivozanib (AVEO), vandetanib (ZACTIMA, AstraZeneca), AEE788 (Novartis), Exel 7646/Exel 0999 (Exelixis), CI-1033 (Pfizer) y EKB-569 (Wyeth-Ayerst). Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD basado en el anticuerpo cetuximab, en combinación con un inhibidor de proteína cinasa seleccionado entre: canertinib (GW-572016), ZD6474, AV-412 (AVEO), tivozanib (AVEO), vandetanib (ZACTIMA, AstraZeneca), AEE788 (Novartis), Exel 7646/Exel 0999 (Exelixis), CI-1033 (Pfizer), PX-866 (Oncothyreon) y EKB-569 (Wyeth-Ayerst).

Un anticuerpo que contiene MRD de unión a VEGFA, VEGFR1 o VEGFR2 (por ejemplo, un anticuerpo de unión a MRD que se une a VEGFR1 mediante uno o más MRD del anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD) se

administra en combinación con un inhibidor de proteína cinasa de VEGFR1, VEGFR2 o VEGFR3. Puede administrarse el anticuerpo que contiene MRD de unión a VEGFA, VEGFR1 o VEGFR2 en combinación con: sunitinib, sorafenib, pazopanib (por ejemplo, GW786034B), AZD2171, vatalanib, ZD6474, AMG-706 o AC013736.

- 5 Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor del proteasoma. El inhibidor es bortezomib (por ejemplo, VELCADE™). El inhibidor es PR-171 (Proteolix).

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor de HDAC.

- 10 Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor de mTOR.

Puede administrarse un anticuerpo que contiene MRD en combinación con un inhibidor de NFkB.

- 15 La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a VEGFA o VEGFR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el cáncer colorrectal mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que tiene cáncer colorrectal. La divulgación describe un método para tratar el cáncer de mama mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que tiene cáncer de mama. La divulgación describe un método para tratar el carcinoma de pulmón no microcítico mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que tenga carcinoma de pulmón no microcítico. Pueden administrarse cantidades terapéuticamente eficaces de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente para tratar el cáncer colorrectal metastásico, el cáncer de mama metastásico, el cáncer pancreático metastásico o el carcinoma de pulmón no microcítico metastásico. La divulgación describe un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que tenga carcinoma de células renales, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de hígado o cáncer pancreático.

- 30 La terapia combinada y las composiciones que incluyen composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) de la invención y otro agente terapéutico también están abarcadas por la invención, al igual que los métodos de tratamiento que usan estas composiciones. Las composiciones de la invención pueden administrarse solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Las combinaciones pueden administrarse ya sea de manera concomitante, por ejemplo, en forma de una mezcla, por separado pero de manera simultánea o de manera concurrente; o de manera secuencial. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos o en forma de una mezcla terapéutica y también procedimientos en los que se administran los agentes combinados por separado, pero de manera simultánea, por ejemplo, en forma de líneas intravenosas separadas en el mismo individuo. La administración "en combinación" incluye además la administración por separado de uno de los compuestos o agentes terapéuticos administrados en primer lugar, seguido por el segundo. Por consiguiente, un anticuerpo que contiene MRD de unión a VEGFA o VEGFR puede administrarse en combinación con 5-fluorouracilo, carboplatino, paclitaxel o interferón alfa. Puede administrarse bevacizumab que comprende al menos un MRD en combinación con 5-fluorouracilo, carboplatino, paclitaxel o interferón alfa.

- 45 La divulgación describe un método para tratar la degeneración macular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a VEGFA o VEGFR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la degeneración macular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. 50 La divulgación describe un método para tratar la degeneración macular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de ranibizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

- La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a ErbB2 (HER2) a un paciente que lo necesite. Las 55 composiciones multivalentes y multiespecíficas de unión a ErbB2 (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a pacientes que han mostrado una respuesta previa a otra terapia basada en ErbB2 (por ejemplo, HERCEPTIN, quimioterapia y/o radiación) o se predice que responderá a otra terapia basada en ErbB2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de unión a ErbB2 (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a pacientes que han fracasado en responder a otra terapia basada en ErbB2 o se predice que 60 fracasarán con otra terapia basada en ErbB2.

- La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el cáncer de mama mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de 65 trastuzumab que comprende al menos un MRD a un paciente que tiene cáncer de mama. Pueden administrarse

cantidades terapéuticamente eficaces de trastuzumab que comprende al menos un MRD a un paciente para tratar el cáncer de mama metastásico.

5 Un anticuerpo que contiene MRD de unión a ErbB2 (HER2) puede administrarse en combinación con ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel, carboplatino, antraciclina o un maitansinoide. Puede administrarse trastuzumab que comprende al menos un MRD en combinación con ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel, carboplatino, antraciclina o un maitansinoide.

10 La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a CD20 a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un cáncer hematológico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de rituximab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar NHL positiva a CD20 mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que tiene NHL positiva a CD20. La divulgación describe un método para
15 tratar CLL positiva a CD20 mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que tiene CLL positiva a CD20.

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a CD20 en combinación con: ludarabina, ciclofosfamida, FC (fludarabina y ciclofosfamida), régimen de quimioterapia a base de antraciclina (por ejemplo, CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona)) o quimioterapia CVP (ciclofosfamida, prednisona y vincristina). Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de bevacizumab que comprende al menos un MRD en combinación con: ludarabina, ciclofosfamida, FC (fludarabina y ciclofosfamida), régimen de quimioterapia a base de antraciclina (por ejemplo, CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona)) o quimioterapia CVP (ciclofosfamida, prednisona y vincristina).

25 Puede usarse cualquiera de los anticuerpos que contienen fusiones de anticuerpo-MRD y/o MRD que se unen a CD20 de acuerdo con los métodos de tratamiento de un trastorno asociado con CD20 o que puede tratarse usando como diana células que expresan CD20 (por ejemplo, cánceres hematológicos y enfermedad autoinmunitaria). El componente de anticuerpo de la fusión de anticuerpo-MRD se selecciona entre rituximab, ocrelizumab, GA101 y PF-5.230.895.

30 La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana seleccionada entre: CD20, TNFRSF5 (CD40), CD45RB, CD52, CD200, CCR2, PAFR, IL6R, TNFRSF1A, VLA4, CSF2, TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), TLR2, TLR4, GPR44, FASL, TREM1, IL1, IL1 beta, IL1RN, factor tisular, MIF, MIP2, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL23, TNF, TNFSF12 (TWEAK), LPS, CXCL13, VEGF, IFN alfa, IFN gamma, GMCSF, FGF, TGFb, C5 y CCR3. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención.

40 La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD que se une a TNF y a ANG2.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD que se une a IL1, IL12 y TNF. El anticuerpo
45 que contiene MRD puede unirse a IL1, IL12, TNF y ANG2.

El anticuerpo que contiene MRD administrado puede unirse a IL1, IL6 y TNF. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a IL1, IL6, TNF y ANG2.

50 El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana seleccionada entre: CD20, TNFRSF5 (CD40), CD45RB, CD52, CD200, CCR2, PAFR, IL6R, TNFRSF1A, VLA4, CSF2, TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), TLR2, TLR4, GPR44, FASL, TREM1, IL1, IL1 beta, IL1RN, factor tisular, MIF, MIP2, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL23, TNF, TNFSF12 (TWEAK), LPS, CXCL13, VEGF, IFN alfa, IFN gamma, GMCSF, FGF, TGFb, C5 y CCR3. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a 2, 3, 4,
55 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención.

La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a una diana seleccionada entre: CD1C, CD3, CD4, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD28, CD37, CD38, CD45RB, CD52, CD69, CD72, CD74, CD75, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD83, CD86, CD200, IL2RA, IL1R2, IL6R, VLA4, HLA-DRA, HLA-A, ITGA2, ITGA3, CSF2, TLR2, TLR4, GPR44, TREM1, TIE2, TNF, FASL, factor tisular, MIF, MIP2, IL1, IL1 beta, IL1RN, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL23, TNFRSF1A, TNFRSF5 (CD40), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF13C (BAFFR), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFSF7 (ligando de CD30), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13B (BLYS),
60 ANG2, ICOSL (B7-H2), MS4A1, IFN alfa, IFN beta1, IFN gamma, TNFSF7 (ligando de CD27, CD70), PAFR, INHA, INHBA, DPP4, NT5E, CTLA4, B7.1/B7.2, LPS, VEGF, GMCSF, FGF, C5, CXCL13, CXCR4, CCR2 y CCR3. Las
65

composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse para tratar la artritis reumatoide y las composiciones multivalentes y multiespecíficas se unen a una diana seleccionada entre: CD19, CD20, CD45RB, CD52CD200, IL1, IL6, IL12, IL15, IL17, IL18, IL23, TNF, TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF13B (BLyS), VEGF, VLA4, IFN gamma, IFN alfa, GMCSF, FGF, C5, CXCL13 y CCR2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse para tratar el lupus eritematoso sistémico y las composiciones multivalentes y multiespecíficas se unen a IFN alfa y a TNFSF13B (BLyS). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse para tratar la esclerosis múltiple y las composiciones multivalentes y multiespecíficas se unen a una diana seleccionada entre: ANG2, IL1, IL12, IL18, IL23, CXCL13, TNF, TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (ligando de CD40), VEGF, VLA4, TNF, CD45RB, CD200, IFN gamma, GM-CSF, FGF, C5, CD52, TNFRSF1A, TNFRSF5 (CD40), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF13C (BAFFR), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFRSF21 (DR6), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13B (BLyS), ANG2, AGE (S100 A, anfoterina), ICOSL (B7-H2), MS4A 1, IFN alfa, IFN beta1, IFN gamma, TNFSF7 (ligando de CD27, CD70), MCP1, CCR2 y CXCL13. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas que se unen a al menos 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcados por la invención.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a CD20 a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a CD20 a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo rituximab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo rituximab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo rituximab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la esclerosis múltiple que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo rituximab que contiene MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo ocrelizumab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo ocrelizumab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo ocrelizumab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la esclerosis múltiple que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo ocrelizumab que contiene MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo PF5.230.895 que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo PF5.230.895 que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo PF5.230.895 que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la esclerosis múltiple que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo PF5.230.895 que contiene MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD que se une a CD20. El anticuerpo administrado que contiene MRD puede unirse a CD20 y a una diana seleccionada entre: TNF, TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF1A, CD45, RB, CD52, CD200, CCR2, PAFR, IL6R, VLA4, CSF2, RAGE, TLR2, TLR4, GPR44, FASL, TREM1, TIE2, factor tisular, MIF, MIP2, LPS, IL1, IL1 beta, IL1RN, IL6, IL6R, IL8, IL10, IL12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL23, CXCL13, VEGF, IFN alfa, IFN gamma, GMCSF, FGF, C5 y CCR3. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a CD20 y que también se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la divulgación. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD20. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede ser rituximab, ocrelizumab, GA101 o PF-5.230.895.

La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD que se une a CD20. El anticuerpo administrado que contiene MRD puede unirse a CD20 y a una diana seleccionada entre: CD1C, CD3, CD4, CD19, CD21, CD22, CD23, CD24, CD28, CD37, CD38, CD45RB, CD52, CD69, CD72, CD74, CD75, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD83, CD86, CD200, IL2RA, IL1R2, IL6R, VLA4, HLA-DRA, HLA-A, ITGA2, ITGA3, CSF2, TLR2, TLR4, GPR44, TREM1, TIE2, TNF, FASL, factor tisular, MIF, MIP2, IL1, IL1 beta, IL1RN, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL23, TIE2, TNFRSF1A, TNFRSF5 (CD40), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF7

(CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF13C (BAFFR), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13B (BLyS), ANG2, ICOSL (B7-H2), MS4A1, IFN alfa, IFN beta1, IFN gamma, TNFSF7 (ligando de CD27, CD70), PAFR, INHA, INHBA, DPP4, NT5E, CTLA4, B7.1/B7.2, LPS, VEGF, GMCSF, FGF, C5, CXCL13, CXCR4, CCR2 y CCR3. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse para tratar la artritis reumatoide y las composiciones multivalentes y multiespecíficas se unen a CD20 y a una diana seleccionada entre: CD19, CD45RB, CD52, CD200, IL12, IL15, IL17, IL18, IL23, TNF, TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (ligando de CD40), VEGF, VLA4, IFN gamma, interferón alfa, GMCSF, FGF, C5, CXCL13 y CCR2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse para tratar la esclerosis múltiple y las composiciones multivalentes y multiespecíficas se unen a CD20 y a una diana seleccionada entre: ANG2, IL12, IL18, IL23, CXCL13, TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (ligando de CD40), VEGF, VLA4, TNF, CD45RB, CD200, IFN gamma, GM-CSF, FGF, C5, CD52, TIE2, TNFRSF1A, TNFRSF5 (CD40), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF13C (BAFFR), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFRSF21 (DR6), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13B (BLyS), ICOSL (B7-H2), MS4A 1, IFN alfa, IFN beta1, IFN gamma, TNFSF7 (ligando de CD27, CD70), CCR2 y CXCL13. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas que se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede seleccionarse entre rituximab, ocrelizumab, GA101 y PF-5.230.895.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a TNF a un paciente que lo necesite. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de unión a TNF (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a pacientes que hayan mostrado previamente responder a otra terapia basada en TNF o que se predice que responderán a otra terapia basada en TNF (por ejemplo, antagonistas de TNF, tales como, anti-TNF (por ejemplo, HUMIRA), EMBREL, antagonistas de CD28, antagonistas de CD20 y antagonistas de IL6/IL6R). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de unión a TNF (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a pacientes que han fracasado en responder a otra terapia basada en TNF o se predice que fracasarán con otra terapia basada en TNF.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD que se une a TNF.

El anticuerpo administrado que contiene MRD puede unirse a TNF y a una diana seleccionada entre: CD20, TNFRSF5 (CD40), CD45RB, CD52, CD200, CCR2, PAFR, IL6R, TNFRSF1A, VLA4, CSF2, TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), TLR2, TLR4, GPR44, FASL, TREM1, IL1, IL1 beta, IL1RN, factor tisular, MIF, MIP2, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL23, TNFSF12 (TWEAK), LPS, CXCL13, VEGF, IFN gamma, GMCSF, FGF, C5 y CCR3. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a TNF y a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TNF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede seleccionarse entre adalimumab, certolizumab, golimumab y AME-527.

La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD que se une a TNF. El anticuerpo administrado que contiene MRD puede unirse a TNF y a una diana seleccionada entre: CD1C, CD3, CD4, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD28, CD37, CD38, CD45RB, CD52, CD69, CD72, CD74, CD75, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD83, CD86, CD200, IL2RA, IL1R2, IL6R, VLA4, HLA-DRA, HLA-A, ITGA2, ITGA3, CSF2, TLR2, TLR4, GPR44, TREM1, TIE2, FASL, factor tisular, MIF, MIP2, IL1, IL1 beta, IL1RN, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL11, IL12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL23, TIE2, TNFRSF1A, TNFRSF5 (CD40), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF13C (BAFFR), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13B (BLyS), ANG2, ICOSL (B7-H2), MS4A1, IFN alfa, IFN beta1, IFN gamma, TNFSF7 (ligando de CD27, CD70), PAFR, INHA, INHBA, DPP4, NT5E, CTLA4, B7.1/B7.2, LPS, VEGF, GMCSF, FGF, C5, CXCL13, CXCR4, CCR2 y CCR3. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse para tratar la artritis reumatoide y las composiciones multivalentes y multiespecíficas se unen a TNF y a una diana seleccionada entre: CD19, CD20, CD45RB, CD52CD200, IL12, IL15, IL17, IL18, IL23, TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF13B (BLyS), VEGF, VLA4, IFN gamma, interferón alfa, GMCSF, FGF, C5, CXCL13 y CCR2. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse para tratar la esclerosis múltiple y las composiciones multivalentes y multiespecíficas se unen a TNF y a una diana seleccionada entre: ANG2, IL12, IL18, IL23, CXCL13, TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (ligando de CD40), VEGF, VLA4, TNF, CD45RB, CD200, IFN gamma, GM-CSF, FGF, C5, CD52, TNFRSF1A, TNFRSF5 (CD40), TIE2, TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF13C (BAFFR), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF6 (ligando de Fas), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFRSF21 (DR6), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13B (BLyS), ICOSL (B7-H2), MS4A 1, IFN alfa, IFN beta1, IFN gamma, TNFSF7 (ligando de CD27, CD70), CCR2 y CXCL13. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas que se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a

TNF. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede seleccionarse entre adalimumab, certolizumab, golimumab y AME-527.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de unión a TNF (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a pacientes que han mostrado previamente una respuesta a una terapia para una enfermedad autoinmunitaria o que se predice que responderán a otras terapias para enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, antagonistas de TNF, tales como, Anti-TNF (por ejemplo, HUMIRA®), ENBREL®, antagonistas de CD28, antagonistas de CD20, antagonistas de BlyS y antagonistas de IL6/IL6R). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas de unión a TNF (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a pacientes que han fracasado en responder a otra terapia para enfermedades autoinmunitarias o se predice que fracasarán con otra terapia para enfermedades autoinmunitarias.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de adalimumab que comprende administrar al menos un MDR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de adalimumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de adalimumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de adalimumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de adalimumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de adalimumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de adalimumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de ATN-103 que comprende administrar al menos un MDR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ATN-103 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ATN-103 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ATN-103 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ATN-103 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ATN-103 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ATN-103 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de infliximab que comprende administrar al menos un MDR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de infliximab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de infliximab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de infliximab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de infliximab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de infliximab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de infliximab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD que se une a TNFSF15 (TL1A).

El anticuerpo administrado que contiene MRD puede unirse a TL1A y a una diana seleccionada entre: TNF, IFN gamma, IL1, IL1beta, IL6, IL8, IL12, IL15, IL17, IL18, IL23 y IL32. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a TL1A y al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas

también están abarcadas por la divulgación. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a TL1A.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a IL22 a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PF5.212.367 (ILV-094) que comprende administrar al menos un MDR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de PF5.212.367 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de PF5.212.367 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de PF5.212.367 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de PF5.212.367 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de PF5.212.367 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de PF5.212.367 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a alfa4 integrina a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab que comprende administrar al menos un MDR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo natalizumab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la esclerosis múltiple que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo natalizumab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la esclerosis múltiple, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a TNFSF5 (LIGANDO DE CD40) a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de CDP7657 que comprende administrar al menos un MDR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de CDP7657 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de CDP7657 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo CDP7657 que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la esclerosis múltiple que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo CDP7657 que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de CDP7657 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de CDP7657 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de CDP7657 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de CDP7657 que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a TNFSF12 (TWEAK) a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen (que se ha incluido en ensayos clínicos de fase 1) que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la esclerosis múltiple que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo TNFSF12 (TWEAK) de Biogen que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a CD25 a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno del sistema inmunitario que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de daclizumab que comprende administrar al menos un MDR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de daclizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de daclizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo daclizumab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la esclerosis múltiple que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo daclizumab que contiene MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de daclizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de daclizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de daclizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de daclizumab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite.

Las proteínas de fusión de anticuerpo-MRD que tienen anticuerpos y/o MRD que se unen a antígenos de cáncer o a otras dianas asociadas con el establecimiento, la progresión y/o la metástasis del cáncer se describen en el presente documento o se conocen de otro modo en la técnica y pueden usarse de acuerdo con los métodos de la divulgación para tratar el cáncer. Las proteínas de fusión de anticuerpo-MRD pueden comprender un anticuerpo y/o MRD que se une a una diana identificada en el presente documento.

La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a EGFR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cetuximab que comprende al menos un MRD a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el cáncer mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cetuximab que comprende al menos un MRD a un paciente que tiene cáncer colorrectal. Pueden administrarse cantidades terapéuticamente eficaces de cetuximab que comprende al menos un MRD a un paciente para tratar el cáncer colorrectal metastásico, el cáncer de mama metastásico, el cáncer pancreático metastásico o el carcinoma de pulmón no microcítico metastásico. La divulgación describe un método para tratar el cáncer mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cetuximab que comprende al menos un MRD a un paciente que tiene carcinoma escamocelular de cabeza y cuello.

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a EGFR en combinación con irinotecán, FOLFIRI, quimioterapia a base de platino o radioterapia. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de cetuximab que comprende al menos un MRD en combinación con irinotecán, FOLFIRI, quimioterapia a base de platino o radioterapia.

5

La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD descrito en el presente documento a un paciente que lo necesite.

10

La divulgación describe un método de tratamiento de un cáncer sólido mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD de unión a un cáncer sólido (por ejemplo, un MRD-anticuerpo que se une a una diana asociada con tumores sólidos validada, como se describe en el presente documento, a un paciente que lo necesite).

15

La divulgación describe un método para tratar un cáncer sólido mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo que se une a un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en: IGFR1, ALK1, p-cadherina, CRYPTO y alfa5 b1 integrina. El componente de anticuerpo del MRD-anticuerpo administrado puede ser un miembro seleccionado entre: fitumumab, CP-870893, PF-3.732.010, PF-3.446.962, volociximab, BII022 y el anticuerpo Biogen CRYPTO.

20

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar el cáncer. Por lo tanto, la divulgación describe métodos para tratar el cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD a un paciente (por ejemplo, un paciente (sujeto) que necesite tratamiento). El cáncer puede ser un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello. El cáncer puede ser cáncer de mama. El paciente puede ser un ser humano.

25

30

Otros ejemplos de cánceres o neoplasias que pueden tratarse con los anticuerpos que contienen MRD y los MRD incluyen, pero sin limitación: leucemia linfobástica infantil aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer hepatocelular (primario) de adultos, cáncer hepático (primario) de adultos, leucemia linfocítica aguda de adultos, leucemia mieloide aguda de adultos, enfermedad de Hodgkin de adultos, linfoma de Hodgkin de adultos, leucemia linfocítica de adultos, linfoma no Hodgkin de adultos, cáncer hepático primario de adultos, sarcoma de tejidos blandos de adultos, linfoma relacionado con SIDA, neoplasias relacionadas con el SIDA, cáncer de ano, astrocitoma, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer óseo, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de la pelvis renal y del uréter, linfoma (primario) del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer hepatocelular (primario) infantil, cáncer de hígado (primario) infantil, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tronco encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores de células germinales extracraneales infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de la vía visual infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales infantiles, cáncer de hígado primario infantil, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, glioma de la vía visual e hipotalámico infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma cutáneo de linfocitos T, carcinoma endocrino de células de islote pancreáticas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing y tumores relacionados, cáncer pancreático exocrino, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer ocular, cáncer de mama femenino, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores gastrointestinales, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer hipofaríngeo, cánceres de intestino, melanoma intraocular; carcinoma de células de islote, cáncer pancreático de células de islote, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labios y de la cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer escamoso de cuello primario oculto y metastásico, cáncer escamoso de cuello primario y metastásico, cáncer de cuello escamoso metastásico, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos, leucemia mielógena, leucemia mieloide, Trastornos mieloproliferativos, cáncer de la cavidad paranasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin durante el embarazo, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer escamoso de cuello primario oculto y metastásico, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma/sarcoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer epitelial de ovarios, tumor de células germinales ováricas, tumor ovárico con bajo potencial maligno, cáncer pancreático, paraproteinemias, púrpura, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor de la pituitaria, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de hígado primario, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales, cáncer de la pelvis renal y el uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales,

60

65

sarcoidosis, sarcomas, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer microcítico de pulmón, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y tumores pineales, linfoma de linfocitos T, cáncer de testículos, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter, cáncer transicional de la pelvis renal y el uréter, tumor trofoblástico, cáncer de uréter y de células de la pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de vagina, glioma de la vía óptica e hipotalámico, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser útiles para inhibir el crecimiento tumoral. El método para inhibir el crecimiento tumoral descrito en el presente documento puede comprender poner en contacto la célula con un anticuerpo que contiene MRD *in vitro*. Por ejemplo, se cultiva una línea celular inmortalizada o una línea celular de cáncer que expresa una diana de MRD y/o una diana de anticuerpo en medio al que se añade el anticuerpo que contiene MRD para inhibir el crecimiento tumoral. Pueden aislarse células tumorales de una muestra de paciente, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural o una muestra de sangre y se cultiva en medio al que se le añade un anticuerpo que contiene MRD para inhibir el crecimiento tumoral.

El método para inhibir el crecimiento tumoral descrito en el presente documento puede comprender poner en contacto el tumor o las células tumorales con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD *in vivo*. Puede llevarse a cabo la puesta en contacto de un tumor o una célula tumoral en un modelo animal. Por ejemplo, pueden administrarse composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) a xenoinjertos en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones NOD/SCID) para inhibir el crecimiento tumoral. Pueden aislarse células madre de cáncer de una muestra de paciente, por ejemplo, una biopsia de tejido, efusión pleural o una muestra de sangre e inyectarse en ratones inmunocomprometidos a los que después se administra un anticuerpo que contiene MRD para inhibir el crecimiento tumoral. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse al mismo tiempo o poco después de la introducción de las células tumorigénicas en el animal para prevenir el crecimiento tumoral. El anticuerpo que contiene MRD puede administrarse como agente terapéutico después de haberse cultivado las células tumorigénicas hasta un tamaño específico.

El método para inhibir el crecimiento tumoral descrito en el presente documento puede comprender administrar a un paciente (sujeto) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD. El paciente puede ser un ser humano. El paciente puede tener un tumor o puede habersele extirpado un tumor. El tumor puede expresar una diana del anticuerpo. El tumor puede sobreexpresar la diana del MRD y/o la diana del anticuerpo.

El crecimiento tumoral inhibido puede seleccionarse entre el grupo que consiste en tumor cerebral, tumor colorrectal, tumor pancreático, tumor de pulmón, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor gastrointestinal, melanoma, tumor de cuello de útero, tumor de vejiga, glioblastoma y tumor de cabeza y cuello. El tumor puede ser un tumor de mama.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser útiles para reducir la tumorigenicidad. Por lo tanto, el método para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un paciente descrito en el presente documento puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) al paciente. El tumor puede comprender células madre de cáncer. Puede reducirse la frecuencia de las células madre de cáncer en el tumor mediante la administración de la composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD).

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser útiles para diagnosticar, tratar o prevenir un trastorno del sistema inmunitario. El trastorno del sistema inmunitario puede ser inflamación o un trastorno inflamatorio. El trastorno inflamatorio puede seleccionarse entre el grupo que consiste en asma, trastornos alérgicos y artritis reumatoide. El trastorno del sistema inmunitario puede ser una enfermedad autoinmunitaria. Los trastornos, enfermedades o afecciones autoinmunitarias que pueden diagnosticarse, tratarse o prevenirse usando composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) incluyen, pero sin limitación, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmunitaria neonatal, púrpura trombocitopenia idiopática, neutropenia autoinmune, autoinmuncitopenia, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípido, dermatitis, enteropatía por sensibilidad al gluten, encefalomiелitis alérgica, miocarditis, policondritis recidivante, enfermedad cardíaca reumática, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía por IgA), esclerosis múltiple, neuritis, uveítis oftálmica, poliendocrinopatías, púrpura (por ejemplo, púrpura de Henoch-schoenlein), enfermedad de Reiter, síndrome de Stiff-Man, inflamación pulmonar autoinmune, miocarditis, glomerulonefritis por IgA, enfermedad por depósitos densos, enfermedad cardíaca reumática, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus insulino dependiente y ojo inflamatorio autoinmunitario, tiroiditis autoinmune, hipotiroidismo (es decir, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso sistémico, lupus discoide, síndrome de Goodpasture, pénfigo, autoinmidades por receptor, por ejemplo, (a) enfermedad de Graves, (b) miastenia grave y (c) resistencia a la insulina, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, artritis reumatoide, esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno, enfermedad del tejido conectivo mixto, polimiositis/dermatomiositis, anemia pernicioso, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad, glomerulonefritis, tal como, glomerulonefritis primaria y nefropatía por IgA, pénfigo

ampollosos, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus y resistencia a fármacos adrenérgicos (incluyendo resistencia a fármacos adrenérgicos con asma o fibrosis quística), hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, otras insuficiencias glandulares endocrinas, vitiligo, vasculitis, síndrome de cardiectomía posterior a IM, urticaria, dermatitis atópica, asma, miopatías inflamatorias y otros trastornos inflamatorios, granulomatosos, degenerativos y atróficos.

El trastorno del sistema inmunitario diagnosticado, tratado o prevenido usando las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, diabetes, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple y artritis reumatoide. La enfermedad autoinmunitaria puede ser artritis reumatoide.

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno metabólico.

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno cardiovascular. Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a un paciente para tratar trombosis, aterosclerosis, infarto de miocardio o apoplejía.

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno musculoesquelético.

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno esquelético. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede administrarse a un paciente para tratar la osteoporosis.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a (1) una diana en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral) y (2) una diana en un leucocito, tal como, una molécula receptora de linfocitos T. Puede usarse la unión a una o más dianas por parte de la composición multiespecífica multivalente y monovalente para dirigir una respuesta inmunitaria hacia un agente infeccioso, célula, tejido u otra ubicación de interés en un paciente. Por ejemplo, un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana en la superficie de una célula efectora. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana en la superficie de un linfocito T. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD3. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD2. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse al receptor de linfocitos T (TCR). Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a una diana en la superficie de un linfocito citolítico natural. Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a un receptor de NKG2D (grupo 2D de citolíticos naturales). Un MRD de la composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a CD16 zeta (es decir, Fc gamma RIII) CD64 (es decir, Fc gamma RI) o CD32 (es decir, Fc gamma RII). La composición multiespecífica puede contener más de un sitio de unión mono-específico para diferentes dianas.

Por lo tanto, una composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, un anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a una diana en un leucocito y a un antígeno tumoral en una célula tumoral. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a NKG2D. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a NKG2D y a una diana seleccionada entre ErbB2, EGFR, IGF1R, CD19, CD20, CD80 y EPCAM. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD3. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD3 épsilon. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD3 y a una diana seleccionada entre ErbB2, EGFR, IGF1R, CD19, CD20, CD80 y EPCAM. El anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD4. Un anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD4 y a una diana seleccionada entre ErbB2, EGFR, IGF1R, CD19, CD20, CD80 y EPCAM.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión (es decir, es mono-específica) para una diana. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión (es decir, es mono-específica) para una diana en un leucocito, tal como un linfocito T (por ejemplo, CD3) y se une a una diana en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula tumoral, tal como, una diana divulgada en el presente documento).

La divulgación describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente que tiene un solo sitio de unión (es decir, es mono-específica) para una diana. La composición multiespecífica multivalente y monovalente administrada puede tener un solo sitio de unión (es decir, es mono-específica) para una diana en un leucocito, tal como un linfocito T (por ejemplo, CD3) y se une a una diana en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un

antígeno asociado con tumores en una célula tumoral). La célula tumoral puede ser de un cáncer seleccionado entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, leucemia, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y cáncer de tiroides.

5

La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición multiespecífica multivalente y monovalente para tratar a una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado entre cánceres de cerebro, una enfermedad neurodegenerativa, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica y Neuro-SIDA (por ejemplo, demencia asociada al SIDA) también se describe. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar un cáncer cerebral, un cáncer metastásico del cerebro o un cáncer primario del cerebro. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar una lesión cerebral, apoplejía, lesión de la médula espinal o control del dolor. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar una lesión cerebral, apoplejía, lesión de la médula espinal o para el control del dolor.

10

15

Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición multiespecífica multivalente y monovalente a un paciente para tratar una infección o un síntoma asociado con una infección causada por un agente infeccioso. La infección puede estar causada por un miembro seleccionado entre apopavirus (por ejemplo, JC polyomavirus), tripanosomas, virus del Nilo Occidental, VIH, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, encefalopatía espongiiforme bovina, meningitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), tripanosomiasis neurológica en estadio tardío, encefalitis y rabia.

20

La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) y unirse a una diana ubicada en el lado cerebral de la BBB. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión que se une a una diana (por ejemplo, ligando, receptor o proteína accesoria) asociada con un sistema de transporte mediado por un receptor de la BBB. Un único sitio de unión de la composición puede ser un MRD. Un sitio de unión individual de la composición puede ser un dominio de unión a antígeno de anticuerpo. La composición multiespecífica multivalente y monovalente contiene 1, 2, 3, 4, 5 o más sitios de unión individuales (es decir, se une de manera monovalente) para una diana asociada con un sistema de transporte mediado por receptores de la BBB y la composición puede ser capaz de atravesar al lado del fluido cefalorraquídeo de la BBB. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o más sitios de unión múltiples (es decir, se une de manera multivalente) para una diana asociada con un sistema de transporte mediado por receptores de la BBB y la composición es capaz de atravesar al lado del fluido cefalorraquídeo de la BBB. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que contiene MRD a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado entre cáncer de cerebro, una enfermedad neurodegenerativa, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica y Neuro-SIDA (por ejemplo, demencia asociada al SIDA). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener un solo sitio de unión (es decir, es monovalente por la unión a una diana (antígeno) particular) o dos o más sitios de unión (es decir, es monovalente para la unión a una diana particular) para una diana seleccionada entre alfa-sinucleína, RGM A, NOGO A, NgR, OMGP MAG, CSPG, semaforinas inhibitoras de neuritas (por ejemplo, semaforina 3A y semaforina 4), una efrina, A-beta, AGE (S100 A, anfoterina), NGF, A-B soluble, aggrecan, midkine, neurocan, versican, fosfacan, Te38 y PGE2. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede tener adicionalmente un solo sitio de unión o múltiples sitios de unión para una diana seleccionada entre IL1, IL1R, IL6, IL6R, IL12, IL18, IL23, TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), CD45RB, CD52, CD200, VEGF, VLA4, TNF alfa, Interferón gamma, GMCSF, FGF, C5, CXCL13, CCR2, CB2, MIP1a y MCP-1.

25

30

35

40

45

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede ser capaz de transferirse al lado del fluido cefalorraquídeo de la BBB y se administra a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado entre: cáncer de cerebro, una enfermedad neurodegenerativa, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica y Neuro-SIDA (por ejemplo, demencia asociada al SIDA). La divulgación describe el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante la administración de un anticuerpo que contiene MRD que tiene un solo sitio de unión (es decir, es monoespecífico) para una diana a un paciente que lo necesite. El anticuerpo que contiene MRD administrado puede tener un solo sitio de unión (es decir, es monoespecífico) para una diana en un leucocito, tal como un linfocito T (por ejemplo, CD3) y puede unirse a una diana en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno asociado con tumores en una célula tumoral).

50

55

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno neurológico seleccionado entre cáncer de cerebro, una enfermedad neurodegenerativa, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica y Neuro-SIDA (por ejemplo, demencia asociada al SIDA). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar un cáncer cerebral, un cáncer metastásico del cerebro o un cáncer primario del cerebro. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede administrarse a un paciente para tratar una lesión cerebral, apoplejía, lesión de la médula

60

65

espinal o dolor. Por lo tanto, la enfermedad, trastorno o afección tratada o prevenida con un anticuerpo que contiene MRD o un MRD de la divulgación puede ser neurológica. La enfermedad, trastorno o lesión neurológica puede estar asociada con el dolor, tal como, dolor agudo o dolor crónico.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4 o 5 dianas asociadas con una enfermedad o trastorno neurológico. La composición multiespecífica multivalente y monovalente (por ejemplo, anticuerpo que contiene MRD) puede unirse a 1, 2 o las 3 dianas RGM A; NgR y NogoA. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a 1, 2, 3 o los 4 de RGM A, RGM B y semaforina 3A o semaforina 4. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4 o 5 dianas seleccionadas entre aggrecán, midkine, neurocan, versican, fosfacan, Te38, TNF alfa, NogoA, RGM A, MAG y OMGP. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4 o 5 dianas seleccionadas entre aggrecán, midkine, neurocan, versican, fosfacan, Te38 y TNF alfa. La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4 o 5 dianas seleccionadas entre NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG y Omgp. La composición multiespecífica multivalente y monovalente pueden unirse a al menos 1, 2, 3, 4 o 5 dianas seleccionadas entre NGF, prostaglandina E2 (PGE2), TNF-alfa, IL1 beta e IL6R.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4 o 5 dianas seleccionadas entre alfa-sinucleína, RGM A y uno o más mediadores proinflamatorios (por ejemplo, TNF alfa, IL1 y MCP-1). Dichas composiciones tienen aplicaciones en, por ejemplo, el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como, Parkinson.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a y antagonizar (es decir, es un antagonista de por ejemplo, inhibe la actividad de) 1, 2, 3, 4 o 5 dianas seleccionadas entre RMG A, Nogo A, semaforinas inhibitoras de neuritas (por ejemplo, semaforina 3A and semaforina 4), efrinas y dianas proinflamatorias (por ejemplo, IL12, TNFSF12 (TWEAK), IL23, CXCL13, TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (LIGANDO DE CD40), IL18, VEGF, VLA4, TNF alfa, CD45RB, CD200, interferón gamma, GMCSF, FGF, C5, CD52 y CCR2). La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a y antagonizar 1, 2, 3, 4 o 5 dianas seleccionadas entre CD3, IL2, IL2R, IL6, IL6R, IL10, IL12p40, IL23, TGF beta, TNFRSF21 (DR6), fn14, CD20, LINGO, CXCL13 y CCL2. Las composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de, por ejemplo, inflamación, neuroregeneración y trastornos neurodegenerativos, tales como EM). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen a al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas dianas también están abarcadas por la invención. El componente de anticuerpo del anticuerpo que contiene MRD puede unirse a CD3, CD20, CD52, VLA4, TNF, TNFRSF21 (DR6), LINGO, CD3, interferón gamma o IL6.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a y antagonizar (es decir, es un antagonista de) 1, 2, 3, 4 o 5 dianas seleccionadas entre AGE (S100 A, anfoterina), citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL1, IL6 y TNF), quimiocinas (por ejemplo, MCP 1), y moléculas que inhiben la regeneración neural (por ejemplo, Nogo y RGM A). Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas crónicas, tales como, Alzheimer. La composición de la invención puede unirse a al menos 1, 2, 3, 4 o 5 dianas que tienen influencia en la generación y supervivencia neural, incluyendo, por ejemplo, agonistas de NGF, antagonistas de IL1 o IL1R y A-beta. Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas crónicas, tales como, Alzheimer.

La composición de la divulgación puede unirse a y antagonizar 1, 2, 3, 4 o 5 dianas que interfieren con la regeneración o la recuperación neural, incluyendo NogoA, OMGP MAG, RGM A, CSPG, una o más semaforinas inhibitoras de astrocitos (por ejemplo, semaforina 3A y semaforina 4), efrinas y citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL1, IL6 y TNF). Estas composiciones tienen aplicaciones en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y lesiones o traumatismos neurales.

La composición multiespecífica multivalente y monovalente puede unirse a y antagonizar (es decir, es un antagonista de) 1, 2, 3, 4 o 5 dianas asociadas con el dolor, incluyendo, pero sin limitación, NGF y SCN9A/NAV1.7. Dichas composiciones tienen aplicaciones en, por ejemplo, el tratamiento o el alivio del dolor y de afecciones asociadas con el dolor.

Las dianas a las que se unen las composiciones de la divulgación pueden unirse a y antagonizar 1, 2, 3, 4, 5 o más mediadores y/o dianas solubles o de la superficie celular implicadas en la inhibición del crecimiento o recuperación de neuritas. Las composiciones de la divulgación pueden unirse a y antagonizar 1, 2, 3, 4, 5 o más dianas seleccionadas entre Nogo, Ompg, MAG, RGM A, semaforinas, efrinas, A-b soluble, citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL1 y TNF alfa), quimiocinas (por ejemplo, MIP 1a).

La divulgación describe un método para tratar o aliviar el dolor mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo de unión a diana de dolor, a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar el dolor mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo de unión a NGF, a un paciente que lo necesite. La divulgación

describe un método para tratar o aliviar el dolor mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de tanezumumab (por ejemplo, Pfizer) que comprende un MRD, a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar o aliviar el Alzheimer mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo de unión a diana de Alzheimer, a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar el Alzheimer mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo de unión a beta-amiloide, a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar el Alzheimer mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de RN1219 (PF-4.360.365; Pfizer) que comprende un MRD, a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar o aliviar la esclerosis múltiple mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo de unión a diana de la esclerosis múltiple, a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar la esclerosis múltiple mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo de unión LINGO, a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar la esclerosis múltiple mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo que se une a LINGO y TNFRSF21 (DR6) a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar la esclerosis múltiple mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo LINGO de Biogen que comprende un MRD, a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar la esclerosis múltiple mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de natalizumab (por ejemplo, TYSABRI®; Biogen) que comprende un MRD, a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar la esclerosis múltiple mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo LINGO de Biogen que comprende un MRD, a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar o aliviar la esclerosis múltiple mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-anticuerpo de unión a CD20, a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar o aliviar la esclerosis múltiple mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ocrelizumab (Biogen Idec) que comprende un MRD, a un paciente que lo necesite.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden ser útiles para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse con las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) incluyen, pero sin limitación, enfermedades asociadas con infecciones por levaduras, fúngicas, víricas y bacterianas. Los virus que provocan infecciones víricas que pueden tratarse o prevenirse con las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) incluyen, pero sin limitación, retrovirus (por ejemplo, virus linfotróficos de linfocitos T humanos (HTLV) de tipos I y II y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)), virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple (VHS) de tipos I y II, virus de Epstein-Barr, HHV6-HHV8 y citomegalovirus), adenovirus (por ejemplo, virus de la fiebre de lassa), paramixovirus (por ejemplo, virus morbilbivirus, virus sincitial respiratorio humano, paperas y neumovirus), adenovirus, bunyavirus (por ejemplo, hantavirus), coronavirus, filovirus (por ejemplo, virus del Ébola), flavivirus (por ejemplo, virus de la hepatitis C (VHC), virus de la fiebre amarilla y virus de la encefalitis japonesa), hepadnavirus (por ejemplo, virus de la hepatitis B (VHB)), ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe A, B y C (incluyendo gripe aviar, por ejemplo, el subtipo H5N1)), papovavirus (por ejemplo, papillomavirus), picomavirus (por ejemplo, rinovirus, enterovirus y virus de la hepatitis A), poxvirus, reovirus (por ejemplo, rotavirus), togavirus (por ejemplo, virus rubella), rhabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia). Los patógenos microbianos que provocan infecciones bacterianas incluyen, pero sin limitación, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema caratenum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia spp.*, y *Helicobacter pylori*.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) pueden administrarse a un paciente para tratar o prevenir la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el SIDA, botulismo, ántrax o *Clostridium difficile*.

VIII. Compuestos unidos a MRD que no son anticuerpos

Pueden unirse operablemente uno o más MRD de la invención al extremo amino y/o carboxilo de un fragmento de inmunoglobulina, tal como Fab, Fab', F(ab')₂, pFc' o Fc. Los MRD pueden estar unidos operablemente a un polipéptido de Fab o Fc que contiene un dominio de Ig adicional. Los MRD pueden unirse operablemente al extremo

amino y/o carboxilo de un fragmento de inmunoglobulina que también está unido operablemente a un scFv. Los MRD de la invención pueden unirse operablemente a una proteína de fusión de Fc.

Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete a diez o más de diez MRD pueden unirse operablemente al extremo amino y/o al extremo carboxilo del fragmento de inmunoglobulina. Estos MRD están unidos opcionalmente entre sí o al fragmento de inmunoglobulina a través de un enlazador. Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete a diez o más de diez, de los MRD unidos operablemente al extremo amino y/o al extremo carboxilo del fragmento de inmunoglobulina pueden ser iguales. Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete a diez o más de diez, de los MRD unidos operablemente al extremo amino y/o al extremo carboxilo del fragmento de inmunoglobulina pueden ser diferentes.

Los MRD unidos operablemente al fragmento de inmunoglobulina pueden ser monoméricos (es decir, contienen un MRD en el extremo de una cadena de péptido conectado opcionalmente a través de un enlazador) o multiméricos (es decir, contienen más de un MRD en tándem, conectado opcionalmente mediante un enlazador). Los MRD pueden ser homomultiméricos (es decir, contienen más del mismo MRD en tándem, conectado opcionalmente mediante enlazadores (por ejemplo, homodímeros, homotrímeros, homotetrámeros)) o heteromultiméricos (es decir, contienen dos o más MRD en los que hay al menos dos MRD conectados opcionalmente mediante enlazadores, donde todos o algunos de los MRD unidos a un extremo particular son diferentes (por ejemplo, heterodímero)). Pueden ubicarse dos MRD monoméricos diferentes los diferentes extremos del fragmento de inmunoglobulina. Tres, cuatro, cinco, seis o más MRD monoméricos diferentes pueden estar ubicados en diferentes extremos del fragmento de inmunoglobulina.

El anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD dimérico y uno monomérico ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina. El anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD homodimérico y uno monomérico ubicado en diferentes extremos de inmunoglobulina. El anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD heterodimérico y un MRD monomérico ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina.

El anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD multimérico y un MRD monomérico ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina. El anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD homomultimérico y un MRD monomérico ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina. El anticuerpo que contiene MRD puede contener al menos un MRD heteromultimérico y un MRD monomérico ubicados en diferentes extremos de la inmunoglobulina.

Los múltiples MRD que están unidos operablemente al fragmento de inmunoglobulina pueden dirigirse al mismo sitio de unión a la diana o a dos o más sitios de unión a diana diferentes. En los casos donde los MRD se unen a sitios de unión a diana diferentes, los sitios de unión pueden encontrarse en la misma molécula diana o en dianas diferentes. De manera similar, uno o más de los MRD pueden unirse a la misma diana que el fragmento de inmunoglobulina.

Al menos uno de los MRD y en caso aplicable, el fragmento de inmunoglobulina (por ejemplo, en los casos en los que el fragmento de inmunoglobulina sea un Fab), pueden unirse a sus dianas de manera simultánea. Dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez de los MRD y en caso de ser aplicable, el fragmento de inmunoglobulina, pueden unirse a sus dianas de manera simultánea.

La síntesis de los MRD unidos operablemente a un fragmento de inmunoglobulina y el ensayo de estos MRD y fragmentos de inmunoglobulina respecto de su capacidad para unirse a o de competir por la unión a una o más dianas de manera simultánea puede lograrse de manera rutinaria usando métodos divulgados en el presente documento o de otro modo conocidos en la técnica.

Uno o más de los MRD unidos operablemente o el fragmento de inmunoglobulina, pueden unirse a VEGF. Uno o más de los MRD unidos operablemente o el fragmento de inmunoglobulina, pueden unirse al mismo epítipo que ranibizumab (LUCENTIS®, Genentech). Uno o más de los MRD unidos operablemente o el fragmento de inmunoglobulina, pueden inhibir de manera competitiva la unión de ranibizumab a VEGF. El fragmento de inmunoglobulina puede ser un Fab. El fragmento de inmunoglobulina puede ser ranibizumab.

La divulgación describe un método para tratar la degeneración macular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una fusión de MRD-fragmento de inmunoglobulina de unión a VEGFA o VEGFR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la degeneración macular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una fusión de MRD-Fab de unión a VEGFA o VEGFR a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la degeneración macular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-ranibizumab a un paciente que lo necesite.

Los uno o más MRD de la divulgación pueden estar unidos operablemente al extremo amino y/o carboxilo de una proteína de fusión de Fc. La proteína de fusión de Fc puede contener fusiones para cualquier proteína o secuencia de polipéptido con valor terapéutico, por ejemplo, cualquiera de las dianas o receptores de las dianas descritas en el presente documento. Por ejemplo, las fusiones pueden contener el dominio extracelular de receptores o ligandos que normalmente funcionan o presentan unión mejorada a los compañeros afines en forma multimérica, incluyendo, por ejemplo, receptores correspondientes a la superfamilia de TNF-R (por ejemplo, TNFR2, TACI, BCMA, HVEM,

etc.), la superfamilia de receptor de IL (por ejemplo, IL1-R-IL6R), la superfamilia de VEGFR (por ejemplo, VEGFR1-VEGR3), la superfamilia de FGRFR (por ejemplo, FGFR1-FGFR4), y la superfamilia de B7 (por ejemplo, CTLA)).

Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más MRD pueden unirse operablemente a una proteína de fusión de VEGFR1/VEGFR2-Fc. Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden unirse al mismo epítipo que aflibercept (Regeneron). Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden inhibir de manera competitiva la unión de aflibercept a VEGFA o PLGF. Los MRD pueden estar unidos operablemente a aflibercept.

La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-VEGFR1/VEGFR2-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el cáncer colorrectal, el cáncer de próstata o el cáncer de pulmón no microcítico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de MRD-Fc de unión a VEGFA o PLGF a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la degeneración macular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de MRD-Fc de unión a VEGFA o PLGF e irinotecán, 5FU, oxaliplatino, docetaxel o FOLFOX6, a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-aflibercept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el cáncer colorrectal, el cáncer de próstata o el cáncer de pulmón no microcítico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-aflibercept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la degeneración macular que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-aflibercept e irinotecán, 5FU, oxaliplatino, docetaxel o FOLFOX6, a un paciente que lo necesite.

Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más MRD pueden unirse operablemente a una proteína de fusión de CTLA4-Fc. Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden unirse al mismo epítipo que abatacept (ORENCIA®). Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden inhibir de manera competitiva la unión de abatacept a CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2). Los MRD pueden estar unidos operablemente a abatacept. Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden unirse al mismo epítipo que belatacept (Bristol Myers Squibb). Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden inhibir de manera competitiva la unión de belatacept a CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2). El fragmento de inmunoglobulina puede ser un Fab. Los MRD pueden estar unidos operablemente a belatacept.

La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-CTLA4-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-abatacept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un MRD-abatacept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria a un rechazo de injerto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-abatacept a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-belatacept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria a un rechazo de injerto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-belatacept a un paciente que lo necesite.

Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más MRD pueden unirse operablemente a una proteína de fusión de TNFR2-Fc. Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden unirse al mismo epítipo que etanercept (ENBREL®). Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden inhibir de manera competitiva la unión de etanercept a TNF alfa. Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden unirse a ANG2. Los MRD pueden estar unidos operablemente a etanercept.

La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TNFR2-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TNFR2-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TNFR2-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TNFR2-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TNFR2-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TNFR2-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TNFR2-Fc a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-etanercept-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-etanercept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-etanercept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar un trastorno inflamatorio, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-etanercept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la enfermedad de Crohn, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-etanercept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la colitis ulcerosa, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-etanercept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la psoriasis o la artritis idiopática juvenil mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de MRD-etanercept a un paciente que lo necesite.

Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más MRD pueden unirse operablemente a una proteína de fusión de TACI-Fc. Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden unirse al mismo epítipo que atacicept (Merck/Serono). Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden inhibir de manera competitiva la unión de atacicept a BLyS o APRIL. Los MRD pueden estar unidos operablemente a atacicept.

La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TACI-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TACI-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TACI-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-TACI-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para suprimir una respuesta inmunitaria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-atacicept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-atacicept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar la artritis reumatoide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-atacicept a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para tratar el lupus eritematoso sistémico, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una de proteína de fusión MRD-atacicept a un paciente que lo necesite.

Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más MRD pueden unirse operablemente a una proteína de fusión de IL1R-Fc. Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden unirse al mismo epítipo que rilonacept (Regeneron). Uno o más de los MRD unidos operablemente pueden inhibir de manera competitiva la unión de rilonacept a IL1R. Los MRD pueden estar unidos operablemente a rilonacept.

La divulgación describe un método para prevenir la gota que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-IL1R-Fc a un paciente que lo necesite. La divulgación describe un método para prevenir la gota que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión MRD-rilonacept-Fc a un paciente que lo necesite.

La divulgación describe un complejo que comprende un anticuerpo y al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD), en donde el MRD comprende al menos dos cisteínas, en donde una primera cisteína está ubicada dentro de los diez primeros aminoácidos del MRD, una segunda cisteína está ubicada dentro de los diez últimos aminoácidos del MRD y en donde el MRD comprende al menos cinco aminoácidos entre dicha primera cisteína y dicha segunda cisteína. El MRD puede comprender al menos 10, 15, 20 o 25 aminoácidos entre la primera cisteína y la segunda cisteína. El MRD puede comprender al menos una prolina entre la primera cisteína y la segunda cisteína. El MRD puede comprender al menos dos prolinas entre la primera cisteína y la segunda cisteína. La primera cisteína puede encontrarse a no más de 5, 3, 3, 2 o 1 aminoácido de distancia desde el extremo N-terminal del complejo. La segunda cisteína se encuentra a no más de 5, 3, 3, 2 o 1 aminoácidos de distancia desde el extremo C-terminal del complejo. Puede aumentarse la semivida *in vivo* de un MRD en un complejo de la invención en comparación con la semivida de un MRD en un complejo correspondiente, en donde al menos una de las cisteínas está mutada o eliminada. La afinidad de unión del MRD puede ser al menos igual a la afinidad de unión de un MRD en un complejo correspondiente, en donde al menos una de las cisteínas está mutada o eliminada.

La invención abarca un complejo que comprende un anticuerpo y al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD), en donde el anticuerpo y el MRD se unen a diferentes dianas o epítopos en la misma célula o molécula, en donde la unión al MRD agoniza o antagoniza a la diana del MRD en condiciones fisiológicas y en donde dicho MRD no se une a ni agoniza o antagoniza dicha diana de MRD en condiciones fisiológicas en ausencia de dicho anticuerpo. Un MRD en el complejo de la invención puede unirse a la diana del MRD en ausencia del anticuerpo con una CE50 de más de 0,01 nM, 0,1 nM, 0,5 nM o 0,7 nM en condiciones fisiológicas.

La invención abarca un complejo que comprende un anticuerpo y al menos un MRD, en donde el anticuerpo y el MRD se unen a diferentes dianas o epítomos en una proteína heteromérica u homomérica, en donde la unión al MRD agoniza o antagoniza a la diana del MRD en condiciones fisiológicas y en donde dicho MRD no se une a ni agoniza o antagoniza dicha diana de MRD en condiciones fisiológicas en ausencia del anticuerpo. Un MRD en el complejo de la invención puede unirse a la diana del MRD con una CE50 de más de 0,01 nM, 0,1 nM, 0,5 nM o 0,7 nM en condiciones fisiológicas.

La invención abarca un método para inhibir el crecimiento de una célula que comprende poner en contacto la célula con un complejo multiespecífico y multivalente que comprende un anticuerpo y al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD) y un inhibidor de proteína cinasa. El anticuerpo puede unirse a una diana seleccionada entre: VEGF, VEGFR1, EGFR, ErbB2, IGF-IR, cMET, FGFR1 y FGFR2. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir una diana del anticuerpo que contiene MRD. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir una diana diferente a la del anticuerpo que contiene MRD. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a más de una proteína cinasa. El inhibidor de proteína cinasa puede ser un miembro seleccionado entre: imatinib, gefitinib, vandetanib, erlotinib, sunitinib, lapatinib y sorafenib.

La divulgación describe un método para inhibir la angiogénesis en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo multiespecífico y multivalente que comprende un anticuerpo y al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD) y un inhibidor de proteína cinasa. El anticuerpo puede unirse a una diana seleccionada entre: VEGF, VEGFR1, EGFR, ErbB2, IGF-IR, cMET, FGFR1 y FGFR2. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir una diana del anticuerpo que contiene MRD. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir una diana diferente a la del anticuerpo que contiene MRD. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a más de una proteína cinasa. El inhibidor de proteína cinasa puede ser un miembro seleccionado entre: imatinib, gefitinib, vandetanib, erlotinib, sunitinib, lapatinib y sorafenib.

La divulgación describe un método para tratar a un paciente que tiene cáncer que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo multiespecífico y multivalente que comprende un anticuerpo y al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD) y un inhibidor de proteína cinasa. El anticuerpo puede unirse a una diana seleccionada entre: VEGF, VEGFR1, EGFR, ErbB2, IGF-IR, cMET, FGFR1 y FGFR2. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir una diana del anticuerpo que contiene MRD. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir una diana diferente a la del anticuerpo que contiene MRD. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a más de una proteína cinasa. El inhibidor de proteína cinasa puede ser un miembro seleccionado entre: imatinib, gefitinib, vandetanib, erlotinib, sunitinib, lapatinib y sorafenib.

La divulgación describe un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo multiespecífico y multivalente que comprende un anticuerpo y al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD) y un inhibidor de proteína cinasa. La enfermedad o el trastorno del sistema inmunológico puede ser inflamación o una enfermedad autoinmunitaria. La enfermedad autoinmunitaria puede ser artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, diabetes, colitis ulcerosa o esclerosis múltiple. El anticuerpo puede unirse a TNF. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a una diana que no es una diana del anticuerpo que contiene MRD. El inhibidor de proteína cinasa puede inhibir a más de una proteína cinasa. El inhibidor de proteína cinasa puede ser un miembro seleccionado entre: lestaurtinib, tofacitinib, ruxolitinib, SB1518, CYT387, LY3009104, TG101348, fostamatinib, BAY 61-3606 y sunitinib.

La invención puede abarcar un complejo multivalente y multiespecífico que comprende un anticuerpo y al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD), en donde el complejo tiene un solo sitio de unión para una diana de la superficie celular. El complejo multivalente y multiespecífico puede comprender 2 sitios de unión a diana para diferentes epítomos en la misma diana. El complejo multivalente y multiespecífico puede tener 2, 3, 4, 5 o más sitios de unión a antígeno individuales para las diferentes dianas. El complejo multivalente y multiespecífico puede tener un solo sitio de unión para una diana en un leucocito. El complejo multivalente y multiespecífico puede tener un solo sitio de unión para una diana en un linfocito T. El complejo multivalente y multiespecífico puede tener un solo sitio de unión para CD3. El complejo puede tener un solo sitio de unión para CD3 épsilon. El complejo puede tener un solo sitio de unión para una diana en un linfocito citotóxico natural. El complejo puede tener múltiples sitios de unión para una diana en una célula enferma. El complejo puede tener múltiples sitios de unión para 2, 3, 4, 5 o más dianas en una célula enferma. El complejo puede tener múltiples sitios de unión para una diana en una célula tumoral. El complejo puede tener múltiples sitios de unión para una diana en una célula inmunitaria. El complejo puede tener múltiples sitios de unión para 2, 3, 4, 5 o más dianas en una célula inmunitaria. El complejo puede tener un solo sitio de unión para una diana en un linfocito citotóxico natural. El complejo puede unirse a una diana en un leucocito y una diana en una célula tumoral. El complejo puede unirse a CD3 y CD19. El complejo puede tener múltiples sitios de unión para una diana en un agente infeccioso o una célula infectada con un agente infeccioso. El complejo puede tener múltiples sitios de unión para 2, 3, 4, 5 o más dianas en un agente infeccioso o una célula infectada con un agente infeccioso. El complejo puede tener un solo sitio de unión para una diana asociada con un sistema de transporte endógeno mediado por receptores de la barrera hematoencefálica (BBB). El complejo puede tener múltiples sitios de unión para una diana asociada con un sistema de transporte mediado por receptores de la BBB. El complejo puede tener

múltiples sitios de unión para 2, 3, 4, 5 o más dianas asociadas con un sistema de transporte endógeno mediado por receptores de la BBB. El único sitio de unión puede ser un MRD. El sitio de unión individual puede ser un dominio de unión a antígeno.

5 El complejo de la divulgación puede comprender un agente citotóxico.

El polinucleótido que codifica una cadena pesada o una cadena ligera del anticuerpo que contiene MRD de la invención, los vectores que comprenden estos polinucleótidos y las células hospedadoras que contienen estos vectores también están abarcados por la invención.

10 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplos

15 Ejemplo de referencia 1. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina

Se prepararon moléculas de fusión de anticuerpo-MRD novedosas por fusión de un péptido dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ a un anticuerpo catalítico 38C2. Las fusiones en los extremos N y los extremos C de la cadena ligera y los extremos C de la cadena pesada fueron las más eficaces. Usando citometría de flujo, los conjugados de anticuerpo demostraron unirse de forma eficaz a células de cáncer de mama humano que expresa integrina $\alpha\beta 3$. Los conjugados de anticuerpo también retenían la actividad retro-aldol de su anticuerpo catalítico precursor 38C2, medida por activación de profármaco metotol y doxorubicina. Esto demuestra que la capacidad de dirección celular y de anticuerpo catalítico pueden combinarse de forma eficaz para quimioterapia selectiva.

25 Ejemplo de referencia 2. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a citocina angiogénica

Se construyeron moléculas de fusión de anticuerpo-MRD dirigidas a citocina angiogénica. El anticuerpo usado fue 38C2, que se fusionó con un MRD que contiene el péptido 2xCon4 (AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGST ASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 10)). El péptido que contenía MRD se fusionó al extremo N o C de la cadena ligera y el extremo C de la cadena pesada. Se encontraron resultados similares con los otros péptidos MRD de Ang2. Los péptidos MRD de Ang2 MRD adicionales incluyen: MGAQTNFMPMDNDELLLYEYQFILQQGLEGGSGSTASSGSGSSLGAQTNFMPMDNDELLLY (SEQ ID NO: 20) (LM-2x-32); y AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 10) (2xCon4).

35 Un experto en la materia, dados los contenidos de este documento, apreciará que dichas otras combinaciones crearán MRD de unión a Ang2 funcionales como se describe en este documento.

Ejemplo 3. Fusiones de anticuerpo-MRD con anticuerpos no catalíticos

40 Se ha descrito previamente un anticuerpo monoclonal humanizado de ratón, LM609, dirigido a integrina humana $\alpha\beta 3$ (Rader, C. et. al., PNAS 95:8910-5 (1998)).

Se fusionó un Ab monoclonal no catalítico humano, JC7U a un MRD anti-Ang2 MRD que contenía 2xCon4 (AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 10)) al extremo N o C de la cadena ligera. Se estudió 2xCon4 (AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 10)) en forma de una fusión N-terminal a la cadena Kappa del anticuerpo (2xCon4-JC7U) y en forma de una fusión C-terminal (JC7U-2xCon4). Ambas fusiones mantenían la unión a integrina y a Ang2. Como se muestra en el panel de la izquierda de la figura 3, ambas construcciones de anticuerpo (2xCon4-JC7U y JC7U-2xCon4) se unían específicamente a Ang2 recombinante como se demostró por estudios de ELISA. La unión a Ang2, sin embargo, es significativamente mayor con JC7U-2xCon4, que tiene la fusión 2xCon4 (SEQ ID NO: 10) en el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo. El panel de la derecha de la figura 3 representa la unión de Ang2-JC7U y JC7U-Ang2 a integrina $\alpha\beta 3$. Los resultados muestran que la fusión de 2xCon4 (SEQ ID NO: 10) al extremo N o C de la cadena ligera no afecta a la unión del mAb JC7U a la integrina $\alpha\beta 3$. La figura 4 representa otro estudio de ELISA usando las mismas construcciones de fusión de anticuerpo-MRD.

Ejemplo 4. Moléculas de fusión de HERCEPTIN® - MRD

Otro ejemplo de fusiones de MRD a un anticuerpo no catalítico son construcciones de fusión de HERCEPTIN®-MRD. Las fusiones de HERCEPTIN®-MRD son antagonistas multifuncionales de integrina αv de molécula pequeña y el anticuerpo dirigido a integrina programado químicamente muestra eficacia notable en la prevención de metástasis de cáncer de mama por interferencia con la adhesión celular y proliferación mediada por αv . Las fusiones de MRD que contienen HERCEPTIN®-2xCon4 (dirigidas a ErbB2 y Ang2) y HERCEPTIN®-V114 (dirigidas a ErbB2 y VEGF) y HERCEPTIN®-RGD-4C-2xCon4 (dirigidas a ErbB2, ang2 e integrina) son eficaces.

Ejemplo de referencia 5. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a VEGF

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a VEGF. Se fusionó un MRD que se dirige a v1 14 (SEQ ID NO: 13) al extremo N de la cadena kappa de 38C2 y a HERCEPTIN® usando un enlazador. La expresión y ensayo de las construcciones de fusión resultantes de anticuerpo-MRD demostraron fuerte unión a VEGF.

Ejemplo de referencia 6. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a IGF1R

Se estudió la fusión de un MRD que se dirige a IGF1R (SFYSCLESLVNGPAEKSRG QWDGCRKK (SEQ ID NO: 14)) al extremo N de la cadena kappa de 38C2 y a HERCEPTIN® usando como conector la secuencia de enlazador larga. La expresión y ensayo de las construcciones de fusión resultantes de anticuerpo-MRD demostraron fuerte unión a IGF1R. Se identificaron clones adicionales que mostraban alta unión a IGF1R tras varias rondas de mutagénesis y selección de las regiones descritas en la tabla 4. Las secuencias preferidas listadas en la tabla 5 se unen a IGF1R y no muestran una afinidad de unión significativa o no muestran afinidad de unión al receptor de insulina, lo que sugiere especificidad por IGF1R.

Tabla 4: Molde para mutagénesis adicional.

Nombre	ADN	AA
Rm2-2-218	GTGGAGTGCAGGGCGCCG (SEQ ID NO:50)	VECRAP (SEQ ID NO: 51)
Rm2-2-316	GCTGAGTGCAGGGCTGGG (SEQ ID NO:52)	AECRAG (SEQ ID NO: 53)
Rm2-2-319	CAGGAGTGCAGGACGGGG (SEQ ID NO:54)	QECRTG (SEQ ID NO: 55)

Tabla 5:

Mutante	Secuencia de aminoácidos	Molde	SEQ ID NO
Rm4-31	NFYQCIEMPLASHPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	35
Rm4-33	NFYQCIEQLALRPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	36
Rm4-39	NFYQCIDLLMAYPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	37
Rm4-310	NFYQCIERLVTGPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	38
Rm4-314	NFYQCIEYLAMKPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	39
Rm4-316	NFYQCIEALQSRPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	40
Rm4-319	NFYQCIEALSRPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	41
Rm4-44	NFYQCIEHLSGSPA EKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	42
Rm4-45	NFYQCIESLAGGPA EKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	43
Rm4-46	NFYQCIEALVGVP AEKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	44
Rm4-49	NFYQCIEMLSLPPAEKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	45
Rm4-410	NFYQCIEVFWGRPA EKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	46
Rm4-411	NFYQCIEQLSSGPA EKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	47
Rm4-415	NFYQCIELLSARPA EKSRGQ WAECRAG	Rm2-2-316	48
Rm4-417	NFYQCIEALARTPA EKSRGQWVECRAP	Rm2-2-218	49

Ejemplo 7. Unión a ErbB2. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a Ang2

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD que se dirige a Ang2 (L17) (SEQ ID NO: 7) fusionado a la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2. Se usó la secuencia enlazadora corta, la secuencia enlazadora larga o el 4.º bucle de la región constante de la cadena ligera como enlazador. La figura 5 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a la integrina Ang2 con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido enlazador corto (GGGS (SEQ ID NO: 1)) (L17-sL-Her), en forma de una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido enlazador corto (Her-sL-L17), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo contra ErbB2 con el 4.º bucle en la región constante de cadena ligera (Her-lo-L17) o una fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido enlazador largo (SSGGGSGGGGGSSRSS (SEQ ID NO: 19)) (L17-1L-Her). ErbB2 se unió

con grados variables a todas las construcciones. Sin embargo, Ang2 se unió únicamente a Her-sL-L17 y L17-1L-Her.

Ejemplo 8. Unión al receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a Ang2

Se generó la fusión de un MRD dirigido a Ang2 (L17) (SEQ ID NO: 7) al extremo N o al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo Met, que se une al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. Se usó la secuencia enlazadora corta o la secuencia enlazadora larga como conector. La figura 6 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo Met con el péptido enlazador corto (GGGS (SEQ ID NO: 1)) (L17-sL-Met), fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo Met con el péptido enlazador largo (SSGGGSGGGGGGSSRSS (SEQ ID NO: 19)) (L17-1L-Met) y fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo Met con el péptido enlazador largo (Met-L17). La expresión y el ensayo de las construcciones de fusión resultantes de anticuerpo-MRD demostraron fuerte unión a Ang2 cuando se usaba el péptido enlazador largo. La fusión del MRD dirigido a Ang2 al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo produjo unión ligeramente mayor a Ang2 que la fusión dirigida a Ang2 al extremo N de la cadena ligera del anticuerpo.

Ejemplo de referencia 9. Unión a ErbB2, Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD que se dirige a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD4C) con la secuencia CDCRGDCFC (SEQ ID NO: 106) fusionada a la cadena ligera de un anticuerpo HERCEPTIN® que se une a ErbB2 (Her). Se usó la secuencia enlazadora corta, la secuencia enlazadora larga o el 4.º bucle de la región constante de la cadena ligera como enlazador. La figura 7 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a la integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra ErbB2 con el corto péptido enlazador (GGGS (SEQ ID NO: 1)) (RGD4C-sL-Her), una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido enlazador corto (Her-sL-RGD4C), una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra ErbB2 con el 4.º bucle en la región constante de cadena ligera (Her-lo-RGD4C) o una fusión N-terminal del MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido enlazador largo (SSGGGSGGGGGGSSRSS (SEQ ID NO: 19)) (RGD4C-1L-Her). ErbB2 se unió con grados variables a todas las construcciones. Sin embargo, la integrina $\alpha\beta 3$ se unió únicamente a RGD4C-1L-IL-Her.

Ejemplo de referencia 10. Unión al receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD4C) (SEQ ID NO: 106) fusionado a la cadena ligera de un anticuerpo que se une al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met). Se usaron construcciones de anticuerpo-MRD que contienen la secuencia enlazadora larga. La figura 8 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (RGD4C-1L-Met) o una fusión C-terminal del MRD dirigido a la integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met-1L-RGD4C). El RGD4C-1L-Met demostró fuerte unión a integrina $\alpha\beta 3$.

Ejemplo de referencia 11. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina, de unión a ErbB2

Se construyeron anticuerpos que contienen un MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina (RP) (SEQ ID NO: 14) fusionado a la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2 (Her). Se usó el péptido enlazador corto, el péptido enlazador largo o el 4.º bucle de la región constante de la cadena ligera como enlazador (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 (1992); Patente de los Estados Unidos n.º 5.677.171; y el depósito ATCC 10463). La figura 9 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido enlazador corto (RP-sL-Her), una fusión C-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 y el péptido enlazador corto (Her-sL-RP), una fusión C-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 con el 4.º bucle de la región constante de la cadena ligera (Her-lo-RP), una fusión N-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido enlazador largo (RP-1L-Her) o una fusión C-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido enlazador largo (Her-1L-RP). ErbB2 se unió con grados variables a todas las construcciones. El receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina se unió por RP-1L-Her.

Ejemplo de referencia 12. Unión a ErbB2. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a VEGF

La fusión de un MRD que se dirige a VEGF (VI 14) (SEQ ID NO: 13) (Fairbrother W. J., et al., Biochemistry 37:177754-177764 (1998)) se efectuó en el extremo N de la cadena ligera de un anticuerpo de unión a ErbB2 (Her). Se usó un péptido enlazador mediano (SSGGGSGGGGGGSS (SEQ ID NO: 2)) como conector. La figura 10 representa los resultados de un ELISA usando una construcción que contiene una fusión N-terminal del MRD dirigido

a VEGF con el anticuerpo de unión a ErbB2 con el péptido enlazador mediano (VI 14-mL-Her). La expresión y ensayo de la construcción de fusión de anticuerpo-MRD resultante demostró fuerte unión a VEGF y ErbB2.

Ejemplo de referencia 13. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina

Se estudió la fusión de un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD) (SEQ ID NO: 106) al extremo N de la cadena ligera de 38C2 usando el péptido enlazador mediano como conector. La figura 11 demuestra que la expresión y ensayo de la construcción de fusión de anticuerpo-MRD resultante tenía fuerte unión a integrina $\alpha\beta 3$.

Ejemplo 14. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a Ang2

Se estudió la fusión de un MRD dirigido a Ang2 (L 17) (SEQ ID NO: 7) al extremo C de la cadena ligera de 38C2 usando la secuencia enlazadora corta como conector. La figura 12 demuestra que la expresión y ensayo de la construcción de fusión de anticuerpo-MRD resultante tenía fuerte unión a Ang2.

Ejemplo 15. Unión a ErbB2, Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina y Ang2

Se conectó un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD4C) al extremo N de la cadena ligera de un anticuerpo dirigido a ErbB2 (Her) con un enlazador mediano y se conectó un MRD dirigido a Ang2 (L17) por un enlazador corto al extremo C del mismo anticuerpo dirigido a ErbB2 (RGD4C-mL-Her-sL-L17). La figura 13 demuestra que la construcción de fusión de anticuerpo-MRD resultante se unía a integrina, Ang2 y ErbB2.

De manera similar, anticuerpos dirigidos a ErbB2 (por ejemplo, Her) con un MRD para IGF-1R fusionado al extremo C de la cadena pesada o el extremo N de la cadena ligera se unieron a IGF-1R inmovilizado a tasas comparables. Además, los anticuerpos de unión a ErbB2 que contenían un MRD para IGF-1R fusionado al extremo N de la cadena ligera y un MRD para Ang2 fusionado al extremo C de la cadena pesada se unieron a IGF-1R inmovilizado a tasas comparables. Cada una de estas tres composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) también inhibieron la unión de IGF-1 a IGF-1R inmovilizado. La molécula trispecífica (HERCEPTIN con MDR para IGF-1R y Ang2) se unió a ErbB2 de la superficie celular y a Ang2 soluble.

Ejemplo de referencia 16. Unión a ErbB2, Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD4C) fusionado al extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a ErbB2 (Her) usando el enlazador mediano como conector (RGD4C-mL-her-pesada). La figura 14 representa los resultados de un ELISA usando la construcción. Tanto la integrina como ErbB2 se unieron a la construcción.

Ejemplo 17. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina, Ang2 o al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina y de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos o ErbB2 con el péptido enlazador corto

Se construyeron moléculas de anticuerpo-MRD que contienen anticuerpos de unión a ErbB2 o receptor del factor de crecimiento de hepatocitos y regiones MRD dirigidas a integrina $\alpha\beta 3$, Ang2 o el receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina ligadas con el péptido enlazador corto a la cadena ligera del anticuerpo. La figura 15 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang2 fusionado al anticuerpo contra ErbB2 (L17-sL-Her), una fusión N-terminal de MRD dirigido a integrina con el anticuerpo contra ErbB2 (RGD4C-sL-Her), una fusión N-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo de unión a ErbB2 (RP-sL-Her), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (L17-sL-Met), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo de unión a ErbB2 (Her-sL-L17), una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina con el anticuerpo de unión a ErbB2 (Her-sL-RGD4C) o una fusión C-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo de unión a ErbB2 (Her-sL-RP). ErbB2 se unió con grados variables a las construcciones de anticuerpo-MRD, con la excepción de la construcción que contenía el anticuerpo de unión al receptor de factor de crecimiento de hepatocitos. El antígeno se unió únicamente a la construcción Her-sL-L17.

Ejemplo 18. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina, Ang2 o al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina y de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos o ErbB2 con el péptido enlazador largo

Se construyeron moléculas de anticuerpo-MRD que contienen anticuerpos de unión a ErbB2 o receptor del factor de crecimiento de hepatocitos y regiones MRD dirigidas a integrina $\alpha\beta 3$, Ang2 o el receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina ligadas con el péptido enlazador largo a la cadena ligera del anticuerpo. La figura 16 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang2 fusionado al anticuerpo contra ErbB2 (L17-1L-Her), una fusión N-terminal de MRD dirigido a integrina con el anticuerpo contra ErbB2 (RGD4C-1L-Her), una fusión N-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo de unión a ErbB2 (RP-1L-Her), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (L17-1L-Met), una fusión C-

terminal del MRD dirigido a integrina con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (RGD4C-1L-Met), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo de unión al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina (Her-1L-RP), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang2 con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met-1L-L17) o una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met-1L-RGD4C). Tal como se muestra en la figura 16, las fusiones de anticuerpo-MRD son eficaces para unirse al antígeno y a ErbB2. Lu et al., J. Biol. Chem. 20:280(20):19665-19672 (2005); Lu et al., J. Biol. Chem. 23 de enero de 2004:279(4):2856-65.

Ejemplo 19: Clonación y expresión de MRD para Ang2 fusionados a la proteína de unión a maltosa

A. Clonación de fusiones de MBP

Se expresaron los péptidos de monómero y dímero en forma de proteínas de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP) usando una forma modificada del vector pMAL-p2 y el sistema de expresión de NewEngland Biolabs (NEB; Beverly, Mass.). La secuencia de MRD generada por la PCR se insertó en un vector pMAL cadena abajo del gen de malE, que codifica MBP. Esto da como resultado un vector que codifica una proteína de fusión MRD-MBP. El vector pMAL contiene un promotor Ptac fuerte y es inducible mediante IPTG. La serie pMAL-p2 contiene la secuencia de señal normal de malE, que dirige la proteína de fusión a través de la membrana citoplasmática. Las proteínas de fusión pMAL-p2 con capacidad de exportarse pueden purificarse del periplasma por choque osmótico. Puede llevarse a cabo una purificación adicional, por ejemplo, por unión a resina de amilosa.

B. Expresión de proteínas de fusión de MBP y fraccionamiento por choque osmótico

Para la expresión de proteínas de fusión, se volvieron a diluir los cultivos bacterianos cultivados durante una noche en medio fresco hasta una DO A600 de aproximadamente 0,1. Los cultivos se cultivaron hasta una DO de aproximadamente 0,8 y se indujeron con IPTG a una concentración de 0,3 mM. Los cultivos se incubaron con agitación durante aproximadamente 4 horas, tras las cuales se centrifugaron las bacterias durante 15 minutos a 4700 g. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en Tris-HCl 30 mM, pH 7,4, sacarosa al 20 %, EDTA 1 mM. Las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) antes de centrifugarlas durante 15 minutos a 4700 g. Después, se resuspendieron las bacterias sedimentadas en MgSO₄ enfriado con hielo y se incubaron durante 20 minutos sobre hielo, con mezclado periódico. Las suspensiones celulares se trataron con ultrasonidos (Misonix XL2020) durante 90 segundos. Las células se centrifugaron a 4 °C durante 20 minutos a 4700 g. El sobrenadante ("fracción de choque osmótico") se ajustó a 1XPBS usando PBS 10x (Quality Biologics, n.º de cat. 119-069-131) y se filtraron a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Estas fracciones de choque osmótico se ensayaron directamente respecto de su unión a Ang2.

C. Unión directa de proteínas de fusión de MBP

Para la detección de la unión directa de las fusiones de MRD-MBP a Ang2, se llevó a cabo el siguiente ELISA. Se recubrieron durante una noche placas de noventa y seis pocillos con rhAng2 (R&D, n.º de cat. 623-AN) a 320 ng/ml (100 µl/pocillo). Los pocillos se bloquearon durante 3,25 horas con 250 µl de tampón de bloqueo (Thermo n.º de cat. N502), seguido de 4 lavados con 300 µl de tampón de lavado (PBS, Tween al 0,1 %). Las proteínas de fusión de MBP se diluyeron en serie en tampón de bloqueo y se añadieron a los pocillos durante 2 horas a TA. Después de lavar (8x300 µl de tampón de lavado), se trataron las muestras con mAb de ratón anti-MBP-HRP (NEB, n.º de cat. E8038S), diluido a 1:4000 en tampón de bloqueo. Tras incubación durante 1 hora a TA, se lavaron las células (8x300 µl de tampón de lavado) antes de recibir 100 µl de sustrato de TMB (KPL Laboratories). El revelado del color se detuvo con 100 µl de H₂SO₄, y se leyó la absorbancia a 450 nm.

D. Resultados

Se evaluó la unión directa de las fusiones de MRD-MBP a Ang2. Las fracciones de choque osmótico de los cultivos bacterianos inducidos se diluyeron en serie y se añadieron a los pocillos recubiertos con Ang2. Las proteínas de fusión unidas se detectaron con mAb anti-MBP. Las curvas de respuesta a la dosis se presentan en la figura 17A. Las proteínas ensayadas representan variantes mutacionales de la secuencia MGAQTNFMPMDDDE LLLYEQFILQQGLE (L17D) (SEQ ID NO: 107). En esta serie, se mutó el motivo MDD en L17D en la primera D en todos los demás aminoácidos posibles (excepto cisteína). Otros MRD ensayados fueron "Lm32 KtoS" y un dímero de Lm32 (2xLm32). Como se presenta en la figura 17B, varios mutantes de MXD mostraron unión en el intervalo de 0,1 a 100 nm. El dímero Lm32 (2xLm32) muestra una afinidad de unión más de 10 mayor por Ang2 que L17D o "Lm32 KtoS".

Ejemplo 21: Expresión y purificación de anticuerpos que contienen MRD

Los dominios de reconocimiento molecular se construyeron y expresaron en un vector pcDNA 3.3 en forma de proteínas de fusión con las cadenas pesada o ligera de los anticuerpos. Para la producción de proteína, se transformaron en primer lugar los ADN plasmídicos que codificaban las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos que contenían MRD en bacterias químicamente competentes para producir grandes cantidades de ADN para la

transfección transitoria. Los transformantes individuales se propagaron en medio LB y se purificaron usando kits Endotoxin Free Plasmid de Qiagen. En resumen, se lisaron células de un cultivo de una noche; se clarificaron los lisados y se aplicaron a una columna de intercambio iónico y después se sometieron a una etapa de lavado y se eluyeron con alta concentración de sal. Los plásmidos se precipitaron, se lavaron y se resuspendieron en agua estéril.

Las células HEK293T se expandieron hasta el tamaño de lote final deseado (aproximadamente 5 l) antes de la transfección. El plásmido purificado (1 mg por litro de producción) se complejó con el reactivo de transfección de polietilenimina (PEI), se añadieron al cultivo de matraces agitados y se incubaron a 37 °C. El cultivo se monitorizó a diario para el recuento celular, el diámetro celular y la viabilidad. El medio acondicionado se recogió y almacenó a -80 °C hasta su purificación.

Los anticuerpos que contenían MRD se purificaron a partir del medio acondicionado usando cromatografía de afinidad. El sobrenadante de cultivo se aclaró por filtrado y se aplicó directamente a una columna de cromatografía que contenía proteína A recombinante Sepharose (GE Healthcare). Se lavó la columna y se eluyeron los anticuerpos unidos que contenían MRD reduciendo el pH del tampón. Después de la elución, las fracciones de eluato se ajustaron inmediatamente a pH fisiológico. Después de la purificación por afinidad de proteína A, puede llevarse a cabo una etapa cromatográfica de refinado adicional según sea necesario.

Las proteínas purificadas se dializaron en PBS, se concentraron a ~1 - 4 mg/ml, se esterilizaron por filtración, se separaron en alícuotas de manera aséptica y se almacenaron congeladas a -80 °C. Todas las etapas de la purificación se monitorizaron mediante SDS-PAGE-Coomassie y se tomaron precauciones durante la purificación para mantener los niveles de endotoxina tan bajos como fuese posible.

Se analizaron en el producto final los niveles de endotoxina (EndoSafe), la pureza (SDS-PAGE-coomassie, SEC-HPLC analítica), la identidad de proteína (transferencia de Western) y el rendimiento (ensayo Bradford). Se llevó a cabo un análisis por HPLC de exclusión molecular adicional para evaluar el nivel de agregados.

Los datos presentados en la tabla 6 indican que los anticuerpos que contienen MRD pueden expresarse y purificarse usando técnicas convencionales.

Tabla 6

Zybody	Rendimiento (mg)	Pureza	Agregados (%)	Endotoxina (UE/ml)
HER2xCon4(H)	36	>90 %	4,6	<1
HER-Im32(H)	57	>90 %	1	2,02
HER-Im32(L)	98	>90 %	2	3,26
AVA-Im32(H)	12	>90 %	0	<1

Ejemplo 22: Unión simultánea de HER Lm32(H) y HER Lm32 (L) a Her2 y Ang2

A. Métodos

Se recubrieron durante una noche placas de noventa y seis pocillos con rHER2-Fc (R&D n.º de cat. 1129-ER-050) a 20ng/ml (100 µl/pocillo). Los pocillos se bloquearon durante 3,25 horas con 250 µl de tampón de bloqueo (Thermo n.º de cat. N502), seguido de 4 lavados con 300 µl de tampón de lavado (PBS, Tween al 0,1 %). Los anticuerpos que contenían MRD (HER-Im32(H), HER-Im32(L) y AVA-Im32(H)) y los anticuerpos (HERCEPTIN®) se diluyeron en serie en tampón de bloqueo, que contenía 1,94 µg/ml de Ang2 biotinilado (R&D n.º de cat. BT633) y se lavaron en los pocillos durante 2 horas a TA. Después de lavar (8x300 µl de tampón de lavado), las muestras en paralelo recibieron mAb anti-cadena kappa humana conjugado a HRP (Abcam, n.º de cat. ab79115-1) diluido a 1:1000 en tampón de bloqueo o estreptavidina conjugada con HRP (Thermo Scientific n.º de cat. N100) diluido a 1:4000 en tampón de bloqueo. Tras incubación durante 1 hora a TA, se lavaron las células (8x300 µl de tampón de lavado) antes de recibir 100 µl de sustrato de TMB (KPL Laboratories). El revelado del color se detuvo con 100 µl de H₂SO₄, y se leyó la absorbancia a 450 nm.

B. Resultados

Según se detectó con el mAb anti-cadena kappa humana, tanto un anticuerpo a base de HERCEPTIN® como los anticuerpos basados en HERCEPTIN® que contenían MRD se unen a Her2 Fc en presencia de Ang2 de una manera dependiente de la dosis (figura 18A). Solo los anticuerpos basados en HERCEPTIN® que contenían MRD (HER-Im32(H) y HER-Im32(L)) muestran unión simultánea a Her2 Fc y Ang2, según se detectó mediante estreptavidina conjugada con HRP (figura 18B).

Ejemplo 23: Unión simultánea de AVA-Im32(H) a VEGF y Ang2

A. Métodos:

5 Se recubrieron durante una noche placas de noventa y seis pocillos con VEGF humano (PeproTech, Inc. n.º de cat. 100-20) a 30 ng/ml (100 µl/pocillo). Los pocillos se bloquearon durante 3,25 horas con 250 µl de tampón de bloqueo (Thermo n.º de cat. N502), seguido de 4 lavados con 300 µl de tampón de lavado (PBS, Tween al 0,1 %). Los anticuerpos que contenían MRD (HER-Im32(H) y AVA-Im32(H)) y los anticuerpos (AVASTIN®) se diluyeron en serie en tampón de bloqueo, que contenía 3,876 µg/ml de Ang2 biotinilado (R&D n.º de cat. BT633) y se lavaron en los
10 pocillos durante 2 horas a TA. Después de lavar (8x300 µl de tampón de lavado), las muestras en paralelo recibieron mAb anticadena kappa humana conjugado a HRP (Abcam, n.º de cat. ab79115) diluido a 1:1000 en tampón de bloqueo o estreptavidina conjugada con HRP (Thermo Scientific n.º de cat. N100) diluido a 1:4000 en tampón de bloqueo. Tras incubar durante 1 hora a TA, se lavaron las células (8x300 µl de tampón de lavado) antes de recibir 100 µl de sustrato de TMB (KPL Laboratories). El revelado del color se detuvo con 100 µl de H₂SO₄, y se leyó la
15 absorbancia a 450 nm.

B. Resultados

Según se detectó con el mAb anti-cadena kappa humana, tanto AVASTIN® como los anticuerpos a base de AVASTIN® que contienen MRD se unen a VEGF en presencia de Ang2 de una manera dependiente de la dosis (figura 19A). Solo los anticuerpos basados en AVASTIN® que contenían MRD (AVA-Im32(H)) mostraron unión simultánea a VEGF y Ang2, según se detectó mediante estreptavidina conjugada con HRP (figura 19B).

Ejemplo 24: Unión simultánea de HER-Im32 (H) y HER-Im32 (L) a HER2 y Angiopoyetina-2

25 La capacidad de HER-Im32 (H) y HER-Im32 (L) para unirse simultáneamente a Her2 expresado en la superficie de
células de carcinoma de mama BT-474 y a Ang2 en solución, se determinó mediante citometría de flujo. Se usó anti-
lg humana de ratón-FITC para la detección de la cadena pesada de los anticuerpos que contenían MRD y se usaron
Ang2-biotina/estreptavidina-PE para la detección del MRD Im32. Se espera que las células que se unen a Her2 y
30 Ang2 de manera simultánea se detecten como dobles positivas para la fluorescencia de FITC y PE.

Se incubó un millón de células de carcinoma de mama BT-474 positivas a HER2 con 1 µg de HER-Im32(H) o HER-Im32(L) durante 25 minutos a TA. Después del lavado, se incubaron las células con 200 ng/ml de Ang2 biotina (R&D systems) durante 25 minutos a TA y después con 20 µl de anti-Ig humana-FITC y Estreptavidina-PE durante 15 minutos. Tras lavar con 2 ml de tampón, se analizaron las células por citometría de flujo (FACS Canto II, BD).

40 A fin de confirmar la especificidad de la unión de HER-Im32(H) y HER-Im32(L) a HER2 en células BT-474, se determinó la unión en presencia de un exceso de 10 veces de HERCEPTIN®. En estos experimentos, se incubaron anticuerpos que contenían MRD (1 µg) con un millón de células BT-474 en ausencia o presencia de 10 µg de HERCEPTIN® durante 25 minutos a TA. La unión de los anticuerpos que contenían MRD a HER2 se determinó incubando con 200 ng/ml de Ang2 biotina seguido de detección con estreptavidina-PE.

Los datos presentados en la figura 20A demuestran que tanto HER-Im32(H) como HER-Im32(L), se unen simultáneamente a HER2 y Ang2. En ambos casos, las células mostraron fluorescencia dual brillante en los canales de fluorescencia de FITC y PE. El hecho de que la unión de HER-Im32(H) y HER-Im32(L) a HER2 se inhiba completamente por HERCEPTIN® (figura 20B) indica que la unión es específica.

Además, se demostró la unión trispecífica usando un anticuerpo que contenía dos MRD diferentes. Se fusionaron un affibody de unión a EGFR y un péptido de unión a Ang2 (LM32) al extremo C-terminal de las cadenas ligera y pesada de HERCEPTIN, respectivamente. El anticuerpo que contiene MRD se incubó con la línea celular epitelial humana EGFR+, Her2-A431. El anticuerpo que contenía MRD unido a células se detectó con Ang2 biotinilado/estreptavidina-PE, ErbB2-Fc marcado con alexafluor o la combinación de Ang2/estreptavidina-PE y ErbB2-Fc marcado con alexafluor. Los resultados demostraron que el anticuerpo que contenía MRD se unió simultáneamente al receptor de EGFR de la superficie celular y a dos ligandos solubles (ErbB2 y Ang2).

Los experimentos adicionales demostraron que una fusión de Im32 al extremo C-terminal de la cadena pesada de HERCEPTIN conservó la especificidad de unión y la función de Fc de HERCEPTIN. HERCEPTIN y la fusión de HERCEPTIN-Im32 se unieron a FcRn con afinidades similares (las CE50 para HERCEPTIN y HERCEPTIN Im-32 fueron de 2,17 y 2,84 µg/ml, respectivamente). El HERCEPTIN y la fusión de HERCEPTIN-Im32 mostraron una actividad ADCC comparable en células SK-BR-3. La fusión de HERCEPTIN-Im32 y el HERCEPTIN se unieron a Fcγ-RI y Fcγ-RIII con afinidades similares. La fusión HERCEPTIN-Im32 y el HERCEPTIN se unieron al receptor de complemento C1q con afinidades similares. Además, la fusión HERCEPTIN-Im32 se unieron a Ang2 con afinidad subnanomolar y antagonizaron la unión de Ang2 al receptor Tie-2. La fusión de HERCEPTIN-Im32 se unió al dominio extracelular de ErbB2 y también inhibió la proliferación inducida por Ang2 de células linfoides bovinas primarias. La fusión de HERCEPTIN-Im32 y HERCEPTIN se unieron al dominio extracelular de Her2 con parámetros cinéticos similares. Los experimentos adicionales demostraron que la fusión HERCEPTIN-Im32 era igual de eficaz

que HERCEPTIN para inhibir la proliferación de varias líneas celulares de cáncer de mama cultivadas (BT-474, MDA-MB-361 y SK-BR-3). El efecto anti-proliferativo de la fusión HERCEPTIN-Im32 sobre células SK-BR-3 no se vio afectado por la presencia de Ang2 (2 µg/ml) en el cultivo.

Se observó unión simultánea a la diana para otras composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD)). Por ejemplo, una fusión de Im32 al extremo C de la cadena pesada de HUMIRA (HUM-Im32(H)) fue capaz de unirse de manera simultánea a Ang2 y a TNFα. La misma fusión fue capaz de unirse a células 293 transfectadas de manera transitoria con TNFα de longitud completa con una afinidad similar a la del anticuerpo HUMIRA. HUM-Im32(H) también fue capaz de inhibir la interacción de TNF a sus receptores. HUM-Im32(H) también se unió a FcRn expresado en la superficie celular y unido a placas, así como a Fcγ-RI y a Fcγ-RIII.

Ejemplo 25: Los anticuerpos-MRD que contienen fusiones de cadena pesada se unen a las dianas

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos que contienen Im32 para bloquear la interacción de Ang2 con su receptor, TIE2, se evaluó su efecto en la unión de TIE2 soluble a Ang2 unido a placa mediante ELISA.

Ang2 (R&D Systems, n.º de catálogo 623-AN) se recubrió sobre una placa de 96 pocillos (Thermo Electron, n.º de cat.3855) a 200 ng/ml en PBS durante una noche a 4 °C. Después, se incubó la placa con 100 µl de solución de bloqueo (Thermo Scientific, n.º de cat.N502) durante 1 h a TA. Después de lavar la placa 4 veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS, se incubó el Ang2 unido a la placa con 0,5 µg/ml de TIE2 soluble (R&D Systems, n.º de cat. 313-TI) en ausencia o presencia de diversas concentraciones de anticuerpos diluidos en serie que contenían MRD durante 1 hora a TA. Después de lavar 4 veces, se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-TIE2 a 0,5 µg/ml (n.º de cat.BAM3313, R&D Systems) y se incubó a TA durante 1 hora. La unión de TIE2 a Ang2 se detectó por incubación con anticuerpo de cabra anti-ratón-HRP diluido a 1:1000 (BD Pharmingen, n.º de cat.554002) durante 1 hora a TA. La placa se lavó 4 veces y se incubó con 100 µl de reactivo TMB durante 10 minutos a TA. Tras detener la reacción con 100 µl de H₂SO₄ 0,36N, se leyó la placa a 450nm usando un espectrofotómetro.

Como se presenta en la figura 21A, HER-Im32(H), HER-Im32(L) y AVA-Im32(H) inhibieron la unión de TIE2 a Ang2 unido a la placa de un modo dependiente de la dosis. Todos los anticuerpos que contenían Im32 ensayados demostraron efectos inhibidores comparables con valores de CI-50 de 4 nM para HER-Im32 (H), 8 nM para HER-Im32(L) y 3,3 nM para AVA-Im32(H).

Ejemplo de referencia 26: Los anticuerpos-MRD que contienen fusiones de cadena pesada se unen a las dianas

Para determinar la especificidad y la afinidad relativa de la unión de AVA-Im32 (H) a VEGF, se llevó a cabo un ensayo de unión competitivo usando AVASTIN® marcado con biotina.

Se marcó AVASTIN® con biotina usando EZ-Link NHS-LC-Biotina (Pierce, n.º de cat. 21336). Se recubrió con VEGF (Peprotech, n.º de cat.100-20) una placa de 96 pocillos (Thermo Electron, n.º de cat.3855) a razón de 100ng/ml en PBS durante una noche a 4 °C. Después, se incubó la placa con 100 µl de solución de bloqueo (Thermo Scientific, n.º de cat. N502) durante 1 hora a TA. Tras lavar la placa 4 veces con Tween 20 al 0,1 % en PBS, se añadieron 50 µl de AVASTIN®-biotina a 150 ng/ml y 50 µl de diversas concentraciones de AVA-Im32(H) o AVASTIN® no marcado y se incubó a TA durante 1 hora. La placa se lavó 4 veces y se incubó con Estreptavidina-HRP (Thermo, n.º de cat.N100) a una dilución 1:1000 durante 1 hora a TA. La placa se lavó 4 veces y se añadieron 100 µl de reactivo TMB. Tras 10 minutos de incubación a TA, se añadieron 100 µl de H₂SO₄ 0,36N para detener la reacción y se leyó la placa a 450nm.

Los datos presentados en la figura 22 demuestran que AVA-Im32(H) se une de manera específica a VEGF-2. Inhibe la unión de AVASTIN® biotinilado a VEGF de una manera dependiente de la dosis. Las curvas de respuesta a la dosis generadas por AVA-Im32(H) y AVASTIN® sin marcar son superponibles e indican afinidades de unión similares.

Ejemplo de referencia 27: Unión de HER-Im32(H) y HER-Im32(L) a HER2 expresado en células de cáncer de mama

Para determinar la afinidad de unión relativa de los anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contenían MRD a HER2 de la superficie celular en comparación con HERCEPTIN®, se llevó a cabo un ensayo de unión competitiva con HERCEPTIN® marcado con Eu.

Se marcó HERCEPTIN® con Eu3+ usando un kit de marcaje con europio de un inmunoensayo de fluorescencia de lantánido potenciada por disociación (DELFI) (Perkin Elmer Life Sciences, n.º de cat.1244-302) siguiendo las instrucciones del fabricante. El agente de marcaje es el quelato de Eu de ácido NI-(p-isotiocianatobencil)diethylentriamina N1, N2, N3, N3-tetraacético (DTTA). El grupo DTTA forma un complejo estable con Eu3+ y el grupo isotiocianato reacciona con grupos amino en la proteína a pH alcalino para formar un enlace estable de tiourea covalente. HERCEPTIN® (0,2 mg en 200 ml de tampón de bicarbonato de sodio a pH 9,3) se

marcó con 0,2 mg de agente de marcaje a 4 °C durante una noche. Se purificó HERCEPTIN® marcado con Eu mediante columnas de centrifugación usando 50 mmol/l de tris-HCl a pH 7,5 y tampón de elución de NaCl al 0,9 %.

El ensayo de unión a Eu-HERCEPTIN® se llevó a cabo incubando 0,5-1 millones de células de cáncer de mama BT-474 o SK-BR3 por pocillo en una placa de 96 pocillos con Eu-HERCEPTIN® 2-5 nM en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos a base de HERCEPTIN® sin marcar que contenían MRD o de HERCEPTIN® durante 1 hora a TA. Se retiró Eu-HERCEPTIN® no unido mediante lavado usando 200 µl de medio completo. Después, se resuspendieron las células en 100 µl de medio completo y 80 µl de la suspensión celular se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron con 100 µl de solución potenciadora Delfia a TA durante 10 minutos y se detectó Eu-HERCEPTIN® unido a células mediante Envision (Perkin Elmer).

Las curvas de inhibición de la unión obtenidas usando células BT-474 se presentan en la figura 23. Se inhibió la unión de Eu-HERCEPTIN® a BT-474 mediante HERCEPTIN® y anticuerpos basados en HERCEPTIN® que contenían MRD de un modo dependiente de la dosis. Se observaron valores de CI-50 comparables: 4,7 nM para HER-Im32(H), 5,7 nM para HER-Im32(L) y 3,7 nM para HERCEPTIN® sin marcar.

Ejemplo de referencia 28: Inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama mediante anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contenían MRD

También se evaluaron células de cáncer de mama sensibles a HERCEPTIN SK-BR-3 que expresaban el receptor HER2neo en un bioensayo. Las células SK-BR-3 (2000 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) en medio de crecimiento completo de McCoy que contenía glutamina 2 mM, pen/strep (Invitrogen) y FBS al 10 % (HyClone). Las células se cultivaron durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %, humedad del 85 %. Al día siguiente, se reemplazó el medio de crecimiento por medio de privación (medio de McCoy que contenía glutamina 2 mM, pen/strep, FBS al 0,5 %). Se prepararon nueve diluciones seriadas (concentraciones en el intervalo de 5000 - 7,8 ng/ml) de HERCEPTIN® y se prepararon anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contenían MRD en medio de crecimiento completo. Después de 24 horas de incubación, se retiró el medio de privación y se transfirieron las diluciones seriadas de HERCEPTIN® y anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contenían MRD a las placas en triplicados. Las células se cultivaron durante 6 días. La proliferación se cuantificó usando el método de luminiscencia CellTiter Glo.

Los valores de CI50 determinados usando un modelo logístico de cuatro parámetros fueron los siguientes: 0,49 +/- 0,17 nM para HER-Im32(H), 0,81 +/- 0,19 nM para HER-Im32(L) y 0,67 +/- 0,15 nM para HER-con4(H). Todos los anticuerpos a base de HERCEPTIN® ensayados que contenían MRD fueron capaces de inhibir la proliferación de las células de carcinoma de mama SK-BR-3 con valores de CI-50 subnanomolares. Las curvas de respuesta a la dosis representativas ajustadas mostradas en las figuras 24A-C demuestran que los anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contenían MRD inhibían la proliferación celular con una potencia similar a la de HERCEPTIN®.

Ejemplo de referencia 29: Citotoxicidad dependiente de anticuerpo de anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contienen MRD

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos que contienen MRD para mediar la ADCC *in vitro*, se usó un ensayo de citotoxicidad basado en el kit "DELFLIA EUTDA Cytotoxicity reagents AD0116" (PerkinElmer). En este ensayo, se marcaron las células diana con un ligando hidrófobo potenciador de la fluorescencia (BADTA, bis (acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridin-6,6"-dicarboxilato). Tras entrar en las células, BADTA se convierte en un compuesto hidrófilo (TDA, ácido 2,2':6',2"-terpiridin-6,6"-dicarboxílico) mediante escisión mediada por esterasas citoplasmáticas y deja de poder atravesar la membrana. Tras la lisis celular, se libera TDA en un medio que contiene solución de Eu³⁺ para formar un quelato fluorescente (EuTDA). La intensidad de fluorescencia es directamente proporcional al número de células lisadas.

HERCEPTIN® y los anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contienen MRD pueden mediar la ADCC en células de cáncer de mama positivas a Her2 mediante la unión al receptor de HER2 en la superficie de las células diana e inactivando a las células efectoras presentes en las PBMC humanas interactuando con sus receptores FcγRIII. Se usó una línea celular de cáncer de mama humano positivo a HER2, SK-BR-3, como línea celular diana en los ensayos de ADCC para demostrar esto.

Las células SK-BR-3 se desprendieron con tripsina-versene al 0,05 % y se resuspendieron a razón de 1x10⁶ células/ml en medio RPMI1640 que contenía glutamina 2 mM, pen/strep y FBS al 10 % (medio de crecimiento completo). Se transfirieron 2x10⁶ células en 2 ml de medio a un tubo de 15 ml y se añadieron 10 µl de reactivo BADTA. La suspensión celular se mezcló cuidadosamente y se colocó en la incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % y 85 % de humedad durante 15 minutos. Se prepararon siete diluciones seriadas 10x partiendo de 5 µg/ml de HERCEPTIN® o anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contenían MRD durante el marcaje celular.

Tras la incubación con BADTA, se lavaron las células 4 veces en medio de crecimiento completo que contenía Probenecid 2,5 mM. Entre lavados, se sedimentaron las células por centrifugación a 1000 rpm durante 3 minutos. Tras el último lavado, se resuspendieron las células SK-BR-3 marcadas en 10 ml de medio de crecimiento completo

y se añadieron 50 µl de células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, salvo para los pocillos de fondo. Se añadieron 50 µl de diluciones seriadas de HERCEPTIN® o anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contienen MRD a los pocillos específicos. Las placas se transfirieron a la incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % y 85 % de humedad durante 30 minutos.

Las PBMC que se purificaron de sangre periférica humana un día antes del ensayo de ADCC, se lavaron una vez en RPMI1640 con glutamina 2 mM, pen/strep, FBS al 10 %. Se prepararon 10 ml de la suspensión de PBMC con 2,5x10⁶ células/ml. Se transfirieron 100 µl de suspensión de PBMC en los pocillos que contenían células diana y HERCEPTIN® o anticuerpos a base de HERCEPTIN® que contenían MRD por triplicado. Se añadieron los siguientes controles a los pocillos indicados: liberación espontánea (células diana sin células efectoras), liberación máxima (células diana lisadas) y fondo (medio sin células). Las placas se incubaron durante 2,5 horas en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % y 85 % de humedad.

Tras la incubación, se transfirieron 20 µl del sobrenadante a otra placa y se añadieron 200 µl de solución de europio. Las placas se incubaron en un agitador de placas a TA durante 15 minutos. Se midió la fluorescencia resuelta en tiempo usando un lector multimarcador PerkinElmer EnVision 2104.

Se usó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de liberación específica:

$$\frac{\text{Liberación experimental (cuentas)} - \text{Liberación espontánea (cuentas)}}{\text{Liberación máxima (cuentas)} - \text{Liberación espontánea (cuentas)}} \times 100$$

Los valores de CI50 calculados mediante un modelo logístico de cuatro parámetros fueron los siguientes: 0,213 +/- 0,077 nM para HER-Im32(H), 0,204 +/- 0,036 nM para HER-Im32(L) y 0,067 +/- 0,015 nM para HER-con4(H). Todos los anticuerpos ensayados que contenían MRD demostraron una actividad ADCC robusta con valores de CI-50 subnanomolares. Las curvas de respuesta a la dosis ajustadas representativas mostradas en las figuras 25A y 25B demuestran que los anticuerpos que contienen MDR son capaces de mediar la citotoxicidad dependiente de células con una potencia comparable a la de HERCEPTIN®.

Se llevó a cabo un experimento similar en presencia de Ang2. Se activaron PBMC humanas con 20 ng/ml de IL2 durante una noche y se añadieron a células SK-BR-3 marcadas con BADTA recién sembradas (10.000 células/pocillo). La proporción de efectoras/diana fue de 25/1. Tras una incubación de 4 horas con diluciones seriadas de HER-Im32(H) o HUMIRA en presencia de 2 µg/ml de Ang2, se añadió Eu al medio y se midió la TRFI en un lector Envision (Pekin-Elmer). HER-Im32 fue más potente a la hora de mediar la ADCC en presencia de Ang2.

Ejemplo de referencia 30: Inhibición de la proliferación de células endoteliales mediante AVA-Im32(H)

Se evaluaron las actividades biológicas de los anticuerpos a base de AVASTIN® que contenían MRD, AVA-Im32(H) para determinar si podían inhibir la proliferación inducida por VEGF de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).

Se obtuvieron HUVEC de GlycoTech (Gaithersburg, MD) y Lonza en el pase 1 y el pase 3, respectivamente. Las células se cultivaron en medio basal para células endoteliales (EBM-2) con la adición de suero bovino fetal al 2 % (FBS) y single quotes (Lonza) a 37 °C, CO₂ al 5 %, humedad del 85 %. Para los experimentos de inhibición de la proliferación, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar) a 2000 células por pocillo en medio EBM-2 con FBS al 2 % y se cultivaron durante 24 horas. Se prepararon nueve diluciones seriadas de AVASTIN® o AVA-Im32(H) partiendo de 5 µg/ml en medio EBM-2 con FBS al 2 %. Se añadió VEGF (R & D Systems) a una concentración final de 10 ng/ml a todas las diluciones seriadas. Tras incubación durante 15 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 %, humedad del 85 %, se añadieron las diluciones seriadas a las células. Después de 96 horas, se añadió CellTiter Glo a las células. Después de incubar a TA durante 15 minutos, la suspensión celular se transfirió a placas blancas opacas de 96 pocillos y se midió la luminiscencia usando un lector multimarcador PerkinElmer EnVision 2104.

Como se muestra en las figuras 26A y 26B, AVA-Im32(H) mostró actividad anti-proliferativa dependiente de la dosis en HUVEC de ambas fuentes. Los valores de CI50 calculados a partir de las curvas ajustadas de 4 PL indican una potencia similar para AVA-Im32(H) y AVASTIN® (Valores de CI50 de 0,36 +/- 0,42 nM y 0,33 +/- 0,38 nM, respectivamente).

Ejemplo de referencia 31: Los anticuerpos que contienen MRD inhiben la proliferación tumoral *in vivo*

A fin de determinar la eficacia de las composiciones multivalentes y multispecíficas por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) *in vivo*, se evaluó su eficacia en un modelo de tumor Colo5 de ratón. En estos experimentos, se implantaron tumores en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos hembra de seis semanas de edad inyectando 5X10⁶ células Colo205 suspendidas en 100 µl de PBS. Tres grupos de ocho animales cada uno recibieron inyecciones intraperitoneales de 5 mg/kg de anticuerpo (HERCEPTIN, Rituxan) o de un anticuerpo que contenía MRD (HER-2xCon4; "H2xCon4") en 100 µl de PBS cada tres días comenzando en el día 6 tras el implante

del tumor. Los resultados, mostrados en la figura 27, demuestran que el anticuerpo que contiene MRD era más eficaz a la hora de inhibir el crecimiento tumoral que Rituximab® o HERCEPTIN®.

HERCEPTIN con Im32 fusionado al extremo C-terminal de la cadena pesada también inhibió el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de tumor dependientes de Her2 y dependientes de angiogénesis. La fusión de HERCEPTIN-Im32 tuvo una PK similar a la de HERCEPTIN tanto en ratones como en monos tras inyecciones de una sola dosis. Además, la fusión HERCEPTIN-Im32 fue estable en sangre completa a 37 °C durante hasta 72 horas.

Ejemplo 32: Ensayos moleculares para evaluar los anticuerpos que contienen MRD

Se generaron nuevas composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) alterando la secuencia del MRD y/o del anticuerpo, alterando la ubicación a la que se une el anticuerpo al MRD y/o alterando el enlazador a través del cual se conecta el MRD al anticuerpo. El potencial de unión, la estructura y las propiedades funcionales de las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se evalúan usando técnicas conocidas para medir la unión y la función de proteínas. Las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se comparan solo con el MRD, solo con el anticuerpo o con otras composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD).

Se ensaya un anticuerpo que contiene MRD usando un ensayo en fase sólida en el que se inmoviliza una diana del MRD y/o anticuerpo sobre una superficie sólida y después, se expone a concentraciones crecientes de un anticuerpo que contiene MRD marcado fluorescentemente. La superficie sólida se lava para retirar el anticuerpo que contiene MRD no unido y se determina la cantidad de anticuerpo que contiene MRD de manera directa cuantificando la fluorescencia. En otro experimento, se expone la diana inmovilizada a concentraciones crecientes de un anticuerpo que contiene MRD no marcado y se determina la cantidad de anticuerpo que contiene MRD unido a la diana de manera indirecta usando un reactivo marcado que se une al anticuerpo que contiene MRD.

Un anticuerpo que contiene MRD se ensaya usando un ensayo en fase líquida en el que se añade una diana del MRD y/o anticuerpo a diversas concentraciones de un anticuerpo que contiene MRD que está en solución. La interacción de la diana con el anticuerpo que contiene MRD se detecta mediante la aparición de un complejo molecular formado por una diana y un anticuerpo que contiene MRD que difiere en su masa molecular (y movilidad) de la diana no unida y del anticuerpo que contiene MRD no unido.

También se evalúa un anticuerpo que contiene MRD en un ensayo basado en células en el que se incuban células que expresan la diana en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo que contiene MRD. La unión del anticuerpo que contiene MRD se detecta mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Además, se evalúan la proliferación celular, la diferenciación celular, la fosforilación de proteínas, la expresión de proteínas, la expresión de ARNm, la composición de la membrana, la actividad de las vías de señalización y la viabilidad celular.

Las composiciones multivalentes y multispecíficas útiles (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se unen tanto a la diana del MRD como a la diana del anticuerpo. Además, las composiciones multivalentes y multispecíficas útiles (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) afectan a al menos un proceso celular.

Ejemplo 33: Identificación de MRD con características mejoradas

Se identificaron dos epítomos de linfocitos T potenciales en LM32. A fin de identificar variantes de LM32 que no contenían epítomos de linfocitos T y por lo tanto, que tuvieran menos probabilidades de producir respuestas inmunogénicas, se crearon variantes de mutación y eliminación de los péptidos de LM32. Se expresaron las variantes de LM32 listadas en los MRD de la tabla 7 en forma de proteínas de fusión de MBP y se evaluó su capacidad para unirse a Ang2.

Tabla 7.

MRD expresados en forma de proteína de fusión de MBP	CE50 (nM)	SEQ ID NO
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDELLLYEQFI	1,080	32
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNEELLYEQFI	20,700	33
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDEGLLYEQFILQQGLE	1,040	88
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDELGLLYEQFILQQGLE	ne	89
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDEALLYEQFILQQGLE	0,182	90
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDELTLYEQFILQQGLE	1,420	91

MRD expresados en forma de proteína de fusión de MBP	CE50 (nM)	SEQ ID NO
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDELLLYEQFIYQQGLE	ne	92
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDEGLLYEQFIYQQGLE	0,902	93
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDEALLYEQFIYQQGLE	0,392	94
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNEELTYEQFIFQQG	ne	95
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDEGLLYEEFILQQGLE	0,922	96
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNDEALLYEEFILQQGLE	0,426	97
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDNEELTYEEFILQQGLE	ne	98
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDQDELLLYEQFILQQGLE	0,383	99
KSLSLSPGSGGGSMGAQTNFMPMDDELLLYEQFILQQGLE	0,240	100

Después, se evalúa la capacidad de las variantes de LM32 para inducir proliferación y/o liberación de citocinas. Se identifican variantes de LM32 que son funcionalmente activas y que tienen un potencial inmunogénico reducido. Se crean un anticuerpo que contiene MRD que comprende la variante LM32 fusionado a la cadena ligera de HERCEPTIN®, un anticuerpo que contiene MRD que comprende la variante LM32 fusionado a la cadena pesada de HERCEPTIN®, un anticuerpo que contiene MRD que comprende la variante LM32 fusionado a la cadena ligera de HUMIRA®, un anticuerpo que contiene MRD que comprende la variante LM32 fusionado a la cadena pesada de HUMIRA®, un anticuerpo que contiene MRD que comprende la variante LM32 fusionado a la cadena ligera de AVASTIN® y un anticuerpo que contiene MRD que comprende la variante LM32 fusionado a la cadena pesada de AVASTIN®. Los anticuerpos que contienen la variante LM32 se administran a modelos animales y se miden la representación de proteína plasmática y la residencia en plasma y tejido y se comparan con los de HERCEPTIN®, HUMIRA® y AVASTIN®. Además, los efectos de los anticuerpos que contienen la variante LM32 en la proliferación celular, angiogénesis, tumorigenicidad, e indicadores artríticos se comparan con los efectos de HERCEPTIN®, HUMIRA® y AVASTIN®.

Ejemplo 34: Ensayos *in vivo* para evaluar los anticuerpos que contienen MRD

A fin de determinar la eficacia de las composiciones multivalentes y multispecíficas, por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) *in vivo*, se trata a modelos animales con un anticuerpo y un anticuerpo que contiene MRD y se comparan los resultados.

Los anticuerpos anti-HER2 que contienen MRD se evalúan en el siguiente modelo *in vivo*. Se inyectan células NIH 3T3 transfectadas con un plásmido de expresión de HER2 en ratones atímicos nu/nu por vía subcutánea a una dosis de 10^6 células en 0,1 ml de suero salino tamponado con fosfato, como se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.399.063. En los días 0, 1, 5 y cada 4 días posteriormente, se inyectan por vía intraperitoneal 100 µg de un anticuerpo para HER2, un anticuerpo para HER2 que contiene ang2, un anticuerpo para HER2 que contiene igflr y un anticuerpo para HER2 que contiene ang2-igflr. Durante un mes, se monitoriza la aparición y el tamaño de los tumores. Se observan los aumentos en la eficacia de las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) en comparación con los anticuerpos.

Los anticuerpos anti-VEGF que contienen MRD se evalúan en el siguiente modelo *in vivo*. Se administra a ratones RIP-TβAg alimento rico en azúcar y agua azucarada al 5 % como se describe en la Solicitud Publicada de los Estados Unidos n.º 2008/0248033. A las 9-9,5 u 11-12 semanas de edad, se trata a los ratones dos veces a la semana con inyecciones intraperitoneales dos veces a la semana de 5 mg/kg de un anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo para VEGF que contiene ang2, anticuerpo para VEGF que contiene ifglr o anticuerpo que contiene ang2 e igflr. Los ratones de 9-9,5 semanas se tratan durante 14 días y después se examinan. Los ratones de 11-12 semanas se examinan tras 7, 14 y 21 días de tratamiento. Se extirpan el páncreas y el bazo de los ratones y se analizan. El número de tumores se determina diseccionando cada tumor esférico y contándolos. La carga tumoral se determina calculando la suma del volumen de todos los tumores en el páncreas de un ratón. El efecto de la angiogénesis se determina calculando el número medio de islotes angiogénicos observados. Se observan los aumentos en la eficacia de las composiciones multivalentes y multispecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) en comparación con los anticuerpos.

Los anticuerpos anti-TNF que contienen MRD se evalúan en el siguiente modelo *in vivo*. Se trata a ratones transgénicos (Tg197) con tres inyecciones intraperitoneales de anticuerpo anti-TNF o anticuerpo para TNF que contiene ang2 a 1,5 µg/g, 15 µg/g o 30 µg/g como en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.258.562. Se continúa con las inyecciones durante aproximadamente 10 semanas y se registran cada semana los cambios macroscópicos en la morfología articular. A las 10 semanas, se sacrifica a los ratones y se lleva a cabo un examen microscópico de tejidos. El tamaño de la articulación se establece como una medida media en el tobillo trasero derecho usando un

micrómetro y se registran del siguiente modo las puntuaciones de artritis: 1 = sin artritis; +/- = leve (distorsión articular); ++= artritis moderada (inflamación, deformación articular); y +++= artritis grave (se detecta anquilosamiento en la flexión y el movimiento está gravemente deteriorado). La puntuación histopatológica basada en la tinción de hematoxilinaeosina de secciones articulares se basa en lo siguiente; 0= sin enfermedad detectable; 1 = proliferación de la membrana sinovial; 2 = fuerte engrosamiento sinovial 3 = destrucción del cartílago y erosión ósea. Se observan los aumentos en la eficacia de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) en comparación con los anticuerpos.

Ejemplo 35: Los anticuerpos que contienen MRD son superiores a las combinaciones de anticuerpos y MRD

A fin de comparar la eficacia de las composiciones multivalente y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) a combinaciones de anticuerpos y MRD, se estudió su efecto en células SK-BR-3 tratadas con EGF.

Se trató a células SK-BR-3 con HERCEPTIN, HERCEPTIN que contenía un MRD para EGFR, HUMIRA que contenía un MRD para EGFR ("MRD solo"), o HERCEPTIN en combinación con HUMIRA que contenía un MRD para EGFR ("anticuerpo más MRD solo") durante 10 minutos o 3 horas y se estimularon con EGF durante 5 minutos. Los lisados celulares se recogieron y se usaron transferencias de Western para determinar los niveles de fosfotirosina o fosfo-Akt. En la figura 28 se muestran los resultados. El HERCEPTIN que contenía un MRD para EGFR inhibió completamente la fosforilación del receptor inducida por EGF y la activación de Akt, mientras que HERCEPTIN, el MRD solo y el anticuerpo HERCEPTIN más MRD solo tuvieron un efecto muy limitado o nulo.

Además, se comparó el efecto de las composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) en la proliferación celular con el efecto de la combinación de anticuerpos y MRD. En estos experimentos, se trató a células de carcinoma de mama procedentes de MCF-7 con un anticuerpo HERCEPTIN que contenía un MRD dirigido a igflr fusionado al extremo C-terminal de la cadena ligera, HERCEPTIN solo o un anticuerpo HUMIRA que contiene el mismo MRD de direccionamiento a igflr ("solo MRD"). Como se muestra en la figura 29A, el anticuerpo que contiene MRD inhibió la proliferación celular mejor que HERCEPTIN solo o que el MRD solo.

También se trató a células MCF-7 con un anticuerpo que contenía MRD pentaespecífico. En primer lugar, se demostró que estas composiciones multivalentes y multiespecíficas pentaespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se unen a cinco dianas. Se fusionaron un MRD de direccionamiento a Ang2 (Im32) y un MRD de direccionamiento a EGFR a los extremos N y C-terminales, respectivamente, en un anticuerpo HERCEPTIN. Además, se fusionaron un MRD de direccionamiento a $\alpha\text{v}\beta 3$ (eeti) y un MRD de direccionamiento a igflr a los extremos N y C-terminales, respectivamente, del mismo anticuerpo HERCEPTIN. Ang2, ErbB2, EGFR, IGF1R y $\alpha\text{v}\beta 3$ se recubrieron en pocillos separados de una placa de 96 pocillos y se incubaron con diluciones seriadas del anticuerpo que contiene MRD. El anticuerpo que contiene MRD unido puede detectarse usando detector de anti-IgG kappa humana. Los resultados demostraron que el anticuerpo que contiene MRD unido a Ang2, ErbB2, EGFR, IGF1R y $\alpha\text{v}\beta 3$ con afinidades nanomolares o subnanomolares bajas que son comparables con las afinidades de unión de los MRD o anticuerpos de manera individual.

A continuación, se evaluó como se ha descrito anteriormente la capacidad de estas composiciones pentaespecíficas multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) para inhibir la proliferación de células MCF-7. Los resultados, mostrados en la figura 29B, demuestran que las composiciones pentaespecíficas multivalentes y multiespecíficas de HERCEPTIN (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) reducen la proliferación de manera más eficaz que el anticuerpo HERCEPTIN.

Ejemplo 36: Anticuerpos anti-TNF que contienen MRD

Un anticuerpo que contiene MRD que se dirige a TNF se creó fusionando un MRD de unión a Ang2 (Im32) al extremo C-terminal de la cadena pesada de HUMIRA y se expresó en sistemas de expresión tanto transitorios como estables. El anticuerpo que contiene MRD se unió simultáneamente a TNF α y Ang2. El anticuerpo que contiene MRD se unió a TNF α soluble y de la superficie celular y conservó la especificidad de unión y las funciones de Fc de HUMIRA (por ejemplo, unión a FcRn, Fc γ R1 y Fc γ R3) y también inhibió la señalización mediada por Ang2 a través del receptor de Tie-2 de una manera dependiente de la dosis con afinidades subnanomolares.

La fusión de HUMIRA-Im32 también inhibió la citotoxicidad mediada por TNF α en células L929. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos durante una noche y se trataron con 1 ng/ml de TNF más 1 μ g/ml de Actinomicina D en presencia de HUMIRA o HUMIRA-Im32 durante 24 horas a 37 °C. Tras la incubación, se añadieron 100 μ l de reactivo Cell Titer-Glow y se midió la luminiscencia usando EnVision (Perkin-Elmer) tras 15 minutos a temperatura ambiente. Los resultados demostraron que HUMIRA y HUMIRA-Im32 mostraron una potencia equivalente a la hora de inhibir la citotoxicidad mediada por TNF α en células L929 (CI50 de HUMIRA =19,0 ng/ml; CI50 de HUMIRA-Im32 =18,9 ng/ml).

Además, la fusión de HUMIRA-Im32 mostró una protección dependiente de la dosis de ratones transgénicos para hTNF frente a los signos clínicos de artritis en un modelo de ratón bien establecido. Véase, por ejemplo, Keffer et al.,

EMBO J. 10:4025-4031 (1991). Un estudio PK de una sola dosis en ratones demostró que la fusión de HUMIRA-Im32 y HUMIRA tienen perfiles PK y de inmunogenicidad similares. Sin embargo, la fusión de HUMIRA-Im32 mostró una eficacia aumentada en este modelo, en comparación con la de solo HUMIRA, cuando se midió tanto por síntomas clínicos o por histología. Véase la figura 30.

Ejemplo de referencia 37: Los zybodies inhiben la señalización inducida por EGF

Se sembraron células SK-BR3 a $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron (37°C , CO_2 al 5 %) durante 24 horas, momento en el cual se trató a las células con $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ de zybodies bi y triespecíficos o con Herceptin en 1 ml de medio DMEM completo con FBS al 10 % durante 24 h a 37°C . Después, se estimularon las células con 100 ng/ml de EGF durante 5 minutos. Tras la estimulación, se rompieron las células en $200\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de lisis celular (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), Triton X-100 al 1 %, NaCl 150 mM , Glicerol al 10 %, vanadato de sodio 1 mM , EDTA 5 mM e inhibidores de proteasa). Los lisados celulares se centrifugaron a 14000 RPM durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Se mezclaron e hirvieron volúmenes iguales de tampón de muestra 2X y lisados celulares a 100°C durante 5 minutos, las proteínas se resolvieron en una SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de PVDF (n.º de catálogo LC2005, Invitrogen). Las membranas se bloquearon con BSA al 3 %, Tween 20 al 0,1 % durante una noche y se incubaron con anticuerpos para fosfo-AKT (n.º de catálogo AF887, R&D systems), fosfo-ERK (n.º de catálogo AF1018, R&D systems) y ERK total (MAB1576, R&D system). Se usaron anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados a peroxidasa de rábano picante o AP (Invitrogen) para visualizar las proteínas inmunorreactivas usando quimioluminiscencia o reactivos de detección de AP, respectivamente.

Un anticuerpo biespecífico usado en este ejemplo comprendía Herceptin y un MRD de unión a EGFR (Her-egfr). Otro anticuerpo biespecífico comprendía Herceptin con un scFv de Pertuzumab (que se dirige a un epítipo de HER2 diferente al anticuerpo Herceptin) en el extremo C-terminal de la cadena pesada (Her-Pertuzumab(H)). Un anticuerpo triespecífico comprendía Herceptin con un MRD de unión a EGFR en el extremo C-terminal de la cadena pesada y un Pertuzumab-scFv en el extremo C-terminal de la cadena ligera. Otro anticuerpo triespecífico comprendía Herceptin con un MRD de unión a EGFR en el extremo C-terminal de la cadena ligera y un Pertuzumab-scFv en el extremo C-terminal de la cadena pesada (Her-zEGFR(L)-Pert(H)). Otro anticuerpo triespecífico comprendía un MRD de unión a EGFR y un a Pertuzumab-scFv que se dirige a un epítipo de HER2 diferente al del anticuerpo Herceptin (Her-Pert(L)zEGFR(H) y Her-zEGFR(L)-Pert(H)).

Las células SK-BR3 expresan niveles muy elevados de HER2 y son sensibles a los efectos antiproliferativos de Herceptin. La inhibición de AKT activado de manera constitutiva es uno de los mecanismos para los efectos antiproliferativos de Herceptin en las células que sobreexpresan HER2. Dicha sobreexpresión puede superarse mediante la adición de factores de crecimiento, tales como EGF, IGF-1 y Herregulina (HRG) mediante la inducción de la señalización intracelular promitogénica. Como se muestra en la Fig. 31, EGF-indujo la activación de las vías de AKT y ERK en células SK-BR3, como se muestra por el aumento en los niveles de AKT y ERK fosforilados. Herceptin no tuvo efecto en la activación inducida por EGF de las vías de señalización en células SK-BR3, mientras que Her-egfr y los dos zybodies triespecíficos con un péptido de direccionamiento a EGFR inhibieron los efectos del EGF. En comparación con el anticuerpo biespecífico que solo inhibió la señalización inducida por EGF, los anticuerpos triespecíficos también inhibieron de manera constitutiva los niveles activos de Akt y ERK en células SK-BR3.

Ejemplo de referencia 38: Los Zybodies inhiben la señalización inducida por Herregulina

Se sembraron células SK-BR3 a $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, se trató a las células con $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ de zybodies bi y triespecíficos o con Herceptin en 1 ml de medio DMEM completo con 10% durante 24 h a 37°C . Después, se estimularon las células con 200 ng/ml de Herregulina durante 10 minutos. Se llevó a cabo análisis por transferencia de Western para detectar los niveles de Akt y ERK fosforilados y totales como se describe en el ejemplo 37.

Herregulina se une a HER3 e induce la activación de vías de señalización a través de la formación de heterodímeros HER2-HER3. Tal como se muestra en la figura 32, Herregulina indujo la activación de Akt y ERK en células SK-BR3. Herceptin y Her-egfr no tuvieron efecto en la activación de Akt inducida por Herregulina. Pertuzumab, pero no Herceptin, bloquea la formación y señalización del heterodímero HER2-HER3 mediada por herregulina. La figura 32 muestra que los zybodies bi y triespecíficos que comprenden un Pertuzumab-scFv inhibieron completamente la activación de Akt inducida por Herregulina en células SK-BR3.

Ejemplo de referencia 39: Los Zybodies inhiben la señalización inducida por EGF y Herregulina

Se sembraron células SK-BR3 a $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, se trató a las células con $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ de zybodies bi y triespecíficos o con Herceptin en 1 ml de medio DMEM completo con 10% durante 24 h a 37°C . Después, se estimularon las células con 100 ng/ml de EGF y 200 ng/ml de Herregulina durante 10 minutos. Se llevó a cabo análisis por transferencia de Western para detectar los niveles de Akt y ERK fosforilados y totales como se describe en el ejemplo 37.

La estimulación combinada de células SK-BR3 con EGF y Herregulina dio como resultado la activación tanto de AKT como de ERK (figura 33). Herceptin, HER-efgr y HER-pertuzuScfv fueron ineficaces para bloquear los efectos combinados de EGF y Herregulina. Los zybodies triespecíficos que contenían tanto un péptido de direccionamiento a EGFR como un Pertuzumab-scfv inhibieron de manera competitiva la activación de Akt y ERK inducida por EGF y Herregulina en células SK-BR3.

Ejemplo de referencia 40: Los zybodies regulan negativamente a EGFR en la superficie celular

Se sembraron células SK-BR3 a $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, se trató a las células con $10 \mu\text{g/ml}$ de zybodies bi y triespecíficos, Herceptin, Erbitux, EGF y combinaciones de los mismos en 1 ml de medio DMEM completo con FBS al 10 % durante 24 h a 37°C como se ha indicado. Se desprendieron las células y se determinaron los niveles de EGFR en las células mediante citometría de flujo usando anticuerpo anti-EGFR conjugado a PE.

Los zybodies usados en este experimento fueron un anticuerpo Herceptin con un MRD de unión a EGFR en el extremo C-terminal de la cadena pesada (HER-egfr(H)); un anticuerpo Humira con un MRD de unión a EGFR en el extremo C-terminal de la cadena pesada (HUM-egfr(H)); Herceptin con un Pertuzumab-scfv en el C-terminal de la cadena pesada (HER-perscfv(H)); Humira con un Pertuzumab-scfv en el C-terminal de la cadena pesada (HUM-perscfv(H)); Herceptin con un Pertuzumab-scfv en el extremo C-terminal de la cadena ligera y un MRD de unión a EGFR en el C-terminal de la cadena pesada (HER-perscfv(L)-egfr(H)); Herceptin con un Pertuzumab-scfv en el extremo C-terminal de la cadena pesada y un MRD de unión a EGFR en el C-terminal de la cadena ligera (HER-perscfv(H)-egfr(L)); y un anticuerpo Humira con un MRD de unión a EGFR (HUM-egfr).

Erbitux, EGF y los zybodies bi y triespecíficos que contienen péptidos que se dirigen a egfr regulan negativamente los niveles de receptor de EGFR en la superficie células. Figuras 34A y B. El tratamiento con HER-egfr durante 24 h fue más eficaz (61 %) que solo HUM-egfr (27 %) o en combinación HUM-egfr más Herceptin (41 %) y Erbitux más Herceptin (51 %) (figuras 34A y B). Esto indica que el uso como diana simultánea de EGFR y HER2 en formato de zybodies era más eficaz para regular negativamente a EGFR que una combinación de dos anticuerpos idénticos. Además, el tratamiento con anticuerpos triespecíficos que se dirigen a EGFR y dos epítomos de HER2 regularon negativamente por completo (99 %) los niveles de EGFR en células SK-BR3.

Ejemplo de referencia 41: Los zybodies regulan negativamente la expresión de EGFR

Se sembraron células SK-BR3 a $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, se trató a las células con $10 \mu\text{g/ml}$ de zybodies bi y triespecíficos o con Herceptin en 1 ml de medio DMEM completo con 10% durante 24 h a 37°C . Los lisados celulares se prepararon y se llevó a cabo el análisis por transferencia de Western para detectar EGFR usando el anticuerpo para EGFR (n.º de catálogo MAB10951, R&D system) y los niveles de ERK total como se describe en el ejemplo 37.

El tratamiento con Herceptin y Her-Pertuzumab scfv no tenía efecto en los niveles de EGFR en células SK-BR3. HER-egfr regularon negativamente de manera parcial la proteína EGFR y se observó una degradación de EGFR prácticamente completa en células tratadas con zybodies triespecíficos.

Ejemplo de referencia 42: Los zybodies aumentan la potencia del MRD

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos para examinar el efecto que tiene la fusión de anticuerpo en la potencia del MRD. Se recubrieron pocillos individuales de una placa de 96 pocillos con IGF1R y ErbB2-Fc (HER2) ($1 \mu\text{g/ml}$) a diversas proporciones. Se lavaron los pocillos y después se añadieron diluciones seriadas de zybodies en presencia de IGF-1 marcado con biotina. Los zybodies usados fueron un anticuerpo Herceptin que contenía un MRD dirigido a IGF1R en el extremo C-terminal de la cadena pesada (HER-igfr(H)) y un anticuerpo Humira que contenía un MRD dirigido a IGF1R en el extremo C-terminal de la cadena pesada (HUM-igfr(H)). Se cuantificó IGF-1 unido mediante la adición de estreptavidina-HRP. Los resultados se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 8: Inhibición de la unión a IGF-1, CI_{50} (nM)

Zybodies	Relación de IGF1R:HER2			
	1:0	3:1	1:1	1:3
HER-igfr(H)	220	20,91	1,44	0,14
HUM-igfr(H)	240	189,9	186	111

La inhibición de la unión de la unión a IGF-1 fue similar para ambos zybodies ensayados cuando las placas no contenían ErbB2-Fc (HER2) (CI_{50} de HER-igfr(H) = 220 nM; CI_{50} de HUM-igfr(H) = 240 nM). Cuando las placas contenían tanto la diana de anticuerpo como la diana del MRD, se redujo drásticamente la unión de MRD a la diana. Por ejemplo, usando el zybodies HER-igfr(H), la inhibición de IGF-1 se redujo de CI_{50} =220 nm cuando la diana del

anticuerpo no se encontraba en las placas (relación de IGFR1R:HER2 = 1:0) hasta una $CI_{50}=1,44$ cuando la diana del anticuerpo y la diana del MRD estaban presentes en las placas en cantidades equivalentes (relación de IGFR1R:HER2 = 1:1). Los datos indican que el acoplamiento tanto del anticuerpo como de las dianas de MRD por HER-igflr(H) aumenta la potencia del MRD de baja afinidad para IGF-1R >1000 veces. Por el contrario, este efecto drástico no se observó cuando se llevó a cabo el mismo experimento usando un zybody que contenía el anticuerpo Humira, que no se une a HER2 a pesar de que el zybody contenía el mismo MRD dirigido a IGF1R. Por lo tanto, los zybodyes biespecíficos presentan una potencia mejorada del MRD mediante unión impulsada por avidez heterotípica.

Ejemplo 43: Las restricciones conformacionales pueden aumentar la unión y la estabilidad del MRD

A fin de determinar el efecto de las restricciones conformacionales de los MRD en el contexto de un anticuerpo que contiene MRD, se desarrollaron varias construcciones de MRD modificadas que contenían cisteínas en varias ubicaciones. Las cisteínas forman enlaces disulfuro intermoleculares y por lo tanto, contienen la conformación tridimensional de las proteínas. El MRD que se alteró en este experimento fue MPM. La secuencia de MPM, que se muestra en la tabla a continuación, es similar a la secuencia de Im32 (descrita anteriormente), pero contiene cuatro cambios de aminoácidos: M5G, N16Q, L19A y Q24E. La G en la posición cinco en MPM minimiza la oxidación potencial en el resto de metionina y L19A y Q24E eliminan las secuencias potencialmente inmunogénicas. En estos experimentos, se fusionaron todos los MRD al extremo C-terminal de la cadena pesada de Herceptin.

Las composiciones multivalentes y multiespecíficas resultantes (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) se ensayaron posteriormente respecto de la unión a la diana y la estabilidad. La estabilidad se determinó administrando el anticuerpo que contiene MRD mediante inyección IV a ratones y comparando los niveles de MRD en el plasma 15 minutos después de la inyección con los niveles de MRD en el plasma 2, 3 o 4 días después de la inyección. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 9.

Tabla 9: Unión y estabilidad de MRD restringidos

Construcción	Secuencia	CE50 nM	% de MRD 48h
HER-2x-con4	AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGS GSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEH MLE (SEQ ID NO:136)	0,018	70
HER-Im32(H)	<u>KSLSLSPGK</u> GGGSMGAQTNFMPMDND ELLLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:34)	0,033	23
HER-mpm(H)	<u>KSLSLSPGSGGGSGGA</u> QTNFMPMDQD EALLYEEFILQQGLE (SEQ ID NO:56)		19
HER-Im32 (MPM Q8C G30C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSGGACT</u> NFMPMDQD EALLYEEFILQQCLE (SEQ ID NO:57)	4,06	
HER-Im32 (MPM T9C G30C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSGGAQC</u> NFMPMDQD EALLYEEFILQQCLE (SEQ ID NO:58)	0,598	38
HER-Im32 (MPM N10C G30C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSGGAQT</u> CFMPMDQD EALLYEEFILQQCLE (SEQ ID NO:67)	0,177	9
HER-Im32 (MPM F11C G30C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSGGAQT</u> NCMPMDQD EALLYEEFILQQCLE (SEQ ID NO:68)	5,91	
HER-Im32 (MPM N10C L28C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSGGAQT</u> CFMPMDQD EALLYEEFICQQGLE (SEQ ID NO:69)	0,403	33
HER-Im32 (MPM M5C G30C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSCGA</u> QTNFMPMDQD EALLYEEFILQQCLE (SEQ ID NO:70)	0,0641	60
HER-Im32 (MPM M5C L28C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSCGA</u> QTNFMPMDQD EALLYEEFICQQGLE (SEQ ID NO:101)	0,109	14

Construcción	Secuencia	CE50 nM	% de MRD 48h
HER-Im32 MPM A7C G30C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSGGCQTNFMPMDQD</u> EALLYEEFILQQCLE (SEQ ID NO:108)	0,174	82
HER-Im32 (MPM P13C G30C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSGGAQTNFMCMDQD</u> EALLYEEFILQQCLE (SEQ ID NO:109)		
HER-Im32 (MPM M5C N10C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSCGAQTCFMPMDQD</u> EALLYEEFILQQGLE (SEQ ID NO:110)	0,2	13
HER-Im32 (MPM M5C F11C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSCGAQTNCMPMDQD</u> EALLYEEFILQQGLE (SEQ ID NO:111)		
HER-Im32 (MPM D5N10C G30C)(H)	<u>KSLSLSPGSGGGSCFMPMDQDEALLYE</u> EFILQQCLE (SEQ ID NO:112)	0,751	3
HER-Im32 (MPM D5 N10C L28C) (H)	<u>KSLSLSPGSGGGSCFMPMDQDEALLYE</u> EFICQQGLE (SEQ ID NO:113)	0,697	36

Los resultados demostraron que la adición de dos restos de cisteína fuera del dominio de unión a diana de núcleo (por ejemplo, PMDQDEALLY en MPM) de un MRD puede aumentar la semivida del MRD sin reducir sustancialmente la afinidad de unión.

5

Las construcciones que contienen una cisteína ubicada próxima al extremo de la molécula (por ejemplo, a una distancia de aproximadamente dos aminoácidos desde el extremo) y una cisteína ubicada en el extremo contrario del dominio de unión a diana (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 o aproximadamente 4-7 aminoácidos fuera del dominio de unión de núcleo) y próxima a la proteína de fusión (por ejemplo, a una distancia de aproximadamente 4-6 aminoácidos respecto del enlazador o la secuencia de anticuerpo) pueden mostrar una semivida aumentada del MRD sin reducir sustancialmente la afinidad de unión. Además, los MRD pueden incluir cisteínas dentro del sitio de unión a la diana, en particular, en cualquiera de los dos extremos del sitio de unión a la diana puede haber MRD que tengan tanto una alta estabilidad como una unión a la diana eficiente.

10

15

Las nuevas composiciones multivalentes y multiespecíficas (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) en las que los MRD tienen una larga semivida *in vivo* y una eficiente unión a la diana pueden identificarse alterando las secuencias del MRD para incluir al menos dos cisteínas. Las cisteínas pueden encontrarse a al menos aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 aminoácidos de distancia entre sí. El potencial de unión y la semivida del MRD en el anticuerpo que contiene MRD se evalúa usando técnicas conocidas y los métodos descritos en el presente documento. Los anticuerpos que contienen MRD se administran a ratones por vía intravenosa. Se extrae plasma de los ratones poco después de la administración (por ejemplo, 15 minutos después de la administración) y en un punto de tiempo posterior (por ejemplo, 2, 3 o 4 días después de la administración). Las composiciones multivalentes y multiespecíficas útiles (por ejemplo, anticuerpos que contienen MRD) que se unen de manera eficiente a la diana de MRD y son estables *in vivo* (por ejemplo, al menos aproximadamente un 50 % del MRD está presente 48 horas después de la administración) se identifican.

20

25

30

Ejemplo de referencia 44: Anticuerpos que contienen MRD para la eliminación de linfocitos T redirigida

Se prepararon moléculas de fusión de anticuerpo-MRD mediante la fusión de un péptido dirigido a CD3 a un anticuerpo anti-CD19 y mediante la fusión de un péptido dirigido a CD19 a un anticuerpo anti-CD3. Los anticuerpos que contienen MRD se analizan mediante análisis por citometría de flujo en células Jurkat positivas a CD3, PBMC humanas y una serie de líneas celulares de linfoma de linfocitos B positivas a CD19 (por ejemplo, SKW6.4, Blin I, BJAB, Daudi y Raji) para determinar sus afinidades de unión específicas para cada diana. Ya que BL60 y las líneas celulares plasmacitoides NCI y L363 son negativas para CD3 y CD19, se usan como células de control negativo para determinar la especificidad de los anticuerpos que contienen MRD. También pueden usarse células Jurkat negativas a CD3 como población celular de control negativo. Las líneas celulares se cultivan en RPMI 1640 completo (Invitrogen) con FCS al 10 % (GIBCO).

35

40

Las células se lavan con PBS y se bloquean mediante resuspensión en PBS con IgG humana al 10 % (Innovative Research) y NaN₃ al 0,1 % (tampón de bloqueo) durante 30 min a 4 °C. Después, se sedimentan las células por centrifugación (100xg durante 5 min) con los anticuerpos que contienen MRD en tampón de bloqueo durante 30 min a 4 °C. Las células se lavan tres veces con PBS y se detectan los anticuerpos que contienen MRD unidos a la superficie celular. La citometría de flujo puede llevarse a cabo mediante un BD FACScan.

Ejemplo de referencia 45: Citotoxicidad *in vitro* de anticuerpos que contienen MRD para la eliminación de linfocitos T redirigida

Los anticuerpos biespecíficos para CD19/CD3 que contienen MRD se ensayan respecto de sus capacidades para inducir la eliminación redirigida por linfocitos T de células de linfoma positivas a CD19. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en forma de células efectoras de capas leucocitarias frescas de donantes aleatorios usando centrifugación por gradiente Lymphoprep™ (Nycomed/Axis-Shield PoC) con centrifugación posterior a 100xg para retirar las plaquetas. Los linfocitos B positivos a CD19 se eliminan usando Dynabeads® CD19 Pan B (Life Technologies). Las poblaciones de PBMC se analizan mediante citometría de flujo antes y después de la eliminación de linfocitos B CD19 positivos mediante marcaje con anticuerpo de ratón conjugado a FITC contra CD19 humano y se contratiñó con un anticuerpo anti-CD45 conjugado a PE. Las PBMC se incubaron durante una noche a 37 °C con un 5 % de CO₂. Las líneas de linfocitos B CD19 positivas (por ejemplo, SKW6.4, Blin I, BJAB, Daudi y Raji) se usaron como células diana.

Las células diana se incuban en placas de 96 pocillos usando medio completo RPMI 1640 (Invitrogen) con FCS al 10 % (GIBCO) a diferentes densidades, de tal forma que la adición del mismo número de PBMC no estimuladas dio como resultado diferentes relaciones de efector a diana (E:T). Después, se añadieron diversas concentraciones de anticuerpos biespecíficos para CD19/CD3 que contienen MRD a cada pocillo, seguido de la adición de PBMC no estimuladas. Las placas se incubaron a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante 3 h. La citotoxicidad puede medirse usando el ensayo de citotoxicidad DELFIA® EuTDA (PerkinElmer) en placas de 96 pocillos de fondo redondo siguiendo las instrucciones del fabricante. La muerte celular espontánea se mide incubando las células diana sin células efectoras o anticuerpos que contienen MRD y se determina la muerte celular máxima incubando las células diana con Triton X-100 al 10 %. La fracción de lisis celular específica se calcula como la proporción entre la citotoxicidad mediada por efector ([muerte celular experimental] - [muerte celular espontánea]) y la citotoxicidad máxima esperada ([muerte celular máxima] - [muerte celular espontánea]).

Ejemplo de referencia 45: Eficacia *in vivo* de anticuerpos que contienen MRD para la eliminación de linfocitos T redirigida

Se extraen células de linfoma B Raji del cultivo celular rutinario, se lavan en PBS y se preparan en forma de 1×10^7 células/ml. Después, se inocula a ratones NOD/SCID por vía subcutánea con 1×10^6 células Raji con o sin 5×10^6 PBMC (como se han preparado anteriormente) en una solución de Matrigel al 50 %. Los anticuerpos biespecíficos para CD19/CD3 que contienen MRD se administran por vía intravenosa 1 h después de la inoculación de células de linfoma. Como controles negativos, también se administran por vía intravenosa 1 h después de la inoculación de células de linfoma, anticuerpos biespecíficos que contienen MRD dirigidos a HER2 y CD3 (es decir, un MRD de unión a CD3 fusionado a un anticuerpo anti-HER2 y un MRD de unión a HER2 fusionado a un anticuerpo anti-CD3) y a HER2 y CD19 (es decir, un MRD de unión a CD19 fusionado a un anticuerpo anti-HER2 y un MRD de unión a HER2 fusionado a un anticuerpo anti-CD19) y PBS. Los anticuerpos que contienen MRD o PBS se administran de una vez al día a cuatro veces al día tras la dosis inicial. Los tumores subcutáneos se miden mediante un calibre para determinar la velocidad de crecimiento para cada grupo de tratamiento. También se determina el peso corporal de los ratones dos veces a la semana como indicador de la tolerabilidad del tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Un dominio de reconocimiento modular (MRD), en donde el MRD es un péptido capaz de unirse a ANG2 y en donde el MRD comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16. SEQ ID NO: 16: DCAVYPNPPWCYKMEFGK
2. Un complejo que comprende el MRD de la reivindicación 1 unido operablemente a un anticuerpo.
3. El complejo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo se une a VEGF (por ejemplo, VEGFA o VEGFB), FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF8b, FGF19, FGFR1 (por ejemplo, FGFR1-IIIC), FGFR2 (por ejemplo, FGFR2-IIla, FGFR2-IIlb y FGFR2-IIlc), FGFR3, TNF, EFNa1, EFNa2, ANG1, ANG2, IL1, IL1beta, IL6, IL8, IL18, HGF, PDGFA, PLGF, PDGFB, CXCL12, KIT, GCSF, CXCR4, PTPRC, TIE2, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Notch 1, DLL4, EGFL7, α 2 β 1 integrina, α 4 β 1 integrina, α 5 β 1 integrina, α v β 3 integrina, TGFb, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, PLAUI, VCAM1, PDGFRA o PDGFRB.
4. El complejo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo se une a TNF.
5. El complejo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es adalimumab.
6. El complejo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo compete con adalimumab por la unión a TNF.
7. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6.
8. Un complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.
9. Un complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6 para su uso en un método de tratamiento de la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, diabetes, colitis ulcerosa o esclerosis múltiple.
10. Un complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 para su uso en un método para tratar la artritis.
11. El complejo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el complejo es para su uso con un inhibidor de proteína cinasa.

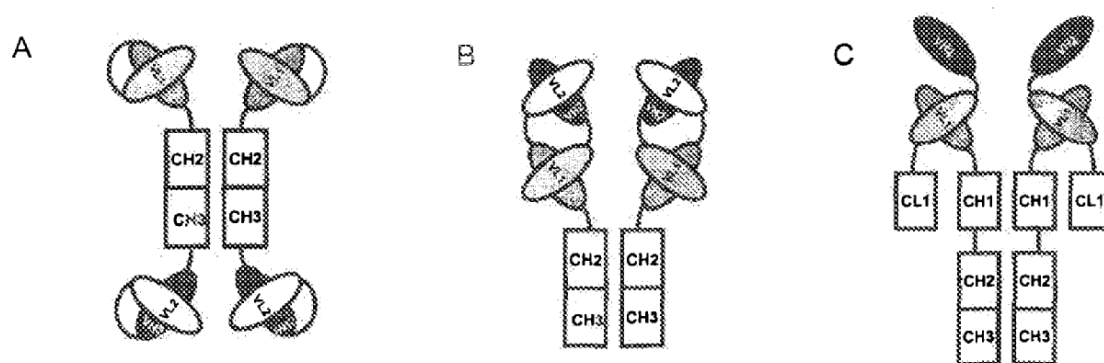


FIG. 1

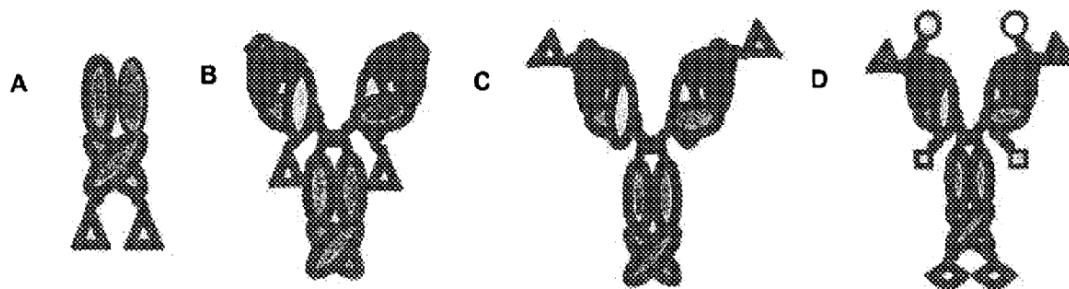


FIG. 2

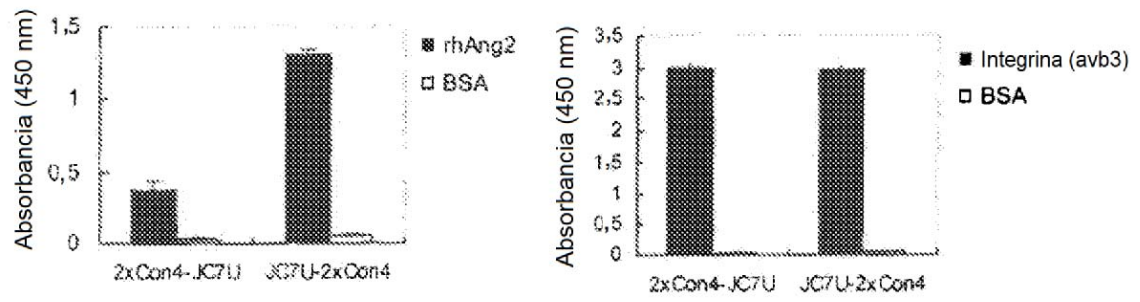


FIG. 3

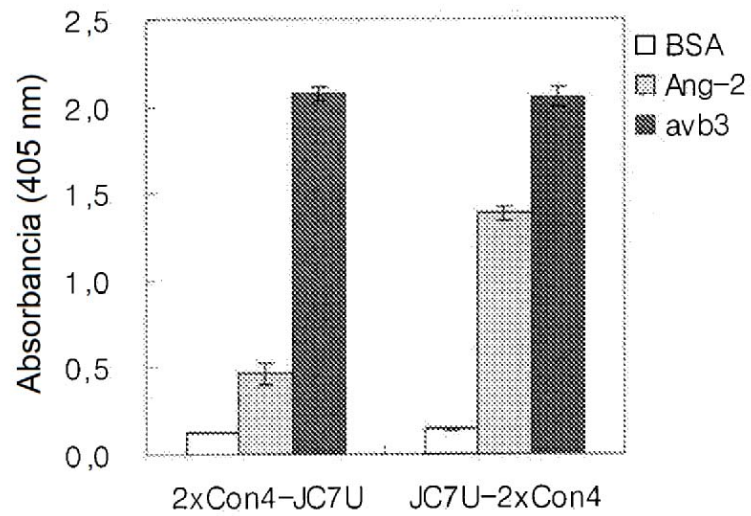


FIG. 4

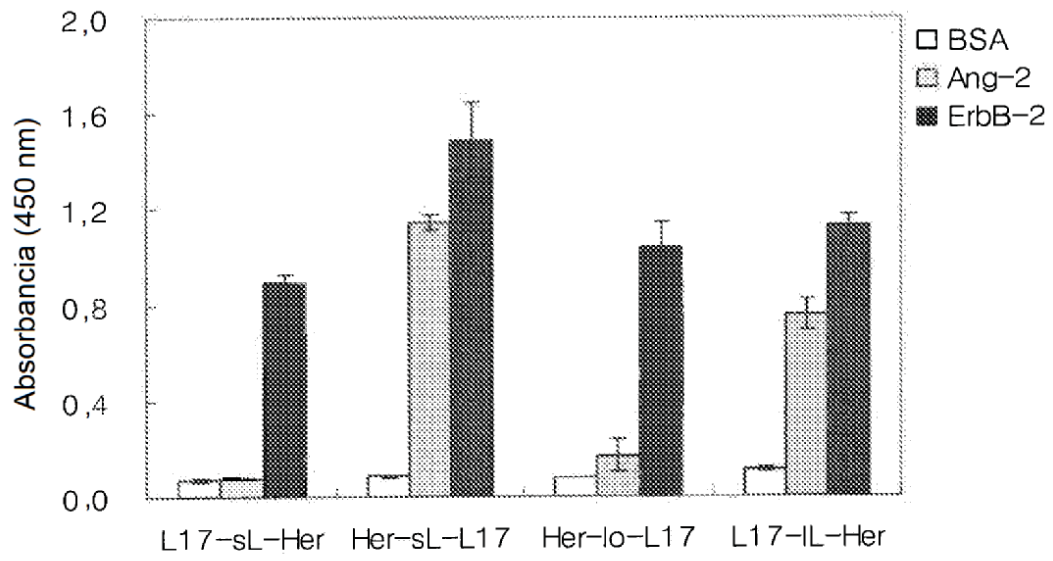


FIG. 5

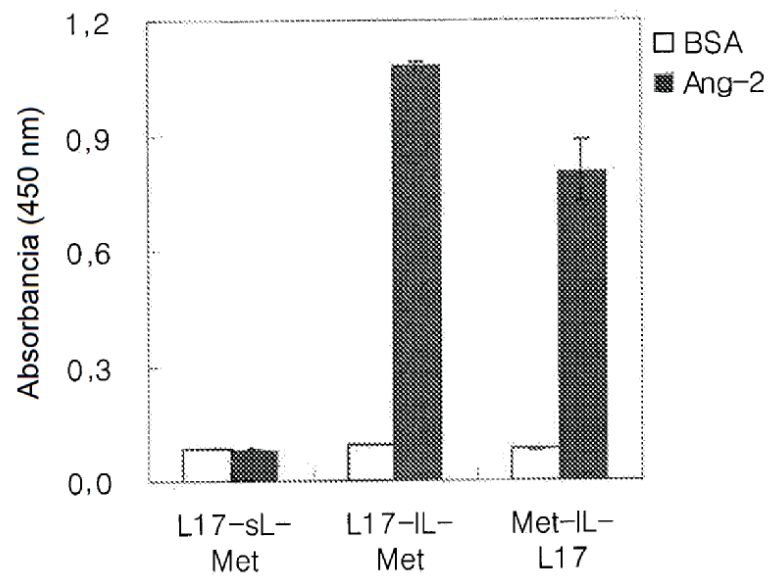


FIG. 6

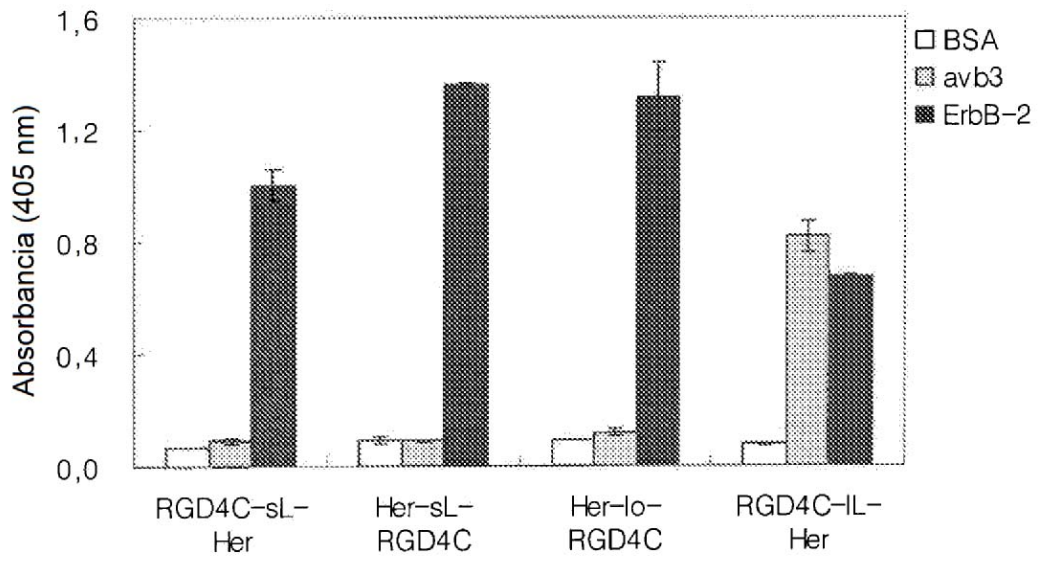


FIG. 7

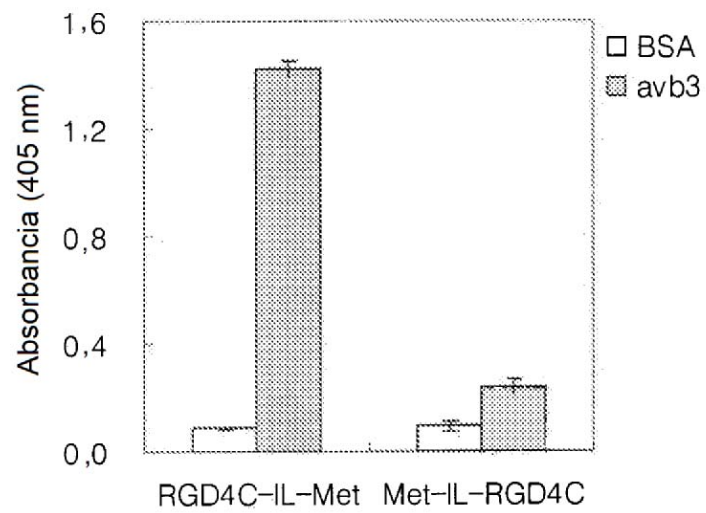


FIG. 8

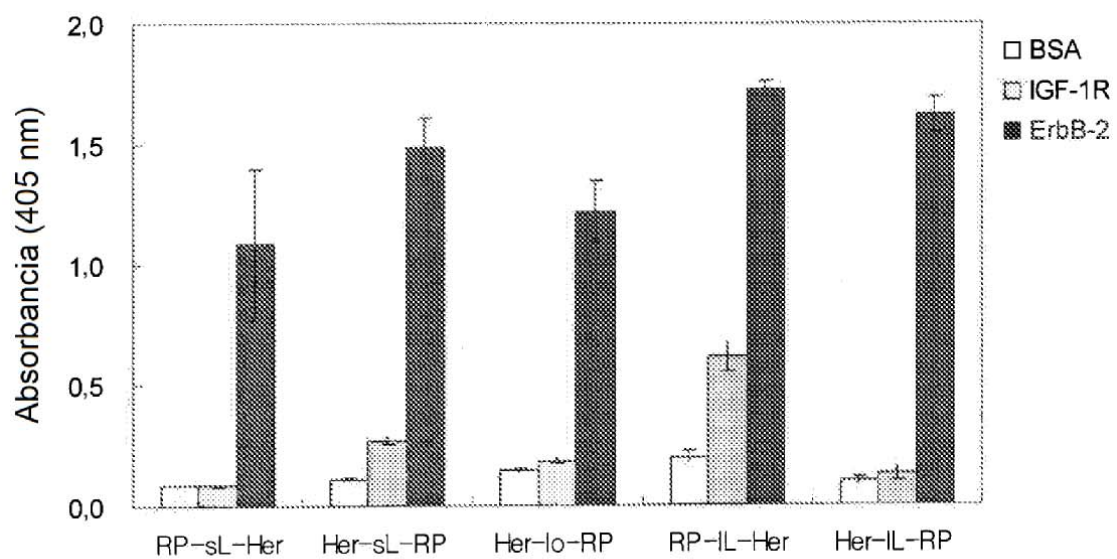


FIG. 9

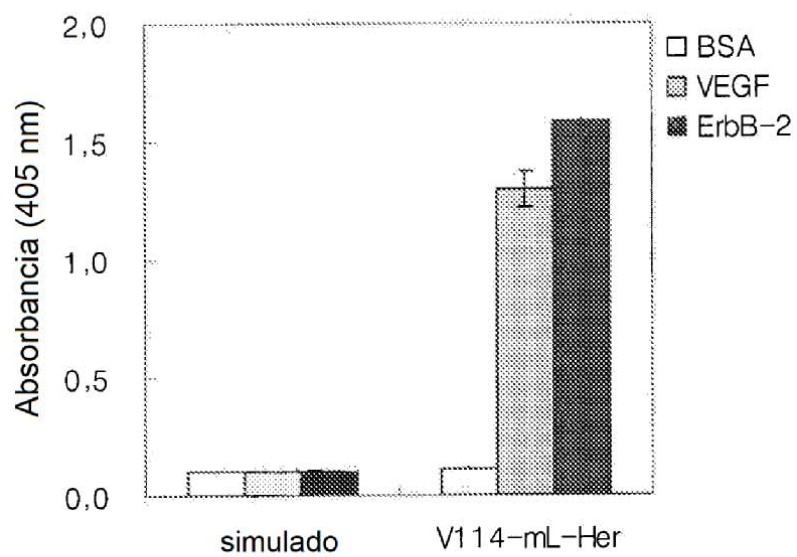


FIG. 10

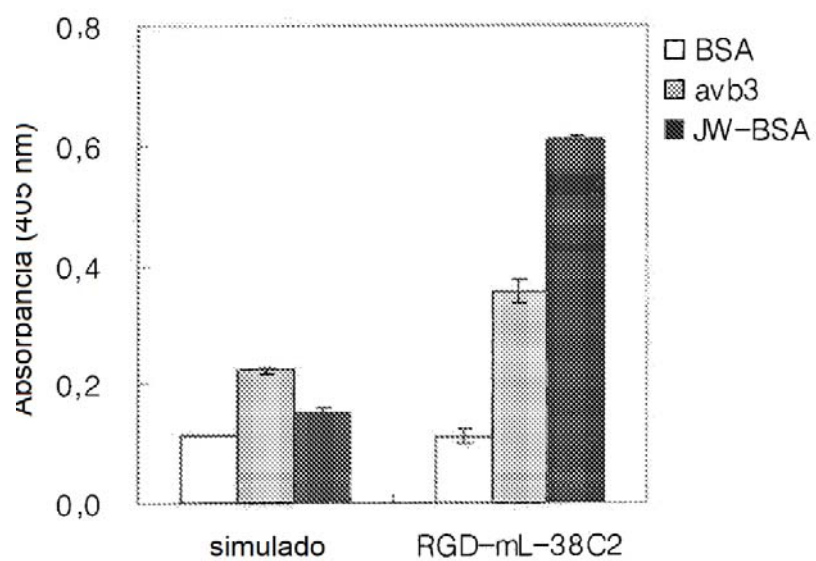


FIG. 11

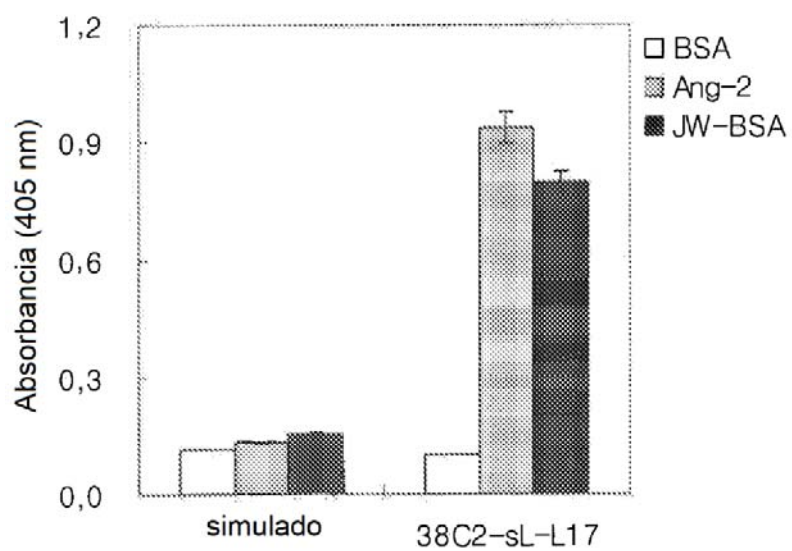


FIG. 12

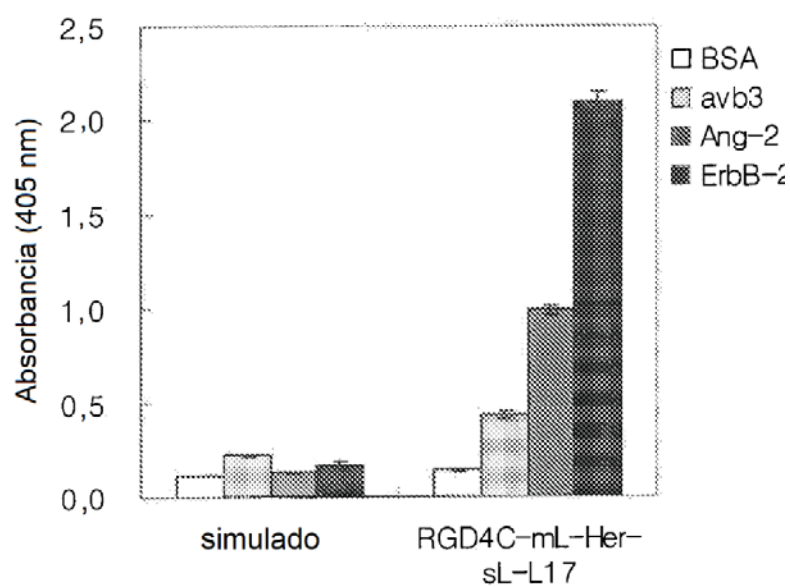


FIG. 13

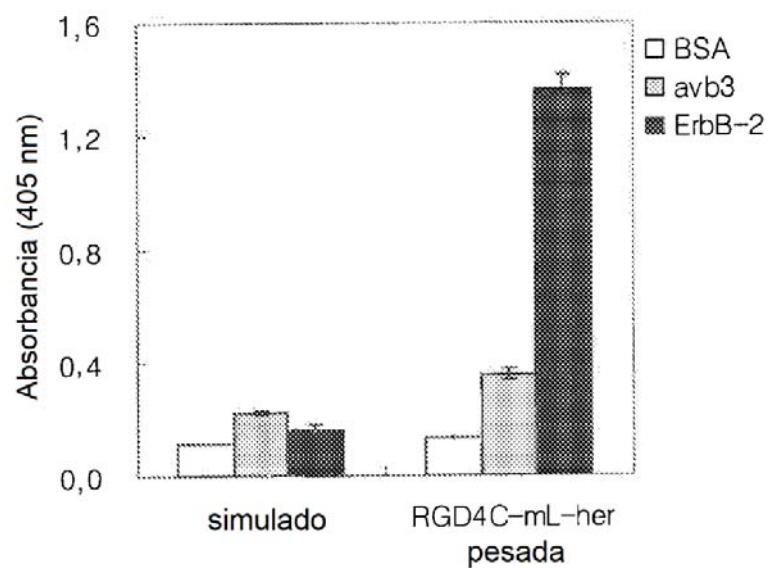


FIG. 14

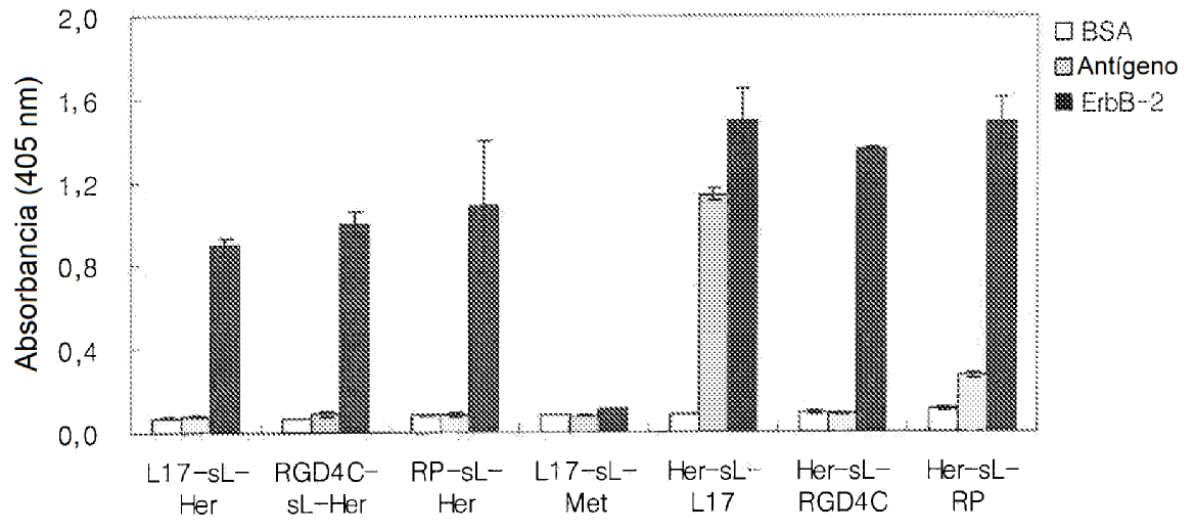


FIG. 15

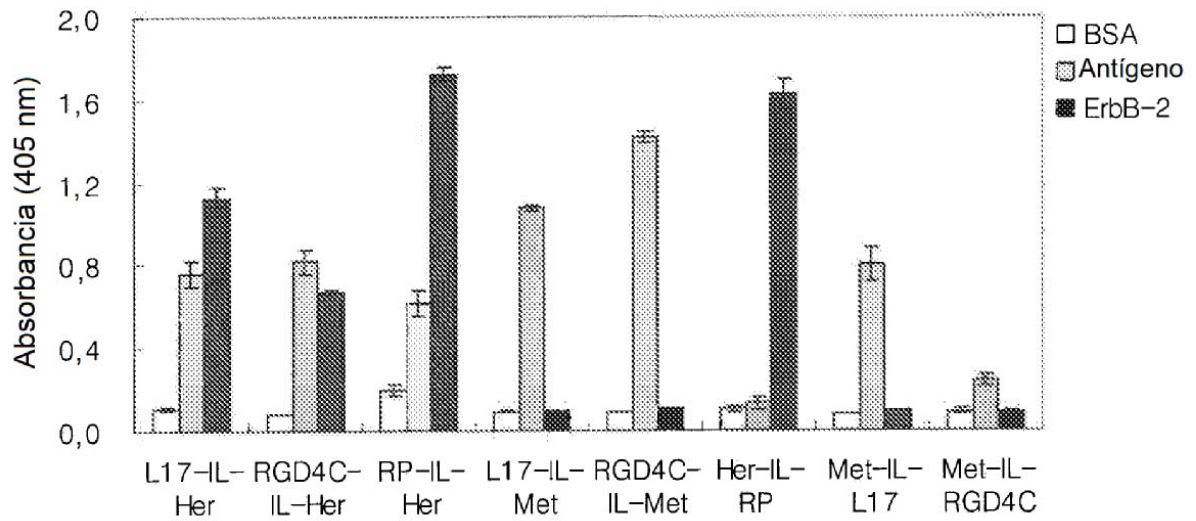


FIG. 16

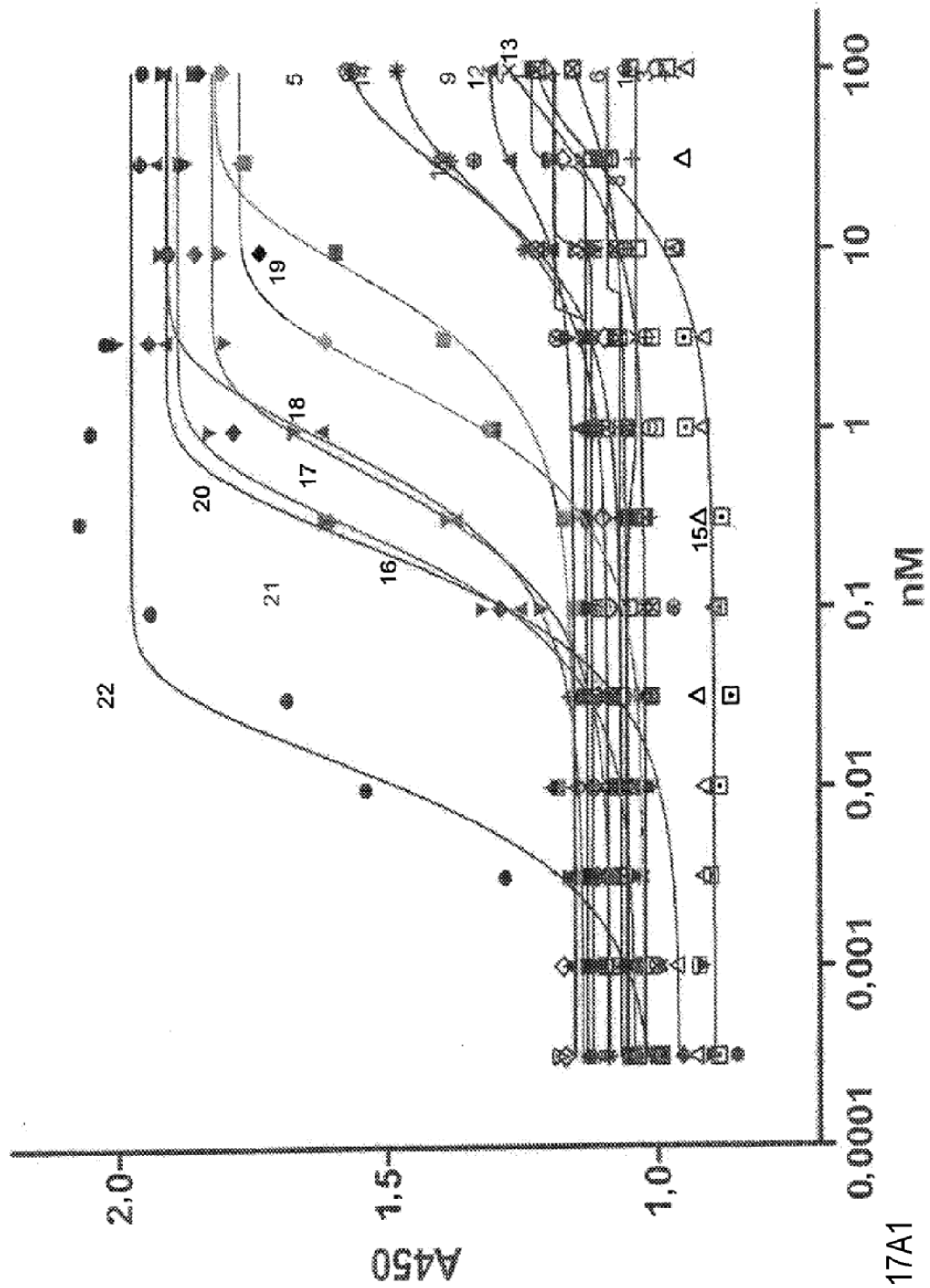


Figura 17A1

1 ▽	L17D MQD	5 ⊗	L17D MED	9 ▲	L17D MYD	13 ◇	L17D MVD	17 ▲	L17D MGD	21 ▼	L17D MDD	5/7
2 ▼	L17D MPD	6 ⊗	L17D MID	10 ○	L17D MFD	14 *	L17D MHD	18 *	L17D MSD	22 *	2xLm32	4/23
3 □	L17D MWD	7 ▲	L17D MLD	11 ⊗	L17D MFD*	15 ⊗	L17D MRD	19 *	L17D MTD			
4 ⊗	L17D MND	8 +	L17D MKD	12 ×	L17D MAD	16 ▼	L17D MND	20 *	Lm32 KtoS			

Figura 17A2

Proteína	Clon ID	Secuencia de DRM	CE ₅₀ , nM
L1-7D MDD	ZC12	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:114)	0.153
L1-7D MQD	1A12	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:115)	>100
L1-7D MVD	2A1	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:116)	>100
L1-7D MHD	3C3	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:117)	17.00
L1-7D MND	4H4	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:118)	0.411
L1-7D MKD	5A8	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:119)	>100
L1-7D MAD	6A3	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:120)	>100
L1-7D MSD	7B2	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:121)	1.380
L1-7D MRD	8B12	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:122)	>100
L1-7D MGD	9C7	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:123)	0.600
L1-7D MTD	10B12	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:124)	7.340
L1-7D MYD	11B10	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:125)	>100
L1-7D MPD	12C12	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:126)	>100
L1-7D MID	13D5	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:127)	>100
L1-7D MFD	14F11	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:128)	>100
L1-7D MWD	15G12	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:129)	>100
L1-7D MLD	16E5	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:130)	>100
L1-7D MED	17F9	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:131)	>100
L1-7D MMD	18E3	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:132)	>100
L1-7D MFD*	14G4*	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDDDEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:133)	>100
Lm32 KtoS	ZC10	PGSGGGSMGAQTNFMPMPDNDDELLLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:134)	0.199
Lm32 2X	ZC39	PGKGGGSMGAQTNFMPMPDNDDELLLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:135) L1LYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:135)	0.005

Figura 17B

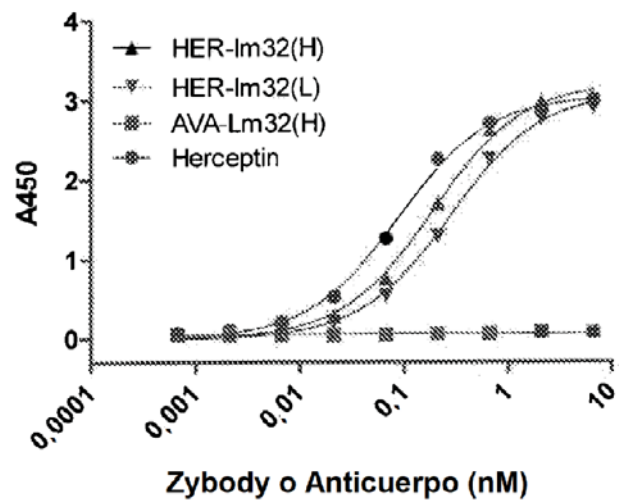


Figura 18A.

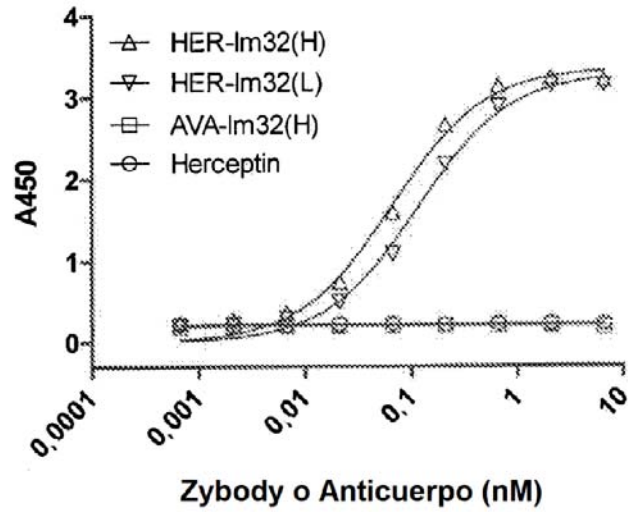


Figura 18B.

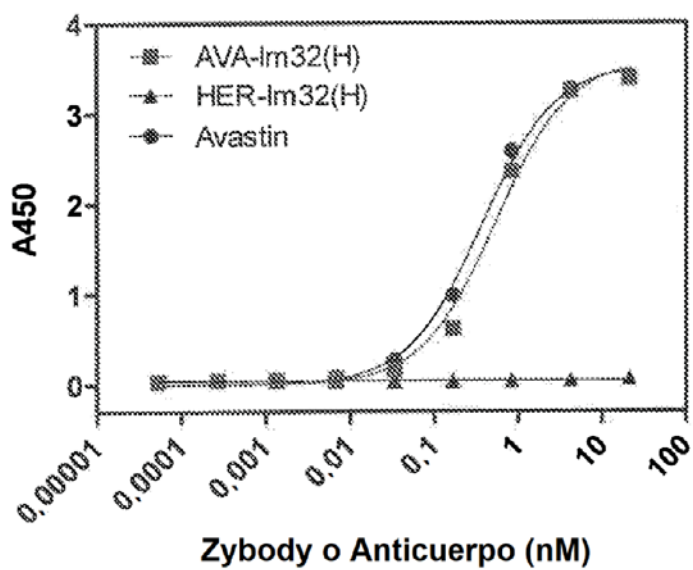


Figura 19A.

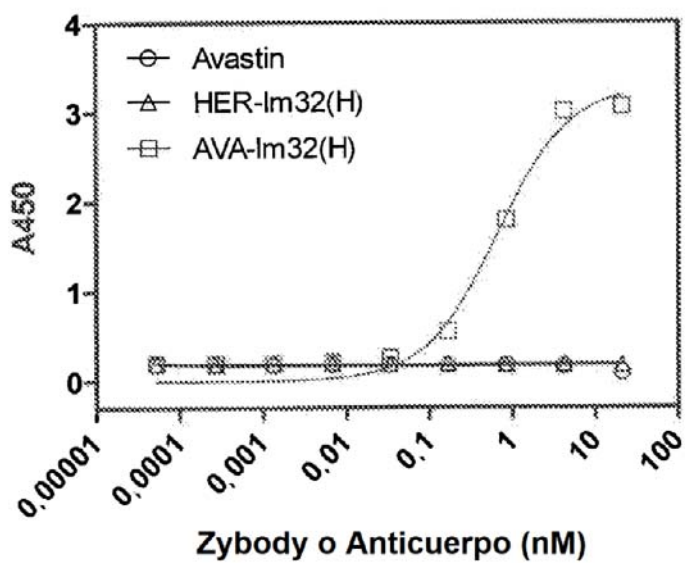
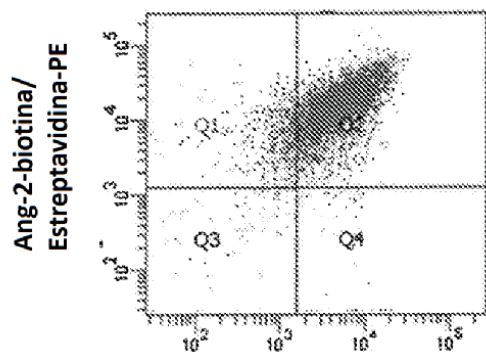
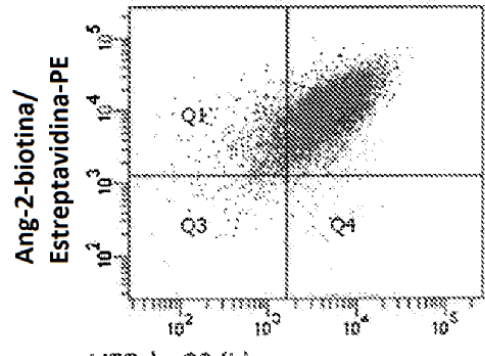


Figura 19B.



HER-Im32 (H)

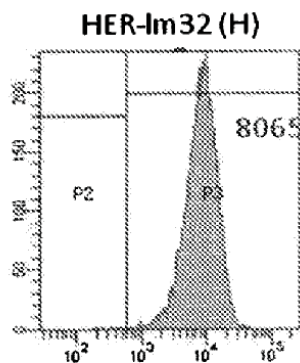
anticuerpo de ratón anti Ig kappa humana
+ FITC



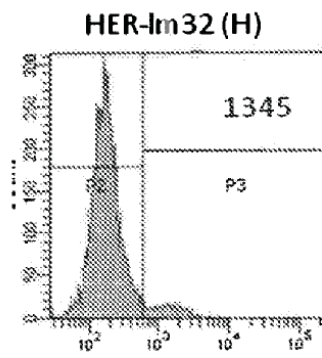
HER-Im32 (L)

anticuerpo de ratón anti Ig kappa humana
+ FITC

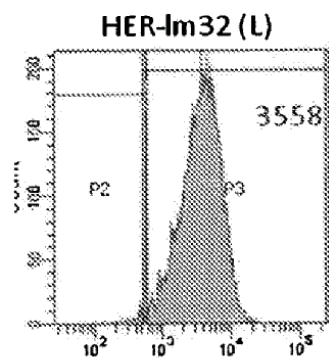
Figura 20A



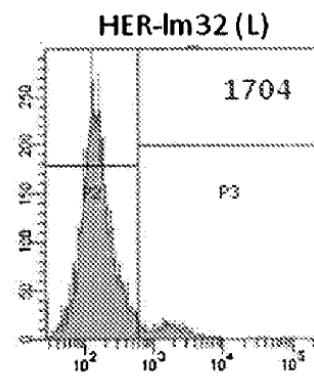
Ang-2-biotina/
Estreptavidina-PE



Ang-2-biotina/
Estreptavidina-PE + 10X Herceptin



Ang-2-biotina/
Estreptavidina-PE



Ang-2-biotina/
Estreptavidina-PE + 10X Herceptin

Figura 20B

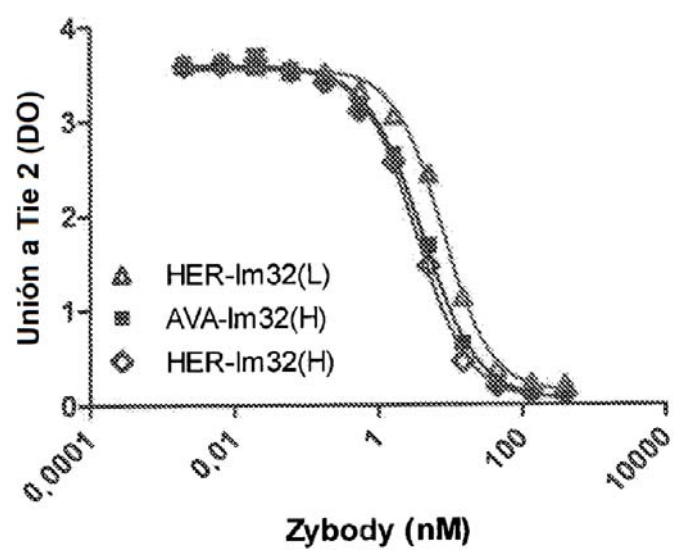


Figura 21

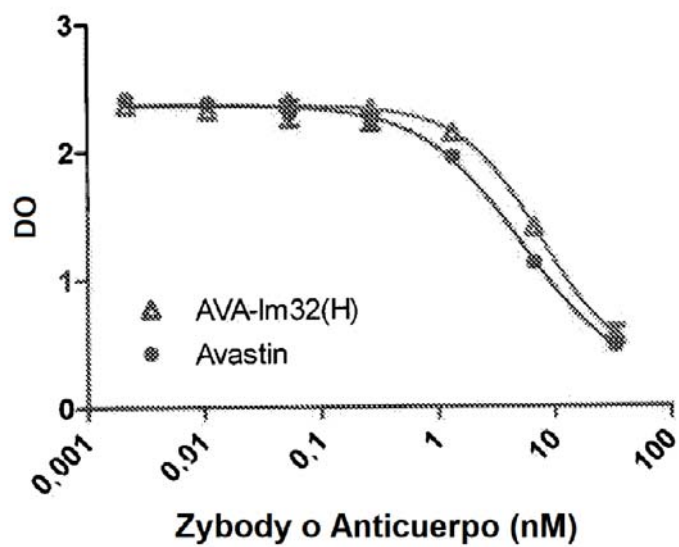


Figura 22

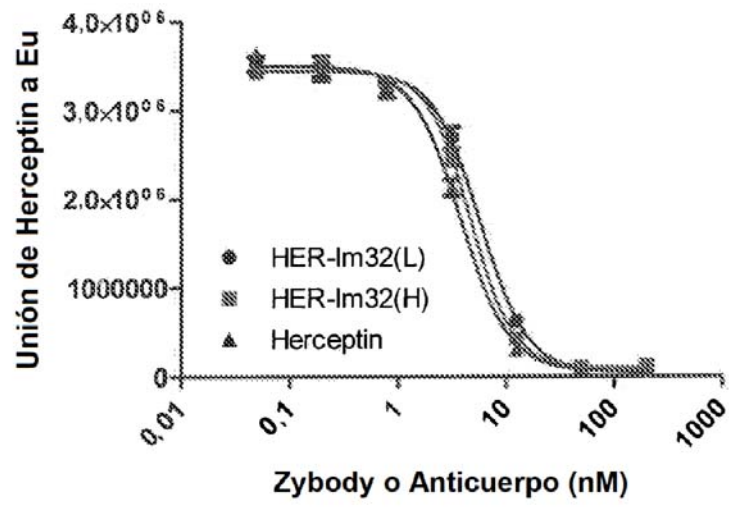


Figura 23

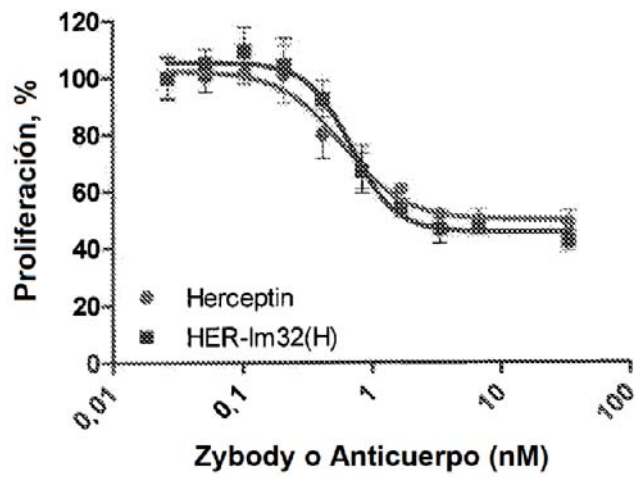


Fig. 24A

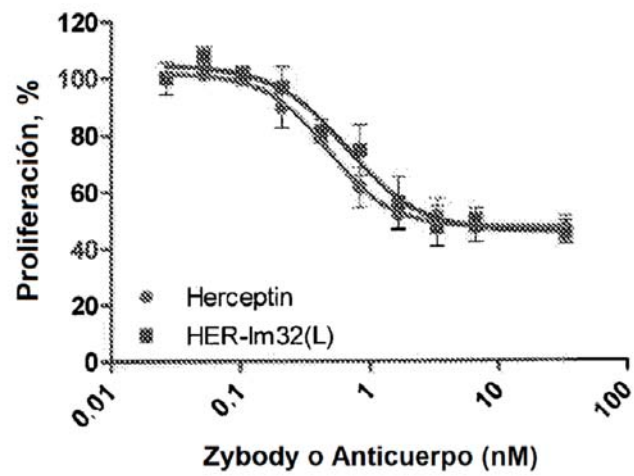


Fig 24B

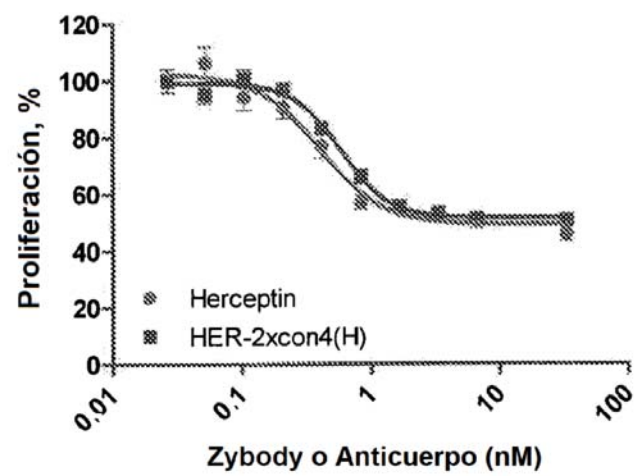


Fig 24C

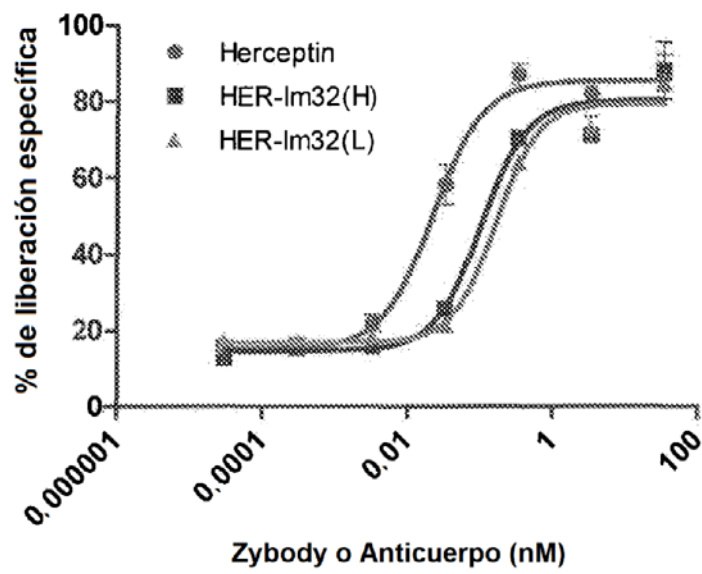


Fig. 25A

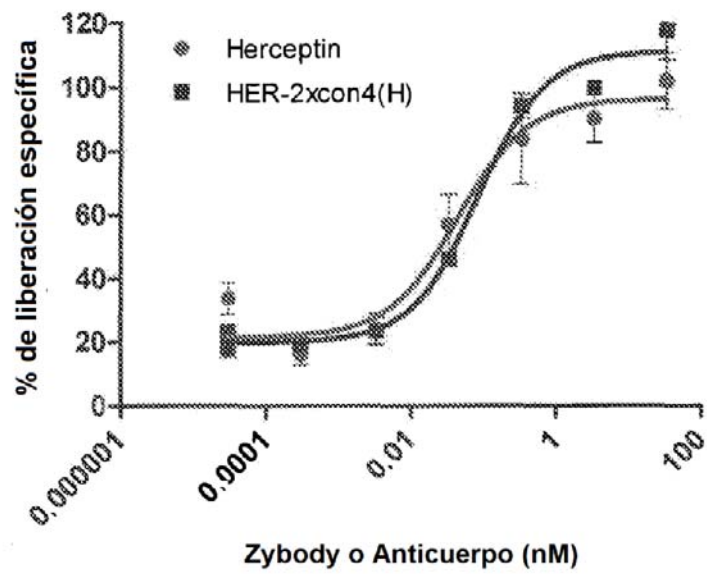


Fig. 25B

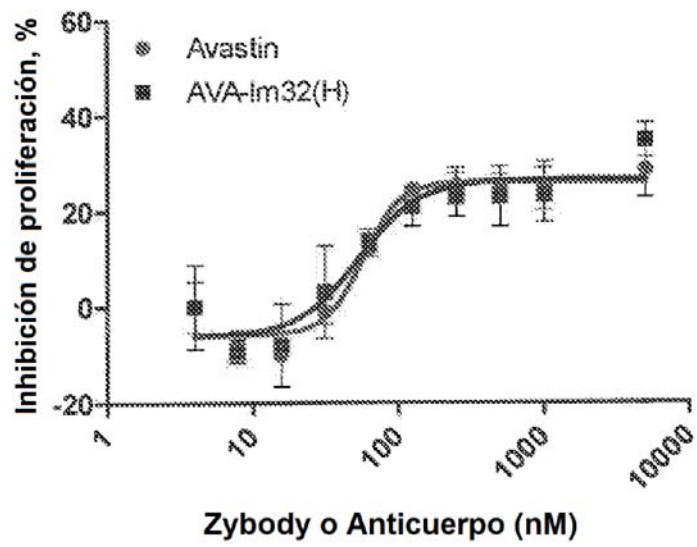


Fig. 26A

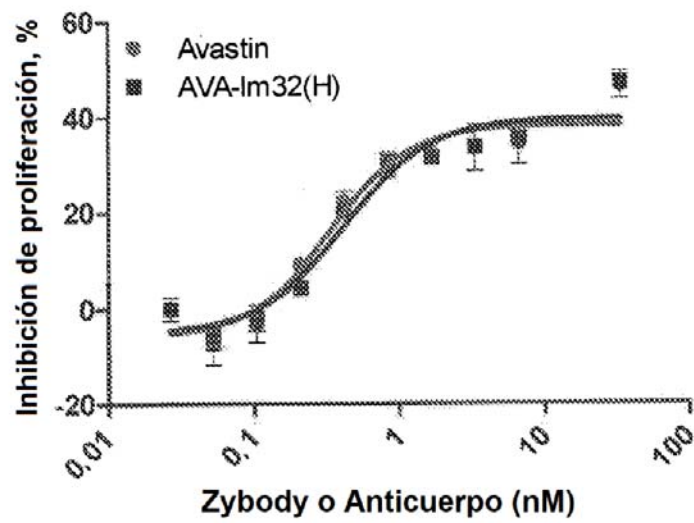


Fig. 26B

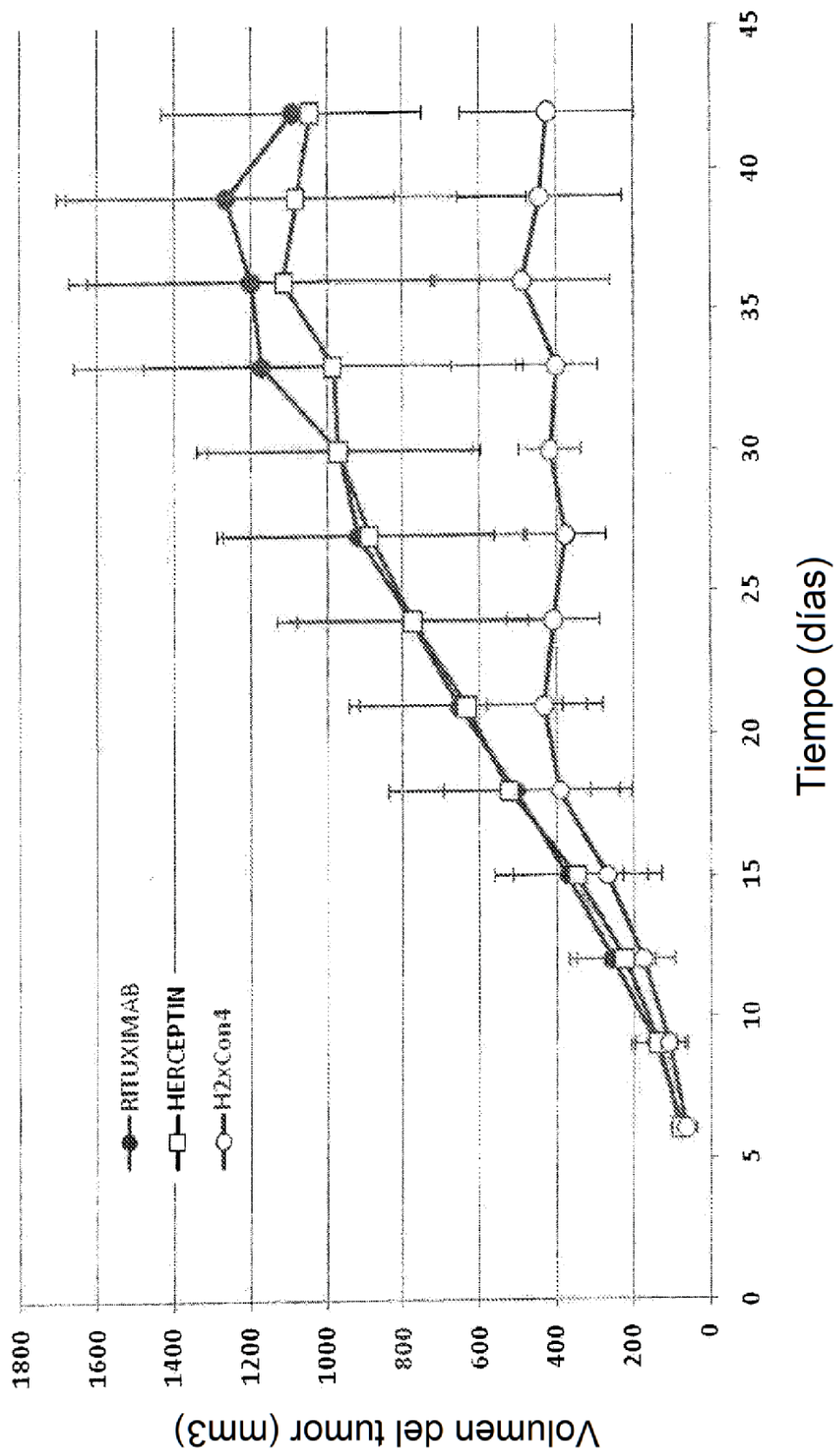


Figura 27

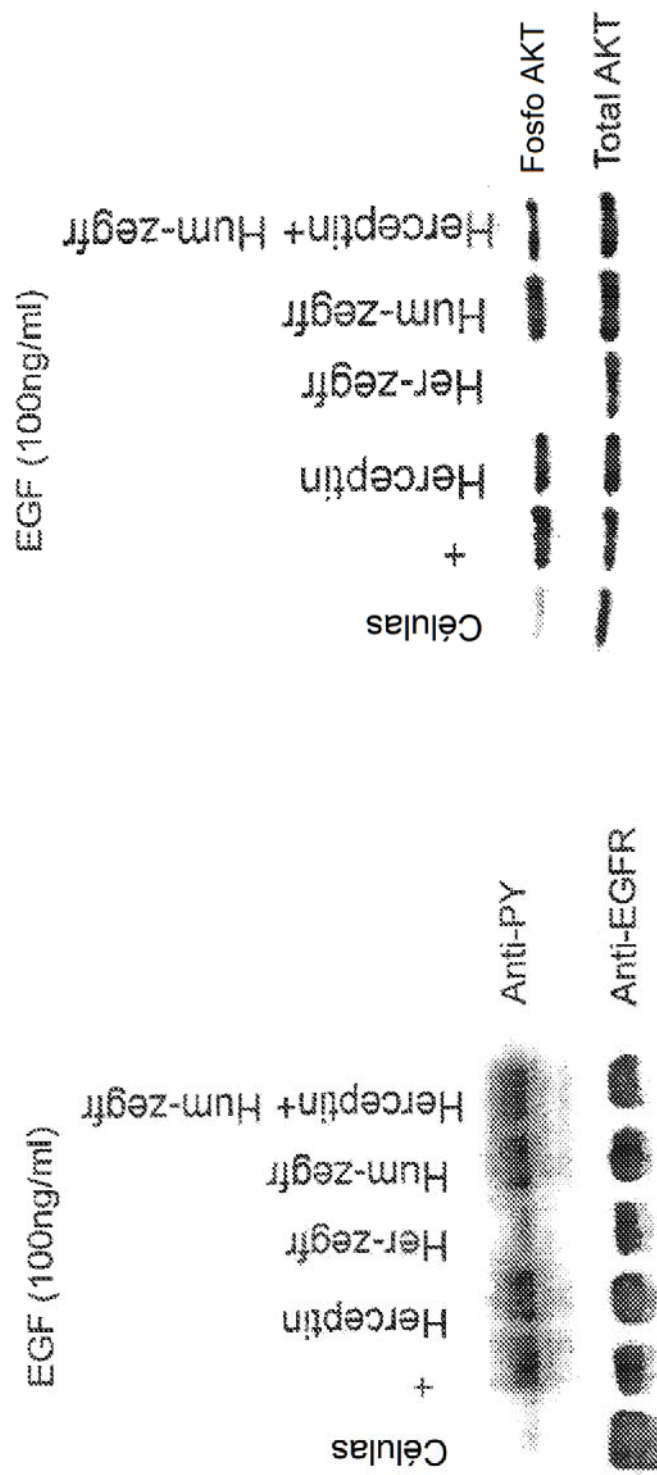


Figura 28

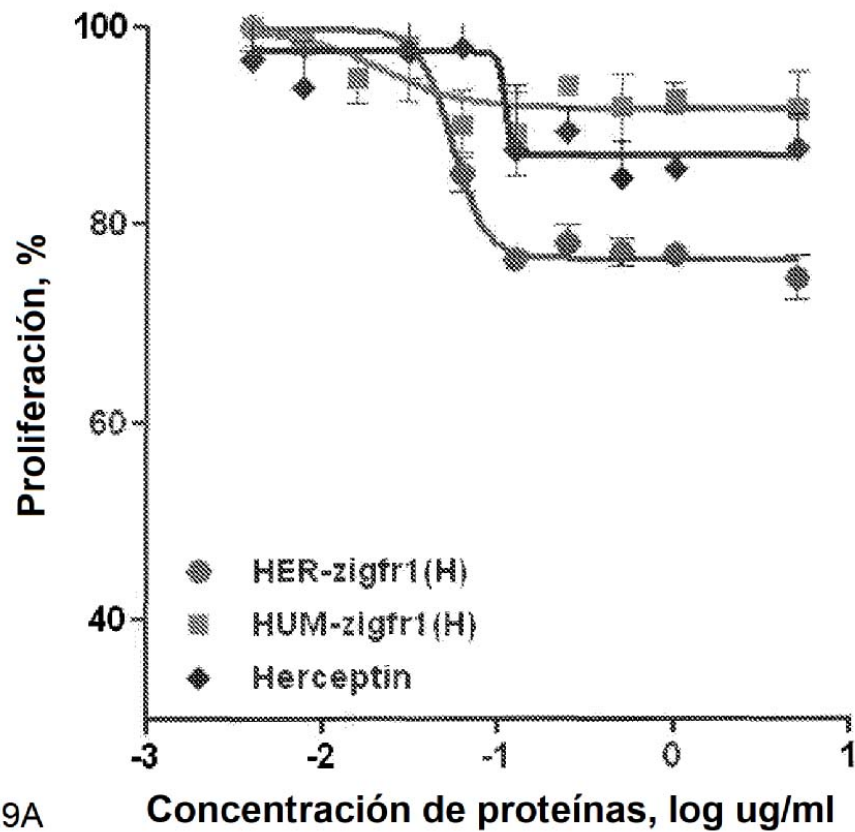


Figura 29A

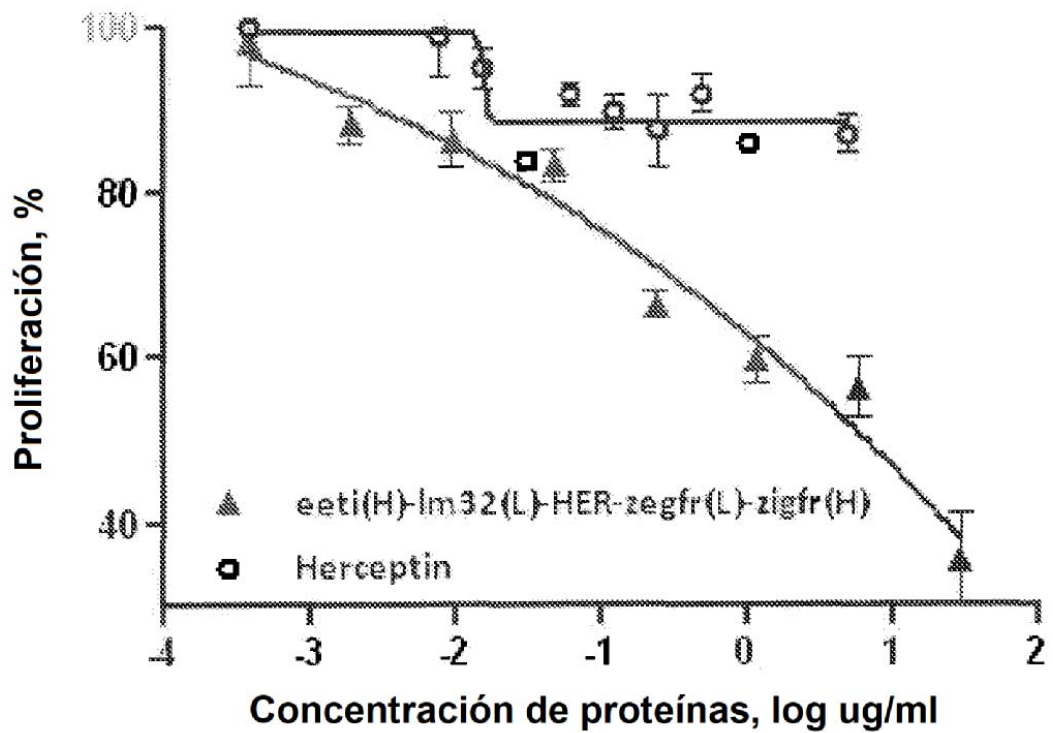


Figura 29B

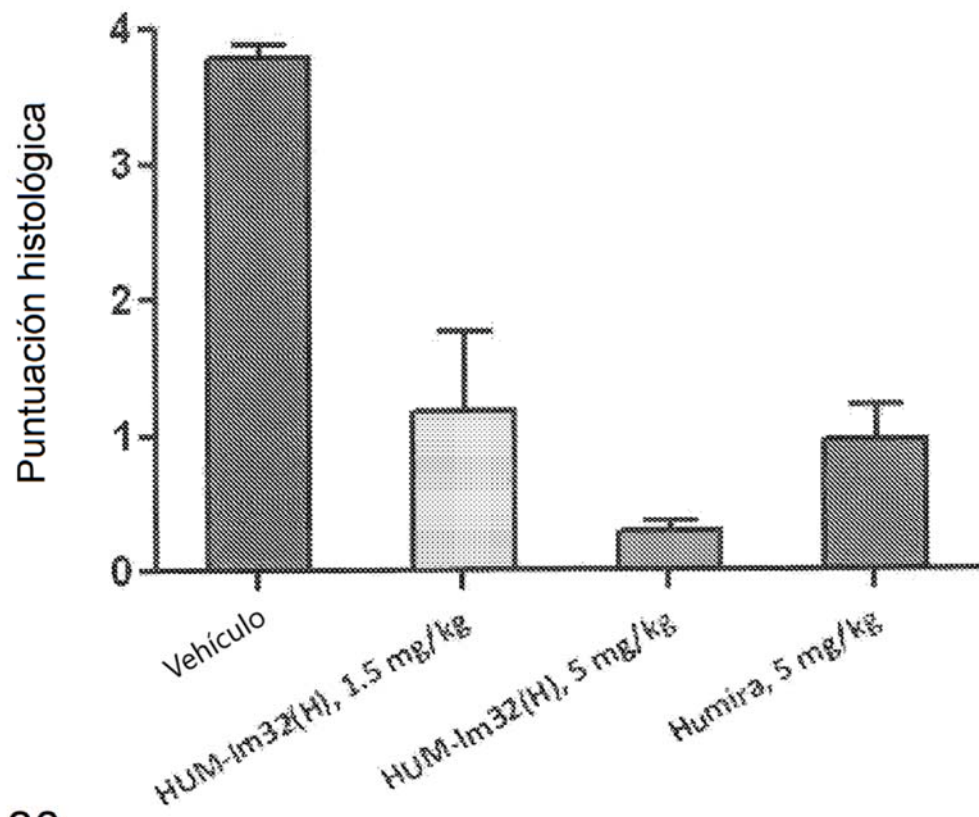
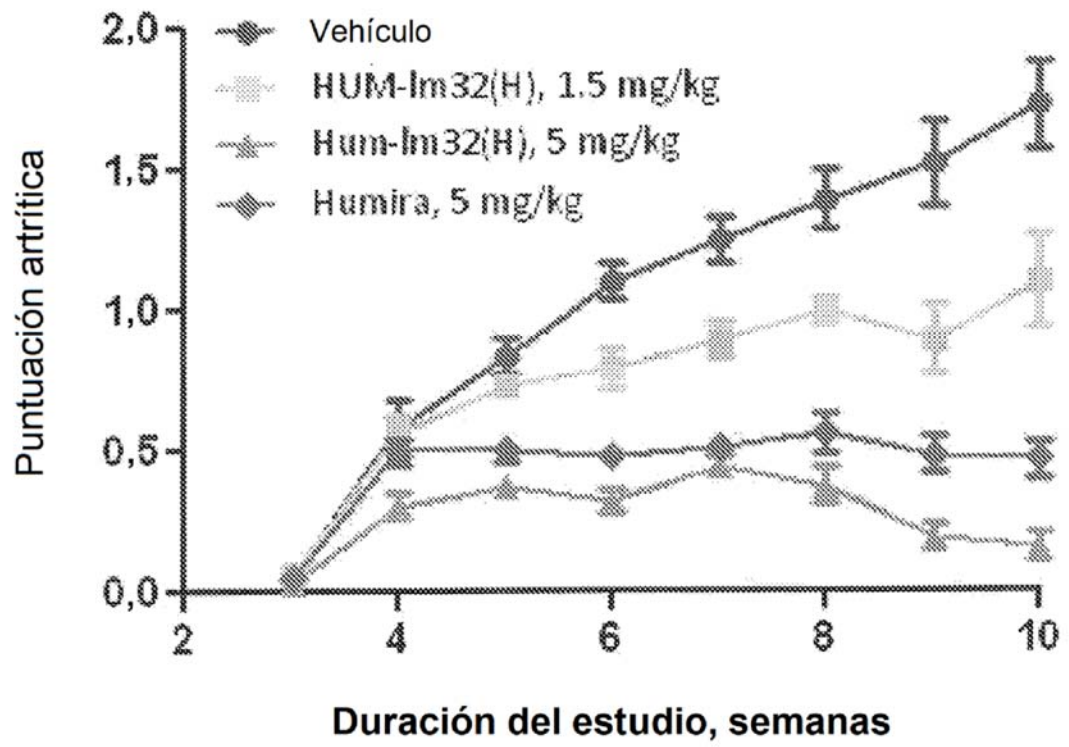


Figura 30

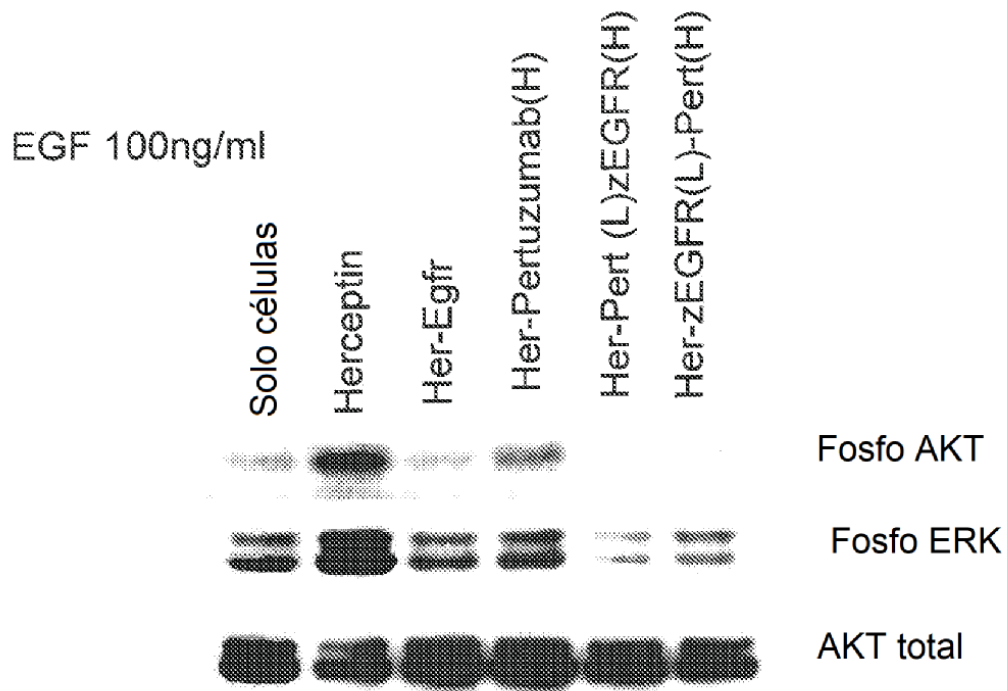


Figura 31

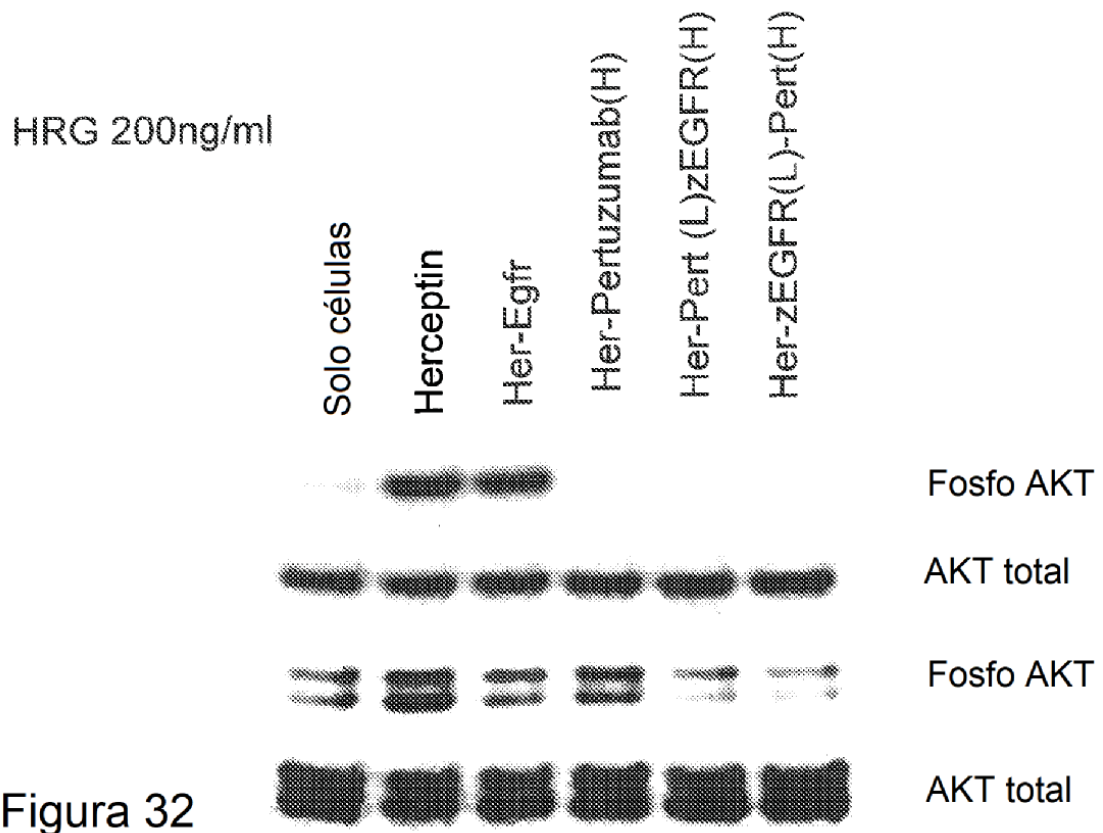
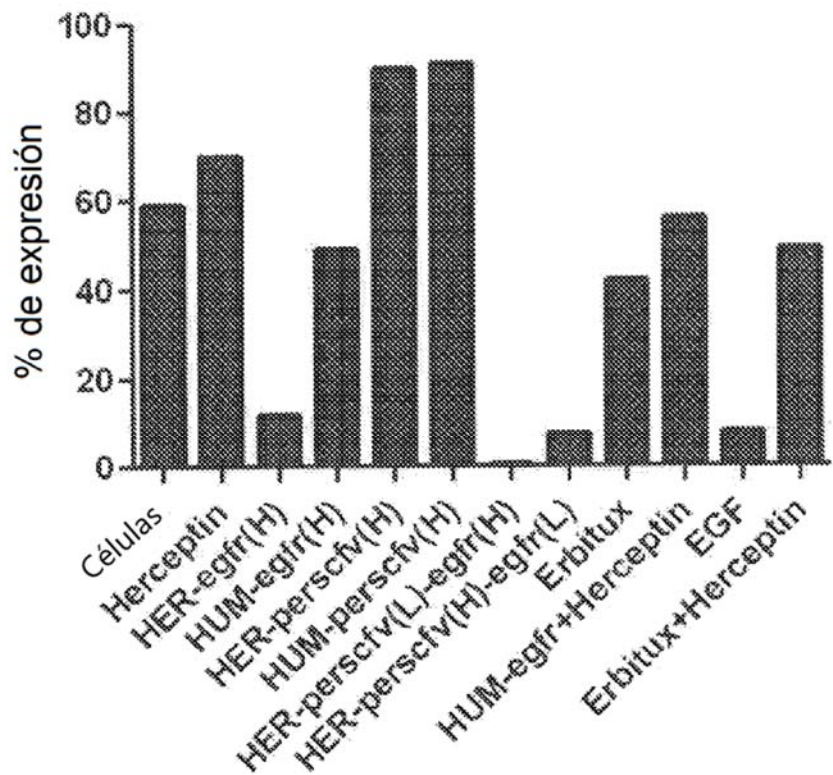
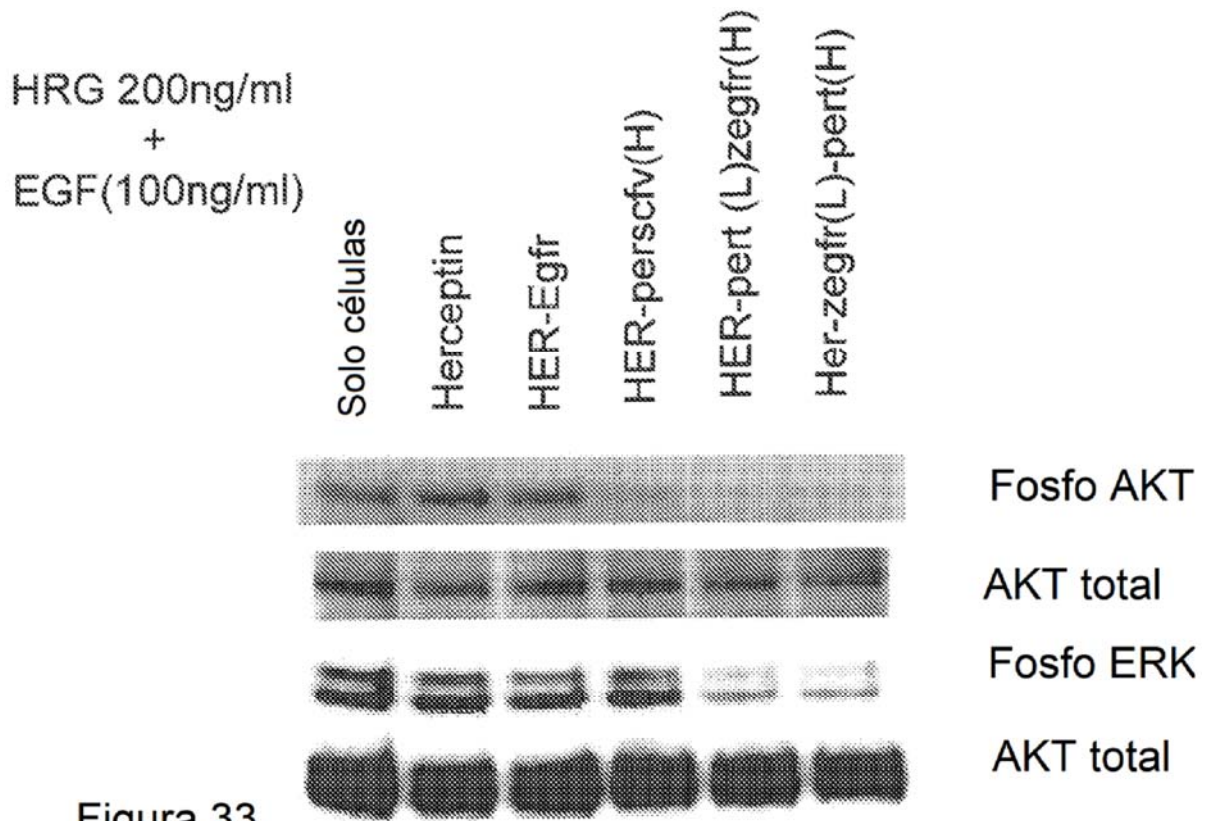


Figura 32



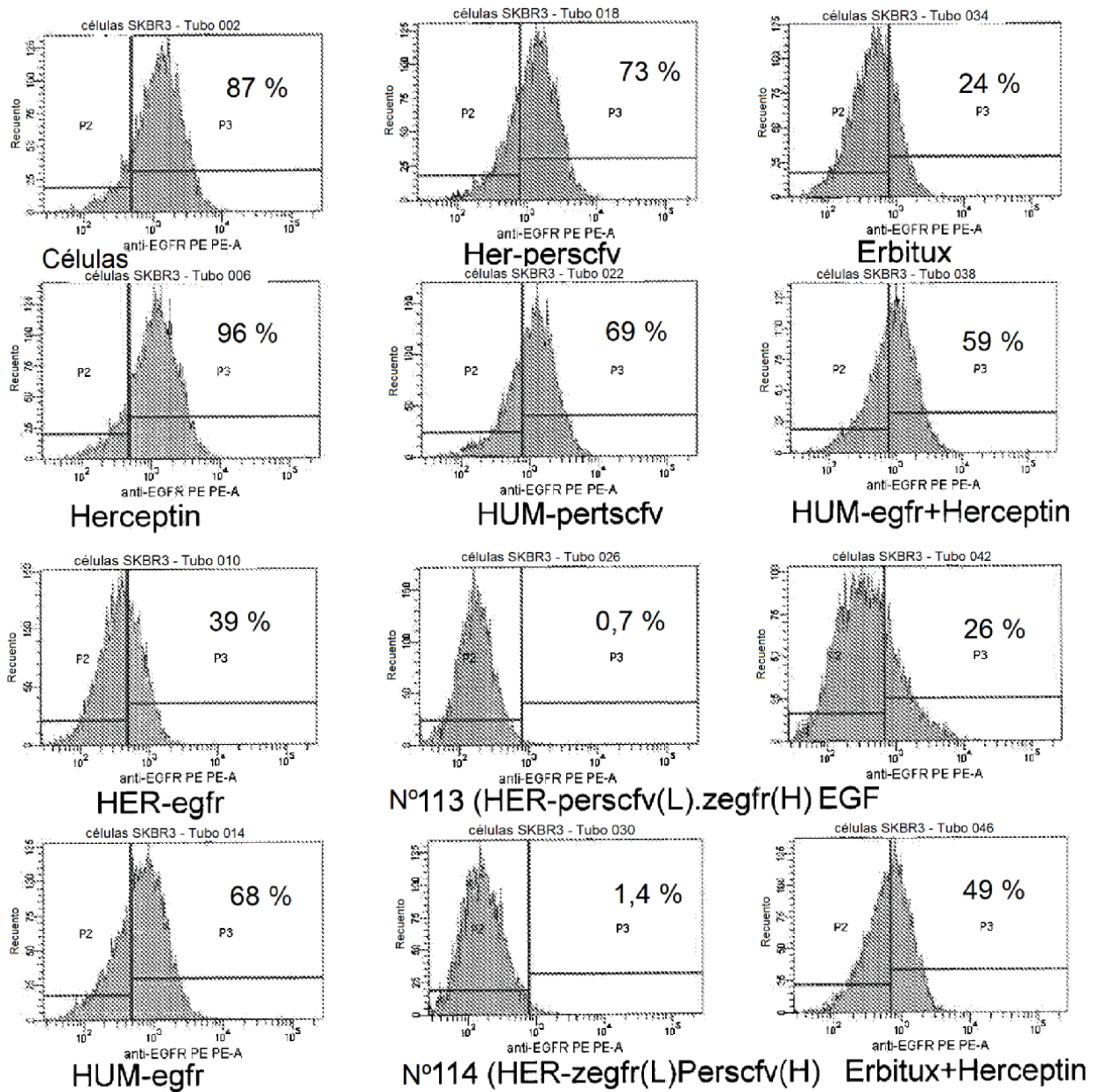


Figura 34B

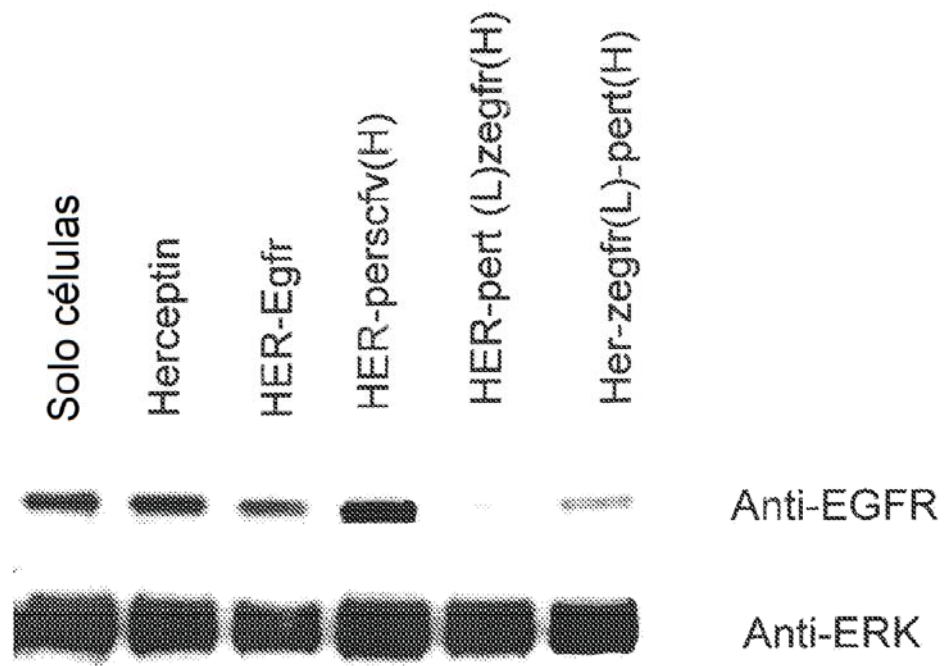


Figura 35