

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 124**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2010 PCT/US2010/032625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10129304**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2010 E 10772544 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2424567**

54 Título: **Procedimiento para preparar moléculas heteromultiméricas**

30 Prioridad:

12.05.2009 US 177412 P
27.04.2009 US 173129 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2019

73 Titular/es:

ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
800 Chesapeake Drive
Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

GURNEY, AUSTIN L. y
SATO, AARON KEN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 708 124 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

Procedimiento para preparar moléculas heteromultiméricas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

10 La presente invención proporciona procedimientos para preparar moléculas heteromultiméricas, tales como anticuerpos biespecíficos, y composiciones que comprenden dichas moléculas. Los procedimientos incluyen la introducción de sustituciones en aminoácidos que están en contacto en la interfaz entre dos polipéptidos. Dichas sustituciones incluyen cambios en los aminoácidos que resultan en interacciones electrostáticas y/o hidrófobas/hidrófilas alteradas entre los polipéptidos que forman las moléculas heteromultiméricas. Las sustituciones dan como resultado moléculas multiméricas en las que se desfavorecen las moléculas homomultiméricas, y se forman preferentemente moléculas heteromultiméricas.

Técnica Anterior

20 El sello distintivo de los anticuerpos monoclonales es su capacidad para unirse específicamente a un antígeno particular, lo que les permite unirse a su diana *in vivo* pero no a los sitios negativos para el antígeno. Una vez que se unen a una diana, los anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden administrar una carga útil tóxica, actuar como agonistas o antagonistas de receptores, o como neutralizadores de ligandos. Los anticuerpos monoclonales también pueden modificarse para tolerarse inmunológicamente en mayor medida en varias especies. Una de tales modificaciones, que conlleva la sustitución de aminoácidos en regiones estructurales con aminoácidos encontrados en humanos, es la humanización. Los anticuerpos humanizados pueden entonces modificarse aún más. Una de tales modificaciones es armar el anticuerpo humanizado con mecanismos citotóxicos adicionales, ya sean radioisótopos, toxinas bacterianas, citoquinas inflamatorias, quimioterapéuticos o profármacos.

30 Existe un número creciente de terapias para el cáncer aprobadas que son eficaces ya sea como un anticuerpo quimerizado (Rituximab) o IgG1 humanizada (Herceptin y Campath-1H), como conjugado con quimioterapéuticos (Mylotarg) o un radioisótopo (Zevalin y Bexxar). A pesar de este progreso, la eficacia de los anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer es aún limitada, lo que deja un gran potencial para nuevas mejoras. Una clase de derivados de anticuerpos con la promesa de una potencia mejorada para el tratamiento del cáncer son los anticuerpos biespecíficos.

35 Los anticuerpos con una especificidad dual en sus brazos de unión generalmente no ocurren en la naturaleza y, por lo tanto, se desarrollaron a través de la tecnología de ADN recombinante o fusión celular. La mayoría de los anticuerpos biespecíficos están diseñados para reclutar eficazmente células efectoras citotóxicas del sistema inmunitario contra células diana patógenas. Después de más de 15 años de investigación exhaustiva, se han desarrollado muchos tipos diferentes de anticuerpos biespecíficos, pero solo unos pocos han alcanzado los ensayos clínicos.

45 Entre los primeros anticuerpos biespecíficos se diseñaron construcciones para redirigir las células T contra las células diana del cáncer. Las células diana se destruyen cuando los linfocitos T citotóxicos (CTL) se unen a las células tumorales y se activan simultáneamente por un brazo del anticuerpo biespecífico que interactúa con el complejo receptor de células T (TCR)-CD3. Los CTL, que se consideran las células asesinas más potentes del sistema inmunológico, no pueden activarse por anticuerpos monoclonales porque carecen de receptores Fcγ.

50 Otro tipo de anticuerpo biespecífico es el que se une simultáneamente a las células tumorales y un receptor de Fcγ activador, por ejemplo, CD64/FcγRI en monocitos. La unión de este tipo de anticuerpo biespecífico a los receptores Fcγ puede provocar la activación de células efectoras, sin competirse por la unión simultánea de IgG normal.

55 Un procedimiento para generar anticuerpos biespecíficos se ha denominado la estrategia "botón en ojal" (ver, por ejemplo, WO 2006/028936, WO 98/50431, US 2002/062010). El emparejamiento incorrecto de las cadenas pesadas de Ig se reduce en esta tecnología mediante la mutación de aminoácidos seleccionados que forman la interfaz de los dominios CH3 en la IgG humana. En las posiciones dentro del dominio CH3 en las que las dos cadenas pesadas interactúan directamente, se introduce un aminoácido con una pequeña cadena lateral (ojal) en la secuencia de una cadena pesada y un aminoácido con una gran cadena lateral (botón) en la de la otra. Como resultado, se ha descrito que la interacción de proteínas entre botones y ojales conduce a la formación de hasta el 90% de la IgG humana biespecífica correcta por parte de las células huésped de mamíferos transfectadas. El documento WO 2007/147901 describe un procedimiento para producir anticuerpos biespecíficos en los que las combinaciones de mutación del dominio CH3 favorecen la formación de heterodímeros electrostáticos.

65 La presente invención proporciona procedimientos para formar preferentemente moléculas heteromultiméricas mediante la mutación de aminoácidos seleccionados que interactúan en la interfaz entre dos polipéptidos al reemplazar un residuo de aminoácido involucrado en interacciones hidrofílicas con un residuo de aminoácido más hidrofóbico y/o reemplazar un aminoácido involucrado en una interacción de carga con otro aminoácido. Las moléculas

heteromultiméricas son anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a VEGF y DLL4. Los documentos WO 2008/042236 y WO 2008/060705 divulgan anticuerpos anti-DLL4 y la terapia de combinación de estos anticuerpos con anticuerpos anti-VEGF.

5 **BREVE SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a VEGF y DLL4, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer y un segundo polipéptido de inmunoglobulina que contiene el dominio CH3, comprendiendo el procedimiento sustituir al menos un aminoácido dentro del dominio CH3 del primer polipéptido de inmunoglobulina y sustituyendo al menos un aminoácido dentro del dominio CH3 del segundo polipéptido de inmunoglobulina para promover la formación de un anticuerpo biespecífico, en el que el anticuerpo biespecífico se selecciona del grupo que consiste en:

15 (a) una IgG1 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 253 y 292 de la SEQ ID NO:32 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 240 y 282 de la SEQ ID NO:32 se reemplazan con lisina;

20 (b) una IgG2 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 249 y 288 de la SEQ ID NO:33 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 236 y 278 de SEQ ID NO:33 se reemplazan con lisina;

25 (c) una IgG3 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 300 y 339 de la SEQ ID NO:34 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 287 y 329 de SEQ ID NO:34 se reemplazan con lisina; y

30 (d) una IgG4 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 250 y 289 de la SEQ ID NO:35 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 237 y 279 de SEQ ID NO:35 se reemplazan con lisina,

35 en el que el primer polipéptido que contiene el dominio CH3 comprende un primer polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un primer polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina, y el segundo polipéptido que contiene el dominio CH3 comprende un segundo polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un segundo polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina; y

40 en el que el primer polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina y el segundo polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina son idénticos en secuencia de aminoácidos.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a VEGF y DLL4, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer y un segundo polipéptido de inmunoglobulina que contiene el dominio CH3, en el que el anticuerpo biespecífico se selecciona del grupo que consiste en:

45 (a) una IgG1 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 253 y 292 de la SEQ ID NO:32 se reemplazan con glutamato o aspartato, y

50 en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 240 y 282 de la SEQ ID NO:32 se reemplazan con lisina;

(b) una IgG2 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 249 y 288 de la SEQ ID NO:33 se reemplazan con glutamato o aspartato, y

55 en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 236 y 278 de la SEQ ID NO:33 se reemplazan con lisina;

60 (c) una IgG3 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 300 y 339 de la SEQ ID NO:34 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 287 y 329 de la SEQ ID NO:34 se reemplazan con lisina; y

(d) una IgG4 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 250 y 289 de la SEQ ID NO:35 se reemplazan con glutamato o aspartato, y

65 en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 237 y 279 de la SEQ ID NO:35 se reemplazan con lisina,

en el que el primer polipéptido que contiene el dominio CH3 comprende un primer polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un primer polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina, y el segundo polipéptido que contiene el dominio CH3 comprende un segundo polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un segundo polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina; y

5 en el que el primer polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina y el segundo polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina son idénticos en secuencia de aminoácidos.

10 La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer polipéptido de inmunoglobulina que contiene el dominio CH3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7, y un segundo polipéptido de inmunoglobulina que contiene el dominio CH3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9.

15 La invención también proporciona un polinucleótido que codifica los polipéptidos o anticuerpos mencionados anteriormente.

La invención también proporciona una célula huésped que comprende el polinucleótido mencionado anteriormente. La invención también proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped mencionada anteriormente en condiciones que dan como resultado la expresión del anticuerpo o polipéptido.

20 La invención también proporciona el uso de dichos anticuerpos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer y en el tratamiento del cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Figura 1: La estructura de los dominios CH2 y CH3 del anticuerpo. La estructura se muestra en vista de cinta usando el programa de software Pymol (DeLano Scientific: LLC, California, EE. UU.) de la estructura del dominio fc del anticuerpo depositada en el PDB (archivo 1FC1) (Deisenhofer.J. (1981) Biochemistry, 20, 2361-2370). Se muestran los dominios CH2 y CH3 de cada cadena en la estructura dimerica. La dimerización del fragmento Fc está mediada a través de las interacciones entre los dominios CH3.

30 Figura 2: La interfaz del dímero CH3. Se muestra una vista de estructura de cinta del dominio CH3. A la izquierda hay una imagen del dímero de dos dominios CH3. A la derecha hay una imagen de un solo dominio CH3 con representación de las cadenas laterales de aminoácidos con potencial para participar en interacciones entre cadenas.

35 Figura 3: Los aminoácidos seleccionados están involucrados en las interacciones entre cadenas. Se muestran tres vistas separadas del dominio CH3 dimerizado elegidas para ver mejor los residuos de aminoácidos particulares. La estructura se muestra en vista de cinta usando el programa de software Pymol (DeLano Scientific LLC, California, EE. UU.). Cada vista resalta los aminoácidos seleccionados que se postulan para contribuir al emparejamiento entre cadenas. Los aminoácidos individuales se destacan por la representación de las cadenas laterales y por la notación del aminoácido y la posición. El esquema de numeración es relativo a la región constante de IgG2 humana.

40 Figura 4: La alineación de los isotipos de IgG humana. Se muestra una alineación de la región constante de los isotipos de IgG humana IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El dominio CH3 está indicado por líneas. Los aminoácidos individuales que se destacaron en la Figura 2 y la Figura 3 y se postulan para desempeñar funciones en las interacciones entre cadenas se indican mediante círculos rellenos.

45 Figura 5: Un formato de ensayo para evaluar la homodimerización y la heterodimerización. Para determinar la propensión relativa de una variante de Fc a homodimerizar o heterodimerizar con otra variante de Fc, generamos una construcción de expresión de "mini-cuerpo" que codifica la región conectora y los dominios CH2-CH3 (aminoácidos 103-326 de la región constante de IgG2 humana) de IgG2 unida a una secuencia de señal N terminal y epítipo FLAG. Esta construcción, cuando se transfectan las células dirige la expresión de un dominio Fc dimerico secretado (aquí denominado "minicuerpo"). Como se reveló en el análisis de Western blot, el tamaño del minicuerpo es sustancialmente más pequeño que el tamaño de un anticuerpo intacto producido al transfectar células con vectores de expresión que codifican cadenas pesadas y ligeras. La formación de heterodímeros se puede evaluar mediante la transfección de una célula con vectores que codifican tanto el anticuerpo intacto como la construcción de dominio Fc del mini-cuerpo. La formación de heterodímeros dará como resultado una molécula de tamaño intermedio que contiene una cadena de minicuerpo y una cadena pesada de longitud completa complejada con una cadena ligera.

50 Figura 6: Variantes de anticuerpos que forman eficientemente dominios Fc heterodiméricos. Se generaron plásmidos de vectores de expresión que codifican minicuerpos marcados con FLAG con dominios CH2 y CH3 de IgG2 humana natural (WT), y variantes (Var1, también denominada 13B, y Var2), una cadena pesada de longitud completa con dominios CH2 y CH3 de IgG2 humana natural (WT), o una variante (Var3/13A), y una cadena ligera de longitud completa (L2). Var1 contiene la sustitución del aminoácido 249 Lys a Glu y la sustitución del aminoácido 288 Lys a Glu dentro del dominio CH3. El anticuerpo Var2 contiene sustituciones del aminoácido 249 Lys a Glu, del aminoácido 286 Tyr a Phe y del aminoácido 288 Lys a Glu dentro del dominio CH3. El anticuerpo Var3 (también denominado 13A) contiene sustituciones del aminoácido 236 Glu a Lys y del aminoácido 278 Asp a Lys. Las células HEK293 se

transfectaron transitoriamente con combinaciones de vectores de expresión como se indica. Se realizó un análisis Western blot no reductor con un anticuerpo anti-FLAG para revelar el tamaño de los productos de anticuerpos secretados. La IgG2 humana natural exhibe fácilmente homodimerización, como se muestra en el panel derecho donde se detecta fácilmente el "minicuerpo" marcado con Flag expresado que contiene el dominio CH2-CH3 humano natural. El anticuerpo Var1 (13B) ha reducido enormemente la capacidad de homodimerizarse. El anticuerpo Var2 exhibe poca o ninguna capacidad para homodimerizarse. En el panel central y en el panel izquierdo, las variantes de minicuerpo se coexpresan con las variantes de cadena pesada de longitud completa, y se producen formas de anticuerpos heterodímeros. La coexpresión de la cadena pesada de longitud completa y el minicuerpo natural da como resultado la producción de ambos homodímeros (como lo demuestra claramente el Western blot anti-FLAG en el panel central y las bandas de masa intermedias observadas en el Western blot anti-Fc en el panel derecho). Estos datos muestran que la coexpresión de Var1 (13B) y Var3 (13A) da como resultado una homodimerización preferencial, y que la coexpresión de Var2 y Var3 da como resultado una formación casi exclusiva de heterodímero.

Figura 7: La unión de un anticuerpo biespecífico se une a dos dianas. Se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para examinar la capacidad de la variante de anticuerpo biespecífico (Var2-Var3) para unirse a los antígenos. Las placas de ELISA se recubrieron ya sea sin antígeno (-), con anticuerpo anti-FLAG (0,05 mg/ml, clon M2 de SIGMA) o con DLL4 humana recombinante (0,1 mg/ml) (aminoácidos 27-519 con marca carboxi-terminal 8xHis). Las placas recubiertas se incubaron luego con medio de cultivo celular de control (control negativo) o medio condicionado de células transfectadas con vectores de expresión que codifican Var2, Var3 y la cadena ligera L2 como se indica. Los resultados muestran que la variante de anticuerpo biespecífico producida por la coexpresión de las cadenas pesadas Var2 y Var3 y la cadena ligera L2 es capaz de unirse a DLL4, el anticuerpo reconocido por el anticuerpo natural original usado para generar Var3, y también de unirse al anticuerpo anti-FLAG debido a la marca del epítipo FLAG presentada por el brazo de la variante de cadena pesada Var2.

Figura 8: El Fab Anti-VEGF (219R0302) bloquea parcialmente la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF. Las células HUVEC del día 7 se seleccionaron para la inhibición de la proliferación contra el fragmento Fab 219R0302 del anti-VEGF. Se utilizó M199- + 2% FBS como medio de inaniación y el volumen se normalizó a la concentración más baja de la muestra de prueba. Se analizó el Fab 219R0302 contra varios anticuerpos de prueba, bevacizumab (Avastin) y VEGF humano recombinante como control.

Figura 9: El Fab Anti-VEGF (219R0302) bloquea la unión del Fc VEGFR2 a superficie biacore de hVEGF. Se generó una superficie VEGF utilizando química estándar NHS/EDC en un chip CM5. El Fab 219R0302 o un Fab de control no ligador se hicieron fluir sobre la superficie y luego inmediatamente después se inyectó VEGFR2. Como se muestra, VEGFR2 se unió bien a VEGF en el experimento del Fab de control y se bloqueó en el experimento del Fab 219R0302.

Figura 10: Las IgG anti-VEGF (219R0302 y 219R0202) bloquean la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF en un grado similar al bevacizumab (Avastin). Las IgG 219R0302 y 219R0202 se reformatearon a IgG2, se expresaron y se purificaron para pruebas *in vitro* confirmatorias.

Figura 11: Los anticuerpos anti-VEGF 219R0302 y 219R0202 inhiben el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de tumor de mama PE13. Se inyectaron 300,000 células PE13 viables por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones. El 219R0302 indujo un retraso en el crecimiento del tumor más fuerte que el 219R0202. Avastin mostró el retraso de crecimiento más potente, que era indistinguible del 219R0302, lo que indica que 219R0302 y Avastin tienen una potencia casi equivalente en este modelo. A diferencia de 219R0302, 219R0202 fue estadísticamente diferente tanto de Avastin como de 219R0302.

Figura 12: Formatos de anticuerpos biespecíficos. A) Anticuerpo biespecífico de un solo gen (SGBSP). En este formato, cada cadena ligera está atada a su cadena pesada respectiva a través de un conector de 30 aminoácidos (6XGGGGG); B) Anticuerpo biespecífico monovalente (MBSP). En este formato, se usa una cadena ligera común, que puede derivarse de cualquiera de los anticuerpos originales. Una o ambas de las cadenas pesadas deben poder unirse a su diana en combinación con una cadena ligera común.

Figura 13: SGBSP y MBSP son más del 90% de heterodímeros y el homodímero puede eliminarse variando la relación Var3/Nar1. A) SGBSP (219R0202_21M18) y MBSP (219R0202 de cadena pesada (13A/Var3), 21M18 de cadena pesada (13B/Var1), 21M18 de cadena ligera) purificados con proteína A son >90% puros y contienen una pequeña fracción del homodímero Var1 (SBBSP): Homodímero SGBSP 21M18 (13B/Var1); MBSP: 21M18 de cadena pesada (13B/Var1) con 21M18 de cadena ligera). Carril 1: Estándar, Carril 2: 21M18, Carril 3: MBSP, Carril 4: En blanco, Carril 5: SGBSP. Heterodímero MBSP pl ~ 7,1; homodímero MBSP 13A pl ~ 8,3; homodímero MBSP 13B pl ~ 6,2; heterodímero SGBSP pl ~ 7,8; homodímero SGBSP 13A pl ~ 8,6; homodímero SGBSP 13B pl ~ 6,4. B) La fracción del homodímero MBSP 13B/Var1 se puede minimizar usando al menos un exceso molar de 2:1 veces de la cadena pesada 219R0202 (13A/Var3) a la cadena pesada 21M18 (13B/Var1). 13A:13B Relación de HC: carril 1, 1:8; carril 2, 1:6; carril 3, 1:4; carril 4, 1:2; carril 5, 1:1; carril 6, 2:1; carril 7, 4:1; carril 8, 6:1; carril 9, 8:1; carril 10, escalera.

Figura 14: Los SGBSP bloquean parcialmente la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF. Tanto el SGSPS 219R0302_21M18 como el 219R0202_21M18 inhibieron parcialmente la proliferación de HUVEC inducida por VEGF, y este último mostró una actividad significativamente mejor que el primero.

Figura 15: Los anticuerpos biespecíficos se unen bien a las células transfectadas con hDLL4. LZ1, control de anticuerpos no específicos; SGBSP, 219R020221M18 anticuerpo biespecífico de gen único; MBSP, 219R0202_21M18 anticuerpo biespecífico monovalente con 21M18 LC común; Homo 13A, 219R0202 HC (con mutación 13A) expresado solo con 21M18 LC; Homo 13B, 21M18 HC (con mutación 13B) expresado solo con 21M18 LC. Las curvas de unión se ajustaron a una transformada no lineal para obtener un valor de EC50, que se indica entre paréntesis (NF, indica que no hay ajuste).

Figura 16: Tanto los SGBSP como MBSP se unen tanto a VEGF como DLL4 de manera biespecífica. Usando el ensayo de direccionamiento dual, tanto el 219R0302_21M18 como el 219R0202_21M18, tanto los SGBSP (panel A) como el MBSP (panel B) se muestran uniéndose tanto a VEGF como a DLL4.

Figura 17: SGBSP muestra inhibición parcial en el ensayo de proliferación inducida por VEGF. SGBSP mostró una inhibición parcial de la proliferación inducida por VEGF en comparación con los controles de bevacizumab (Avastin) y rhVEGF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan procedimientos, composiciones y kits para generar polipéptidos heteromultiméricos, tales como anticuerpos biespecíficos. La invención permite la generación de moléculas heteromultiméricas que tienen altos rendimientos. Los detalles de los procedimientos, composiciones y kits se proporcionan en el presente documento. Por "modo de realización" se pretende una característica que no necesariamente debe tomarse por sí sola para interpretar la invención.

Un "heteromultímero", "complejo heteromultimérico", "polipéptido heteromultimérico", o "molécula heteromultimérica" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una molécula que comprende al menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en la que el segundo polipéptido se diferencia en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido en al menos un residuo de aminoácido. El heteromultímero puede comprender un "heterodímero" formado por el primer y segundo polipéptidos o puede formar estructuras terciarias de orden superior en las que están presentes más polipéptidos además del primer y segundo polipéptidos.

Excepto cuando se indique lo contrario por el contexto, los términos "primer" polipéptido y "segundo" polipéptido, y sus variaciones, son simplemente identificadores genéricos, y no deben tomarse como identificación de un polipéptido o componente específico o particular de heteromultímeros de la invención.

Los términos "polipéptido", "péptido", "proteína" y "fragmento de proteína" se usan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, por ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido natural. Los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico (o aspartato) y ácido glutámico (o glutamato). Los aminoácidos cargados positivamente incluyen arginina, histidina y lisina.

Como se usa en este documento, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que exhiban la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos como se describe en el presente documento. El término "anticuerpo biespecífico" pretende incluir cualquier anticuerpo que tenga dos especificidades de unión diferentes, es decir, el anticuerpo se une a dos epítopos diferentes, que pueden ubicarse en el mismo antígeno diana o, más comúnmente, en antígenos diana diferentes.

Los anticuerpos nativos y las inmunoglobulinas son generalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en

un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Clothia et al., J. Mol. Biol. 186, 651-66, 1985); Novotny and Haber, Proc. Natl Acad Sci. USA 82, 4592-4596 (1985)). Cinco clases de inmunoglobulina humana se definen en base a su composición de cadena pesada, y se denominan IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Los anticuerpos de la clase IgG y clase IgA se dividen además en subclases, a saber, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e IgA1 e IgA2. Las cadenas pesadas en los anticuerpos IgG, IgA e IgD tienen tres dominios de región constante, que se designan CH1, CH2 y CH3, y las cadenas pesadas en los anticuerpos IgM e IgE tienen cuatro dominios de región constante, CH1, CH2, CH3 y CH4. Por lo tanto, las cadenas pesadas tienen una región variable y tres o cuatro regiones constantes. La estructura y la función de la inmunoglobulina se revisan, por ejemplo, en Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988).

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, en los que la porción retiene preferiblemente al menos una, preferiblemente la mayor parte o la totalidad, de las funciones normalmente asociadas con esa porción cuando están presentes en un anticuerpo intacto.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se unen a un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Que un anticuerpo se "une selectivamente" o "se une específicamente" significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de lo anterior con un epítipo que con sustancias alternativas, incluidas las proteínas no relacionadas. "Se une selectivamente" o "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con un valor de K_D de al menos aproximadamente 0,1 mM, pero más generalmente de al menos aproximadamente 1 μ M. "Se une selectivamente" o "se une específicamente" significa en ocasiones que un anticuerpo se une a una proteína a veces con un valor de K_D de al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y otras veces de al menos aproximadamente 0,01 μ M o mejor. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconozca una proteína marcadora de células tumorales en más de una especie.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se usan indistintamente en este documento y se refiere a la porción de un antígeno capaz de ser reconocido y específicamente unido por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítomos pueden formarse a partir tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente con la desnaturalización de proteínas, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente con la desnaturalización de proteínas. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Los anticuerpos en este documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la (s) cadena (s) son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de EE . UU. No. 4.816.567 y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primate no humano que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct Biol. 2:593-596 (1992). Véase también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem.

Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo de "afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más de sus CDR que dan como resultado una mejoría en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee esas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992), describe la maduración de la afinidad por el barajado de los dominios VH y VL. Se describe la mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos estructurales por: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91 :3809- 3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

El término "región Fc", como se usa en este documento, generalmente se refiere a un complejo de dímero que comprende las secuencias polipeptídicas C-terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que una secuencia polipeptídica C-terminal es aquella que se puede obtener mediante digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede comprender secuencias Fc nativas o variantes. Aunque los límites de la secuencia Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la secuencia Fc de la cadena pesada de la IgG humana generalmente se extienden desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226 aproximadamente, o desde la posición Pro230 aproximadamente, hasta el extremo carboxilo de la secuencia Fc. La secuencia Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. Por "polipéptido Fc" en el presente documento se entiende uno de los polipéptidos que forman una región Fc. Se puede obtener un polipéptido Fc a partir de cualquier inmunoglobulina adecuada, como los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM. En algunos modos de realización, un polipéptido Fc comprende parte o la totalidad de una secuencia bisagra natural (generalmente en su extremo N). En algunos modos de realización, un polipéptido Fc no comprende una secuencia bisagra funcional o natural.

La "región bisagra", "secuencia bisagra" y sus variaciones, como se usa en este documento, incluyen el significado conocido en la técnica, que se ilustra, por ejemplo, en Janeway et al., Immuno Biology: the immune system in health and disease, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999); Bloom et al., Protein Science (1997), 6:407-415; Humphreys et al., J. Immunol. Methods (1997), 209:193-202.

Tal como se usa en el presente documento, el término "híbrida en condiciones rigurosas" pretende describir las condiciones para la hibridación y el lavado en las que las secuencias de nucleótidos homólogas entre sí en al menos 60% permanecen típicamente hibridadas entre sí. En algunos modos de realización, las condiciones son tales que las secuencias homólogas entre sí en al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85% o el 90% típicamente permanecen hibridadas entre sí. Tales condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en 0,2xSSC, 0,1% SDS a 50-65 °C.

El término "citotóxica" o "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, en ²¹¹, I ¹³¹, I ¹²⁵, Y ⁹⁰, Re ¹⁸⁶, Re ¹⁸⁸, Sm ¹⁵³, Bi ²¹², P ³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y sus fragmentos, como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos los fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida provoca la destrucción de las células tumorales.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado o susceptible de aprobación por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, incluidos los seres humanos.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra al menos un anticuerpo de la presente divulgación.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, entre otros, humanos, primates no humanos, roedores y similares, que será el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en

referencia a un sujeto humano.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, molécula orgánica pequeña u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir o detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluida, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejidos blandos y huesos; inhibir y detener la metástasis tumoral; inhibir y detener el crecimiento del tumor; aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer, reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de tales efectos. En la medida en que el fármaco impida el crecimiento y/o elimine las células cancerosas existentes, se puede denominar citostático y/o citotóxico.

Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refieren a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótidos (ribonucleótido o desoxirribonucleótido o variantes estructurales relacionadas) unidas mediante enlaces fosfodiéster, incluidos, entre otros, ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN. Incluyendo, pero no limitado a, 4 acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil 2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxioxacilo, 5-metoxioxacacilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2 tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido 5-oxiacético de N-uracilo, ácido 5-oxiacético de uracilo, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector del fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada.

Los polipéptidos heteromultiméricos se pueden usar para tratar una variedad de trastornos. Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen trastornos de proliferación celular; no leucemias y neoplasias linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocitos, hipotalámicos y otros de tipo glandular, macrófago, epitelial, estromal y blastocélico; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros relacionados con la angiogénesis. Los términos "trastorno de proliferación celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En un modo de realización, el trastorno de proliferación celular es el cáncer. "Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

En general, se usan antígenos específicos como dianas para los polipéptidos heteromultiméricos. En un modo de realización, el antígeno es un antígeno tumoral. Un "antígeno tumoral", como se usa en este documento, incluye cualquier molécula que se expresa diferencialmente en una célula tumoral en comparación con una célula normal. En algunos modos de realización, la molécula se expresa a un nivel detectable o significativamente más alto o más bajo en una célula tumoral en comparación con una célula normal. En algunos modos de realización, la molécula exhibe un nivel de actividad biológica detectable o significativamente más alto o más bajo en una célula tumoral en comparación con una célula normal. En algunos modos de realización, se sabe o se piensa que la molécula contribuye a una característica tumorigénica de la célula tumoral. Numerosos antígenos tumorales son conocidos en la técnica. También se puede determinar si una molécula es un antígeno tumoral de acuerdo con técnicas y ensayos bien conocidos por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, los ensayos clonogénicos, los ensayos de transformación, los ensayos de formación de tumores in vitro o in vivo, los ensayos de migración en gel y el análisis de bloqueo genes, etc.

Los términos "cáncer" o "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento/proliferación celular no regulada. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros,

carcinoma, linfoma (p. Ej., Linfoma no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma pulmonar no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón escamoso, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula que se está tratando, y se puede realizar ya sea para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, los anticuerpos se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que sea eficaz, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

En un aspecto, se proporcionan polipéptidos heteromultiméricos que contienen sustituciones dentro de su dominio CH3 de inmunoglobulina Fc, en los que las sustituciones promueven la heterodimerización. Estas sustituciones comprenden la sustitución de al menos un aminoácido en uno de los polipéptidos que contienen el dominio CH3. En un modo de realización, el aminoácido que se sustituye es un aminoácido cargado, o un aminoácido hidrófobo/hidrófilo.

En ciertos modos de realización, las sustituciones dentro del primer o segundo polipéptidos ocurren dentro de al menos un aminoácido en el que la cadena lateral se proyecta desde o está posicionada de otra manera en la interfaz de un primer polipéptido con el segundo polipéptido y, por lo tanto, está posicionada para interactuar con un aminoácido del segundo polipéptido que también se coloca en la interfaz de los dos polipéptidos. Por "interfaz" se entiende el lugar en el que los polipéptidos independientes entran en contacto entre sí. En la Tabla 1 se muestran ejemplos pronosticados de aminoácidos ubicados en la interfaz de dos polipéptidos que contienen el dominio CH3. En un modo de realización, el cambio de la cadena lateral de aminoácidos de modo que se altera la interacción electrostática entre el primer y segundo polipéptidos, sirve para estabilizar el heteromultímero y, con ello favorecer la formación de heteromultímeros frente a la formación de homomultímeros. Las moléculas de homomultímeros contendrán moléculas cargadas similares y naturalmente se repelerán entre sí. Las moléculas de heteromultímeros contienen pares de aminoácidos que tienen cadenas laterales que se atraerán, favoreciendo así la formación de heteromultímeros.

En un aspecto, se demuestra que la sustitución de uno o más de los aminoácidos ubicados en las posiciones 236, 245, 249, 278, 286 y 288, en uno de los polipéptidos que contienen el dominio CH3, conduce a una formación de heteromultímero preferencial, relativa a la cantidad de homodímero formado. Las posiciones de aminoácidos enumeradas anteriormente son posiciones ubicadas dentro del dominio CH3 de IgG2 cuando los aminoácidos están numerados comenzando con el inicio del dominio constante de cadena pesada de IgG2 humana (es decir, el extremo N-terminal de la secuencia CH1). La posición del aminoácido es variable dentro de los cuatro isotipos de IgG, así como entre IgG, IgA e IgD. Por lo tanto, las posiciones específicas de los aminoácidos no pretenden ser limitantes para el aminoácido ubicado en esa posición específica en una inmunoglobulina cualquiera, sino que más bien pretenden abarcar los residuos de aminoácidos en todos los isotipos de inmunoglobulina en las posiciones correspondientes a las mencionadas para el dominio CH3 de la IgG2 humana. Dicha variabilidad del posicionamiento de aminoácidos dentro de los cuatro isotipos de IgG se muestra en la Tabla 1, y se muestra gráficamente en las Figuras 2-4.

La formación preferencial de polipéptidos heteromultiméricos se logra seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de la carga y/o la hidrofobicidad del polipéptido en el sitio diana. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A.L. Lehninger, en Biochemistry, segunda edición, pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polar sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácido: Asp (D), Glu (E)

(4) básico: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, los residuos naturales se pueden dividir en grupos según las propiedades comunes de la cadena

lateral:

(1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

5 (2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácido: Asp, Glu;

(4) básico: His, Lys, Arg;

10

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

15 En algunos modos de realización, los aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas se reemplazan con aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas, o viceversa. Por ejemplo, los aminoácidos básicos lisina, arginina o histidina se reemplazan con ácido aspártico o ácido glutámico.

20 En algunos modos de realización, un aminoácido hidrófilo (o al menos un aminoácido relativamente hidrófilo) se sustituye con un aminoácido hidrofóbico. Un ejemplo de este tipo de sustitución es el reemplazo de un residuo de tirosina con una fenilalanina. En ciertos modos de realización, el reemplazo da como resultado la eliminación de una cadena lateral hidroxilo en una posición de aminoácido específica en o cerca de la interfaz entre los polipéptidos que contienen el dominio CH3 y aumenta la hidrofobicidad en ese sitio.

25 Como se usa en este documento, "Var3" y "13A" se usan indistintamente para describir una variante que contiene una sustitución de lisina por glutamato en la posición 236 y una lisina por aspartato en la posición 278. También como se usa en el presente documento, "Var1" y "13B" se usan indistintamente para describir una variante que contiene una sustitución de glutamato por lisina en la posición 249 y un glutamato por lisina en la posición 288.

30 En un modo de realización, el ácido nucleico que codifica un aminoácido localizado en la interfaz se altera para que el primer polipéptido cambie la carga del emparejamiento de los iones de aminoácidos. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "original" en la interfaz del primer polipéptido se reemplaza con un ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral cargada opuestamente con respecto al residuo de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y sustituido correspondiente. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplazan es el número total de residuos en la interfaz del primer y segundo polipéptido.

35 Por "ácido nucleico original" se entiende el ácido nucleico que codifica un primer o segundo polipéptido que se puede "alterar" (es decir, modificarse genéticamente). El ácido nucleico original o de partida puede ser un ácido nucleico natural o puede comprender un ácido nucleico que se haya sometido a una alteración previa (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo humanizado). Por "alterar" el ácido nucleico se entiende que el ácido nucleico original se modifica reemplazando al menos un codón que codifica un residuo de aminoácido de interés. Las técnicas para modificar genéticamente un ADN de esta manera se han revisado en Mutagenesis: a Practical Approach, M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, Reino Unido. (1991)), e incluyen mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis en casete y mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo. Al modificar un ácido nucleico original, un polipéptido original codificado por el ácido nucleico original se altera así de manera correspondiente.

40 El polipéptido heteromultimérico de la invención es un anticuerpo biespecífico. En ciertos modos de realización, el anticuerpo biespecífico contiene el primer polipéptido que es un polipéptido de cadena pesada emparejado con un polipéptido de cadena ligera, y el segundo polipéptido que es un segundo polipéptido de cadena pesada emparejado con un segundo polipéptido de cadena ligera.

45 Se contemplan polipéptidos heteromultiméricos con más de dos valencias. Por ejemplo, los anticuerpos triespecíficos también pueden prepararse usando los procedimientos descritos en el presente documento. (Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991)).

50 En un modo de realización, el procedimiento comprende producir una molécula heteromultimérica, tal como un anticuerpo biespecífico, que utiliza una única cadena ligera que puede emparejarse con los dos dominios variables de la cadena pesada presentes en la molécula biespecífica. Para identificar esta cadena ligera, se pueden emplear varias estrategias. En un modo de realización, se identifica una serie de anticuerpos monoclonales a cada antígeno que puede ser atacado con el anticuerpo biespecífico, seguido de una determinación de cuál de las cadenas ligeras utilizadas en estos anticuerpos es capaz de funcionar cuando se combina con la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos identificados para la segunda diana. De esta manera, se puede identificar una cadena ligera que puede funcionar con dos cadenas pesadas para permitir la unión a ambos antígenos. En otro modo de realización, las técnicas de visualización, tales como la visualización de fagos, pueden permitir la identificación de una cadena ligera que puede funcionar con dos o más cadenas pesadas. En un modo de realización, se construye una biblioteca de

65

fagos que consta de un repertorio diverso de dominios variables de cadena pesada y un único dominio variable de cadena ligera. Esta biblioteca también puede utilizarse para identificar anticuerpos que se unen a varios antígenos de interés. Por lo tanto, en ciertos modos de realización, los anticuerpos identificados compartirán una cadena ligera común.

5 En ciertos modos de realización, los polipéptidos heteromultiméricos comprenden al menos un Fv de cadena única (scFv). En ciertos modos de realización, el polipéptido heteromultimérico comprende dos scFv. Por ejemplo, un scFv puede fusionarse con uno o ambos de un polipéptido que contiene el dominio CH3 contenido dentro de un polipéptido heteromultimérico. Algunos procedimientos comprenden producir una molécula biespecífica en los que una o ambas regiones constantes de la cadena pesada que comprenden al menos un dominio CH3 se utilizan junto con un dominio Fv de cadena única para proporcionar la unión al antígeno.

10 Las moléculas heteromultiméricas pueden comprender dos brazos de unión a antígeno de diferente especificidad. Por ejemplo, pueden generarse moléculas heteromultiméricas que comprenden un primer polipéptido que es un brazo de unión a antígeno (tal como una molécula de inmunoglobulina clásica) y un segundo polipéptido que es una proteína de fusión de inmunoglobulina. Un ejemplo de proteínas de fusión de inmunoglobulina útiles son las inmunoadesinas.

15 Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan el "dominio de unión" de una proteína heteróloga (una "adesina", por ejemplo, un receptor, ligando o enzima) con el componente efector de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de la adhesina con la especificidad de unión deseada, es decir, que no es el sitio de reconocimiento y unión de antígeno (sitio de combinación de antígeno) de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tales como los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM.

20 Se pueden generar polipéptidos heteromultiméricos para unirse a cualquier antígeno o antígenos. En algunos modos de realización, los polipéptidos heteromultiméricos se unen a uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en: DLL4, VEGF, VEGFR2, Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Notch(pan), JAG1, JAG2, DLL(pan), JAG(pan), EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB(pan), c-Met, IGF-1R, PDGFR, Patched, polipéptidos de la familia Hedgehog, Hedgehog(pan), polipéptidos de la familia WNT, WNT(pan), FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, FZD(pan), LRP5, LRP6, CD20, IL-6, TNFalfa, IL-23, IL-17, CD80, CD86, CD3, CEA, Muc16, PSMA, PSCA, CD44, c-Kit, DDR1, DDR2, RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, RSPO(pan), polipéptidos de la familia BMP, BMP(pan), BMPR1a, BMPR1b, y una combinación de los mismos. Como se usa en este documento, "pan" pretende describir polipéptidos heteromultiméricos que se unen a múltiples antígenos de la misma familia. Por ejemplo, "Notch(pan)" pretende describir un polipéptido heteromultimérico que se une a más de uno del grupo de Notch1, Notch2, Notch3 o Notch4.

25 En un modo de realización, el polipéptido heteromultimérico se une específicamente a DLL4 y VEGF.

30 En un modo de realización, se proporcionan anticuerpos que se unen a VEGF. En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo (219R0302) que se une específicamente a VEGF, en el que el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYTFTNYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende SINPSNGGTSYNEKFKR (SEQ ID NO:21) y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYYDNSYAMDY (SEQ ID NO:22); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende QASQDISNYVN (SEQ ID NO:23), una CDR2 de cadena ligera que comprende DASNLQT (SEQ ID NO:24) y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYDDLPP (SEQ ID NO:25). En otro modo de realización, se proporciona un anticuerpo (219R0202) que se une específicamente a VEGF, en el que el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYTFTNYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende SINPSNGGTSYNEKFKR (SEQ ID NO:21) y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYYDNSYAMDY (SEQ ID NO:22); y/o (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQGINHLAW (SEQ ID NO:26), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNLHS (SEQ ID NO:27) y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYDNLPL (SEQ ID NO:28).

35 En un modo de realización, los polipéptidos heteromultiméricos VEGF y DLL4 comprenden un anticuerpo con la misma especificidad que 21M18 y bien 219R0302 o 219R0202. Estos polipéptidos heteromultiméricos pueden producirse teniendo la cadena ligera unida a la cadena pesada, o usando una cadena ligera idéntica. En un modo de realización, los anticuerpos comprenden las sustituciones 13A/13B, como se describe en el presente documento, en su región Fc.

40 En un modo de realización, la secuencia de unión de VEGF comprende la SEQ ID NO:17 o la SEQ ID NO:18. En un modo de realización, la secuencia de unión de DLL4 comprende la SEQ ID NO:19. En otro modo de realización, el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de unión a VEGF que comprende la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO:11 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO:15; y la secuencia de unión de DLL4 que comprende la SEQ ID NO:19. En otro modo de realización, el polipéptido heteromultimérico comprende la secuencia de unión de VEGF que comprende la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO:11 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO:13; y la secuencia de unión de DLL4 que comprende la SEQ ID NO:19. En un modo de realización adicional, el polipéptido heteromultimérico comprende la secuencia de unión de

VEGF que comprende la secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO:11 y la secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO:15; y la secuencia de unión de DLL4 que comprende la SEQ ID NO:19.

5 En otro modo de realización, la secuencia de unión de VEGF comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:10, 29 y 30. En un modo de realización, el polipéptido VEGF es un anticuerpo.

10 En algunos modos de realización, los polipéptidos o anticuerpos heteromultiméricos son anticuerpos intactos tales como anticuerpos monoclonales o humanizados. En otro modo de realización, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos, tales como Fab o scFv. En un modo de realización, los anticuerpos/polipéptidos anti-VEGF inhiben el crecimiento tumoral.

15 Los polipéptidos heteromultiméricos de la invención tienen doble especificidad (bivalente) y son capaces de unirse a dos antígenos diferentes simultáneamente. En un modo de realización, los polipéptidos heteromultiméricos contienen dos sitios de combinación de anticuerpos. En otro modo de realización, los polipéptidos heteromultiméricos son inmunoadhesinas bivalentes. Los diferentes antígenos pueden ubicarse en diferentes células o en la misma célula. La reticulación del antígeno se puede mostrar *in vitro*, por ejemplo, proporcionando una superficie sólida a la que se ha unido un primer antígeno, agregando un anticuerpo biespecífico específico para el primer antígeno y un segundo antígeno para el cual la proteína de unión también es específica y detectando la presencia del segundo antígeno unido.

20 Los polipéptidos heteromultiméricos pueden, en ciertos modos de realización, bloquear la interacción entre dos receptores y sus respectivos ligandos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico específico para DLL4 y VEGF inhibe la migración celular inducida por VEGF, así como la señalización del receptor Notch. En este caso, la combinación de dos especificidades de unión al receptor es más eficaz para inhibir la migración celular que los anticuerpos originales individuales.

25 Las moléculas heteromultiméricas también pueden ser monovalentes, lo que significa que tienen un sitio de unión a antígeno. En un modo de realización, los polipéptidos heteromultiméricos monovalentes poseen un dominio variable, y el segundo polipéptido que contiene el dominio CH3 está truncado de manera que no contiene un dominio variable. Estos segundos polipéptidos que contienen el dominio CH3 pueden poseer una etiqueta detectable. En un modo de realización, el polipéptido heteromultimérico monovalente contiene un epítipo FLAG. El epítipo FLAG es un epítipo sintético que consta de ocho residuos de aminoácidos (DYKDDDDK). En otro modo de realización, el polipéptido heteromultimérico monovalente es una inmunoadhesina.

35 En un modo de realización, las moléculas heteromultiméricas se producen en un primer formato denominado gen único biespecífico (SGBSP). Para generar SGBSP, se usa un conector de 30 aminoácidos para unir, o enlazar, genéticamente, la cadena ligera a su cadena pesada (véase, Lee et al. *Mol. Immunol.* 36:61-71 (1999)). Por lo tanto, cada unidad de unión SGBSP puede usar su propia cadena ligera para formar una unidad de unión Fab que se une a su diana respectiva. En un modo de realización, los genes individuales también comprenden las mutaciones Var3/13A y Var1/13B. En un modo de realización, se usan anticuerpos anti-DLL4 y anti-VEGF para producir SGBSP. En un modo de realización, las cadenas pesadas 21M18 y 219R0302/219R0202 se producen como SGBSP. En un modo de realización adicional, las cadenas pesadas 21M18 y 219R0302/219R0202 se clonan con los mutantes 13B y 13A, respectivamente.

45 Las moléculas heteromultiméricas de la invención se producen en un segundo formato denominado biespecífico monovalente (MBSP). Los MBSP usan una cadena ligera común con dos cadenas pesadas diferentes que comprenden las mutaciones Var3/13A y Var1/13B. Para los MBSP, una o ambas cadenas pesadas deben unirse a su diana en combinación con una cadena ligera común. En algunos modos de realización, la cadena ligera común es la cadena ligera original para una de las cadenas pesadas. En un modo de realización, se usan anticuerpos anti-DLL4 y anti-VEGF para producir SGBSP. En un modo de realización, las cadenas pesadas 21M18 y 219R0302/219R0202 se producen como SGBSP. En un modo de realización adicional, las cadenas pesadas 21M18 y 219R0302/219R0202 se clonan con los mutantes 13B y 13A, respectivamente.

55 Para expresar moléculas heteromultiméricas de la invención con combinaciones seleccionadas o aleatorias de dominios V_L y V_H , genes V que codifican esos dominios se ensamblan en un vector de expresión bacteriano. Por ejemplo, un vector puede ser usado que tiene secuencias que codifican una secuencia señal de secreción bacteriana y un conector de péptidos y que tiene sitios de restricción convenientes para la inserción de genes V_L y V_H . Alternativamente, podría ser deseable ensamblar primero todas las secuencias de codificación necesarias (por ejemplo, señal de secreción, V_L , V_H y el péptido conector) en una sola secuencia, por ejemplo mediante amplificación por PCR usando cebadores que se solapan, seguido de la ligación en un plásmido u otro vector. Cuando se desee proporcionar una combinación específica de dominios V_L y V_H , se usan cebadores de PCR específicos para las secuencias que codifican esos dominios. Cuando se desea crear diversas combinaciones de un gran número de dominios V_L y V_H , se usan mezclas de cebadores para amplificar secuencias múltiples.

65 Se dispone de vectores para la construcción y expresión de polipéptidos heteromultiméricos de la invención en bacterias que contienen secuencias de señal de secreción y sitios de clonación de restricción convenientes. Las combinaciones de genes V_L y V_H que codifican los sitios de unión específicos para un antígeno particular se aíslan a

partir de ADNc de hibridomas de células B. Alternativamente, combinaciones aleatorias de genes V_L y V_H se obtienen a partir de ADN genómico y los productos posteriormente cribados para la unión a un antígeno de interés. Normalmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para la clonación, utilizando cebadores que son compatibles con los sitios de restricción en el vector de clonación. Véase, por ejemplo, Dreher, M.L. et al. (1991) J. Immunol. Methods 139:197-205 ; Ward, E.S. (1993) Adv. Pharmacol. 24:1-20 ; Chowdhury, P.S. y Pastan, I. (1999) Nat. Biotechnol. 17:568-572 .

En un modo de realización, se proporcionan polinucleótidos que expresan los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento. En un modo de realización, se proporcionan polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos que codifican los polipéptidos o anticuerpos. En un modo de realización, el polinucleótido comprende las secuencias de las SEQ ID NO:12, 14 o 16.

En un modo de realización, los anticuerpos biespecíficos se preparan al expresar 1) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada que corresponde a una primera especificidad conectada a un dominio variable de cadena ligera de una segunda especificidad; y 2) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera que corresponde a la primera especificidad conectada al dominio variable de cadena pesada de la segunda especificidad.

Para ciertos polipéptidos heteromultiméricos, puede desearse la expresión en otras células huésped. Por ejemplo, los polipéptidos heteromultiméricos que comprenden dominios constantes a menudo se expresan más eficientemente en células eucariotas, incluidas células de levadura, insecto, vertebrado y mamífero. Será necesario usar tales células donde se desee que el producto expresado esté glicosilado. Los fragmentos de ADN que codifican el primer y segundo polipéptidos pueden clonarse, por ejemplo, en vectores de HCMV diseñados para expresar cadenas ligeras humanas de cadenas pesadas humanas en células de mamíferos. (Véase, por ejemplo, Bendig, et al., Patente de Estados Unidos Nº 5.840.299 ; Maeda, et al. (1991) Hum. Antibod. Hybridomas 2, 124-134). Tales vectores contienen el promotor y potenciador del citomegalovirus humano (HCMV) para la transcripción de alto nivel de las construcciones de cadena ligera y cadena pesada. En un modo de realización preferido, el vector de expresión de la cadena ligera es pKN100 (cortesía del Dr. S. Tarran Jones, MRC Collaborative Center, Londres, Inglaterra), que codifica una cadena ligera kappa humana, y el vector de expresión de la cadena pesada es pG1D105 (cortesía de Dr. S. Tarran Jones), que codifica una cadena pesada gamma-1 humana. Ambos vectores contienen promotores y potenciadores de HCMV, orígenes de replicación y marcadores seleccionables funcionales en células de mamíferos y E. coli.

Un marcador seleccionable es un gen que codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Los marcadores seleccionables típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemase para Bacilli. Un marcador seleccionable particularmente útil confiere resistencia al metotrexato. Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR, preparada y propagada según lo descrito por Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl Acad Sci. USA 77, 4216 . Las células transformadas se exponen a continuación a niveles aumentados de metotrexato. Esto conduce a la síntesis de múltiples copias del gen DHFR y, concomitantemente, múltiples copias de otros ADN que comprenden los vectores de expresión, como el ADN que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo. En otro ejemplo, las células de mieloma mutantes que son deficientes para la timidina quinasa (TK) no pueden usar la timidina suministrada de forma exógena cuando se usa aminopterina para bloquear la síntesis de ADN. Los vectores útiles para la transfección llevan un gen TK intacto que permite el crecimiento en medios suplementados con timidina.

Cuando se desea expresar una construcción génica en levadura, un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7. Stinchcomb et al., 1979 Nature, 282, 39 ; Kingsman et al., 1979, Gene 7, 141 . El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No.44076 o PEP4-1. Jones (1977) Genetics 85,12 . La presencia de la lesión de *trp 1* en el genoma de la célula huésped de la levadura proporciona un ambiente efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20,622 o 38,626) se complementan con plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

Las células huésped preferidas para la transformación de vectores y la expresión de anticuerpos de la presente invención son células bacterianas, células de levadura y células de mamífero, por ejemplo, células COS-7, células de ovario de hámster chino (CHO) y líneas celulares de origen linfóide tales como células de linfoma, mieloma o hibridoma. Las células huésped transformadas se cultivan mediante procedimientos conocidos en la técnica en un medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono, por ejemplo, carbohidratos, como glucosa o lactosa, nitrógeno, por ejemplo, aminoácidos, péptidos, proteínas o sus productos de degradación, tales como peptonas, sales de amonio o similares, y sales inorgánicas, por ejemplo, sulfatos, fosfatos y/o carbonatos de sodio, potasio, magnesio y calcio. Además, el medio contiene, por ejemplo, sustancias que promueven el crecimiento, tales como oligoelementos, por ejemplo, hierro, zinc, manganeso y similares.

Las moléculas heteromultiméricas encuentran uso en los procedimientos diagnósticos y terapéuticos descritos en este documento. En ciertos modos de realización, las moléculas descritas anteriormente se usan para detectar la expresión de una proteína marcadora de células tumorales en muestras biológicas como, por ejemplo, una biopsia de tejido del paciente, un derrame pleural o una muestra de sangre. Las biopsias de tejido pueden seccionarse y detectarse proteínas usando, por ejemplo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Además, se pueden aislar células individuales de una muestra y se puede detectar la expresión de proteínas en células fijas o vivas mediante análisis FACS. En ciertos modos de realización, las moléculas heteromultiméricas se pueden usar en matrices de proteínas para detectar la expresión de un marcador de células tumorales, por ejemplo, en células tumorales, en lisados celulares o en otras muestras de proteínas. En ciertos modos de realización, las moléculas heteromultiméricas de la presente invención se usan para inhibir el crecimiento de células tumorales poniendo en contacto las moléculas heteromultiméricas con células tumorales en ensayos basados en células *in vitro*, modelos animales *in vivo*, etc. En ciertos modos de realización, las moléculas heteromultiméricas se usan para tratar el cáncer en un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula heteromultimérica contra uno o más marcadores de células tumorales.

En algunos modos de realización, la molécula heteromultimérica es un anticuerpo biespecífico humanizado. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que contienen secuencias mínimas de anticuerpos no humanos (p. Ej. Roedor) dentro de la determinación de antígeno o región hipervariable que comprenden las tres regiones de determinación complementarias (CDR) dentro de cada cadena de anticuerpo. Dichos anticuerpos se usan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando se administran a un sujeto humano. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos que tienen un mínimo o prácticamente ninguna secuencia no humana. Un anticuerpo humano es un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un humano.

Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Un anticuerpo se puede humanizar sustituyendo las CDR de un anticuerpo humano con las de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas siguiendo los procedimientos de Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525 ; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327 ; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536 . El anticuerpo humanizado se puede modificar aún más mediante la sustitución de un residuo adicional ya sea en la región marco humana variable y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo.

La elección de los dominios variables humanos de la cadena pesada y/o ligera para usarse en la preparación de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza en base a la biblioteca completa de secuencias de aminoácidos de dominio variable humanas conocidas. Así, en ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos humanos que es más homóloga a la del anticuerpo de roedor del cual se toman las CDR se usa como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., 1993, J. Immunol., 151:2296; Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol., 196:901). Otro procedimiento usa una FR particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas y se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., 1992, PNAS, 89; 4285 ; Presta et al. , 1993, J. Immunol., 151:2623). En ciertos modos de realización, se usa una combinación de procedimientos para seleccionar la FR variable humana para usarse en la generación de anticuerpos humanizados.

Además, se entiende que los anticuerpos (por ejemplo, de roedor) que van a humanizarse deben conservar una alta afinidad por el antígeno, así como otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, los anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante un proceso de análisis de la secuencia original a partir del anticuerpo de roedor a humanizar y las diversas secuencias de humanización candidatas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Los programas informáticos se pueden usar para ilustrar y mostrar las estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de anticuerpos candidatas seleccionadas. El uso de tales modelos permite el análisis del posible papel de los residuos en la función del anticuerpo a humanizar, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad del anticuerpo candidato para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse desde el anticuerpo original al anticuerpo humanizado receptor para que se logren las características deseadas del anticuerpo. En general, los residuos en las CDR de la región de determinación de antígeno (o región hipervariable) se conservan del anticuerpo original (por ejemplo, el anticuerpo de roedor con las propiedades de unión a antígeno deseadas) en el anticuerpo humanizado para la unión a antígeno. En ciertos modos de realización, al menos un residuo adicional dentro de la FR variable se retiene del anticuerpo original en el anticuerpo humanizado. En ciertos modos de realización, hasta seis residuos adicionales dentro de la FR variable se conservan del anticuerpo original en el anticuerpo humanizado.

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de las inmunoglobulinas se designan Hx y Lx respectivamente, donde x es un número que designa la posición de un aminoácido según el esquema de Kabat, Secuencias de proteínas de interés inmunológico, Departamento de los Estados Unidos de Salud y Servicios

Humanos, 1987, 1991. Kabat enumera muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subgrupo, y enumera los aminoácidos más comunes para cada posición de residuo en ese subgrupo para generar una secuencia de consenso. Kabat usa un procedimiento para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia enumerada, y este procedimiento para asignar números de residuo se ha convertido en estándar en el campo. El esquema de Kabat es extensible a otros anticuerpos no incluidos en su compendio alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso según Kabat por referencia a los aminoácidos conservados. El uso del sistema de numeración de Kabat identifica fácilmente los aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a una posición L50 de aminoácido de un anticuerpo de ratón. Además, cualquiera de las dos secuencias de anticuerpos puede alinearse de manera única, por ejemplo, para determinar el porcentaje de identidad, utilizando el sistema de numeración de Kabat, de modo que cada aminoácido en una secuencia de anticuerpo esté alineado con el aminoácido en la otra secuencia que tenga el mismo número de Kabat. En algunos modos de realización, después de la alineación, si una región de anticuerpo en cuestión (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones del anticuerpo en cuestión y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región del anticuerpo en cuestión como de referencia, dividido entre el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar los espacios, multiplicado por 100 para convertirse a porcentaje.

Además de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos completamente humanos pueden prepararse directamente usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; y Patente de Estados Unidos 5.750.373). Además, el anticuerpo humano se puede seleccionar de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que son capaces con la inmunización de producir todo el repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en las patentes estadounidenses 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016 .

Esta invención engloba anticuerpos biespecíficos que reconocen específicamente VEGF y DLL4. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse específicamente a al menos dos epítomos diferentes (véase, por ejemplo, Wu et al., *Simultaneous Targeting of Multiple Disease Mediators by a Dual-Variable-Domain Immunoglobulin*, *Nature Biotech.*, 25(11):1290-97). Los diferentes epítomos pueden estar dentro de la misma molécula (por ejemplo, el mismo polipéptido marcador tumoral) o en moléculas diferentes, de modo que ambos, por ejemplo, pueden reconocer y unirse específicamente a un marcador de células tumorales también. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos.

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Las técnicas para producir anticuerpos biespecíficos son comunes en la técnica (Millstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science* 229:81; Suresh et al, 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1547 -1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.* 152:5368; y Patente de Estados Unidos 5.731.168). También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos (Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991))

En ciertos modos de realización, se proporciona un fragmento del polipéptido heteromultimérico para, por ejemplo, aumentar la penetración en el tumor. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos: Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto et al., 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81). En ciertos modos de realización, los fragmentos de anticuerpo se producen de forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse a partir de *E. coli* u otras células huésped, lo que permite la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Dichos fragmentos de anticuerpos también pueden aislarse a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un anticuerpo lineal como se describe en la patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo, y puede ser monoespecífico o biespecífico. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la técnica.

Además, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpos, modificar una molécula heteromultimérica para aumentar su vida media en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítomo de unión al receptor de rescate en la molécula heteromultimérica mediante la mutación de la región apropiada o mediante la incorporación del epítomo en una marca peptídica que luego se fusiona con la molécula heteromultimérica en cualquier extremo o en el medio (p. ej., por síntesis de ADN o péptidos).

Debe apreciarse que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del heteromultímero con los polipéptidos de interés. A este respecto, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que se pueda inducir para montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado al tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, primate no humano (por ejemplo, *Macaca fascicularis*, macacos, etc.) o lupino. En algunos modos de realización, tanto la región variable como la constante de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otros modos de realización, las regiones variables de anticuerpos compatibles (generalmente derivadas de una fuente no humana) pueden diseñarse o adaptarse específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables pueden humanizarse o alterarse de otro modo mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

Los dominios variables en las cadenas pesada y ligera se alteran al menos al reemplazar parcialmente una o más CDR y, si es necesario, al reemplazar parcialmente la región marco y con el cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones marco, se prevé que las CDR derivarán de un anticuerpo de diferente clase y preferiblemente de un anticuerpo de diferente especie. Puede que no sea necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede que solo sea necesario transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión al antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en la patente de EE.UU. Nos. 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, estará sobradamente al alcance de los expertos en la técnica, ya sea mediante experimentación rutinaria o mediante pruebas de prueba y error para obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la técnica apreciarán que los heteromultímeros modificados pueden comprender anticuerpos, o fragmentos inmunorreactivos de los mismos, en los cuales al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se han eliminado o alterado de otro modo para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tales como una mayor localización del tumor o una vida media en suero reducida cuando se compara con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. En algunos modos de realización, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante comprenden adiciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los heteromultímeros modificados descritos en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio constante de cadena ligera (CL). En algunos modos de realización, se contemplan regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios se eliminan parcial o totalmente. En algunos modos de realización, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones de dominio eliminado o variantes en las que se ha eliminado el dominio CH2 completo (construcciones Δ CH2). En algunos modos de realización, el dominio de región constante omitido se reemplazará por un espaciador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular impartida típicamente por la región constante ausente.

Se cree que los polipéptidos heteromultiméricos que comprenden regiones constantes modificadas como se describe en el presente documento proporcionan funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del polipéptido administrado. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando así la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante moderen la unión del complemento y, por lo tanto, reduzcan la vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aún otras modificaciones de la región constante se pueden usar para eliminar enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten una mejor localización debido al aumento de la especificidad del antígeno o la flexibilidad del anticuerpo. De manera similar, las modificaciones de la región constante de acuerdo con esta invención pueden hacerse fácilmente usando técnicas de ingeniería molecular o bioquímica bien conocidas dentro del alcance del experto en la técnica.

La invención también se refiere a moléculas heteromultiméricas que comprenden un polipéptido heteromultimérico conjugado a un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), isótopos radioactivos (es decir, un radioconjugado), etc. Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunocombinados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercalantes. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas se pueden usar la cadena A de la difteria, los fragmentos activos no ligadores de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina, la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, las proteínas *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, las proteínas *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcín, crotín, inhibidor de *saponaria officinalis*, gelonín, mitogellín, restrícin, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. En algunos modos de realización, las moléculas heteromultiméricas pueden conjugarse a radioisótopos, tales como ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re y ¹⁸⁸Re usando de cualquiera de una serie de quelantes conocidos o con etiquetado directo. En otros modos de realización, las composiciones descritas pueden comprender moléculas

heteromultiméricas acopladas a fármacos, profármacos o linfocinas tales como interferón. Los conjugados de la molécula heteromultimérica y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-pirididilol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetilo adipimidato HCL), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis-(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como toleno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). También se pueden usar conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, como caliqueamicina, maitansinoides, tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad toxina. En algunos modos de realización, los polipéptidos heteromultiméricos pueden formar complejos con otros ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos) en los que la molécula resultante se une tanto a la célula neoplástica como a una célula efectora tal como una célula T.

Independientemente de cómo se obtienen las cantidades útiles, los polipéptidos heteromultiméricos de la presente invención se pueden usar en cualquiera de una serie de formas conjugadas (es decir, un inmunocombinado) o no conjugadas. Alternativamente, los polipéptidos heteromultiméricos de esta invención pueden usarse en una forma no conjugada o "desnuda" para aprovechar los mecanismos de defensa natural del sujeto, incluida la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para eliminar las células malignas. La selección de qué polipéptido heteromultimérico combinado o no combinado se utilizará dependerá del tipo y estadio del cáncer, el uso de un tratamiento complementario (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y el estado del paciente. Se apreciará que un experto en la técnica podría realizar fácilmente tal selección en vista de las enseñanzas del presente documento.

Los polipéptidos heteromultiméricos de la presente invención pueden ensayarse para determinar la unión inmunoespecífica mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los ensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas como el análisis BIAcore, el análisis FACS, la inmunofluorescencia, la inmunocitoquímica, las transferencias de Western blot, los radioinmunoensayos, ELISA, los ensayos "sandwich", los ensayos de inmunoprecipitación reacciones de precipitina, reacciones de difusión de gel precipitina, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, ensayos fluorescentes e inmunosayos de proteína A. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

En algunos modos de realización, la inmunoespecificidad de un polipéptido heteromultimérico contra un marcador de células tumorales se determina usando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar antígeno, recubrir los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con antígeno, agregar el anticuerpo contra un marcador de células tumorales combinado a un compuesto detectable como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo, incubar por un periodo de tiempo y detectar la presencia del antígeno. En algunos modos de realización, la molécula heteromultimérica que se une a un marcador de células tumorales no se combina a un compuesto detectable, sino que se agrega al pocillo un segundo anticuerpo combinado que reconoce el polipéptido heteromultimérico contra un marcador de células tumorales. En algunos modos de realización, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo contra un marcador de células tumorales puede recubrirse en el pocillo y se puede agregar un segundo anticuerpo combinado con un compuesto detectable después de la adición del antígeno al pocillo recubierto. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de los ELISA conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1).

La afinidad de unión de un polipéptido heteromultimérico por un antígeno de células tumorales y la tasa de desactivación de una interacción heteromultimérico-antígeno pueden determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de un antígeno marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I), o un fragmento o variante del mismo, con el polipéptido heteromultimérico de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado seguido de la detección del polipéptido heteromultimérico unido al antígeno marcado. La afinidad del polipéptido heteromultimérico contra un marcador de células tumorales y las tasas de desintegración de la unión pueden determinarse a partir de los datos mediante análisis del gráfico de Scatchard. En algunos modos de realización, el análisis cinético BIAcore se usa para determinar las tasas de unión y desactivación de un polipéptido heteromultimérico contra un marcador de células tumorales. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de anticuerpos de chips con antígenos marcadores de células tumorales inmovilizados en su superficie.

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos pueden estar ligados química o biosintéticamente a agentes antitumorales o agentes productores de señales detectables. Los agentes antitumorales unidos a un anticuerpo incluyen cualquier agente que destruya o dañe un tumor al que el anticuerpo se haya unido o en el entorno de la célula a la que se ha unido el anticuerpo. Por ejemplo, un agente antitumoral es un agente tóxico, como un agente quimioterapéutico o un radioisótopo. Los agentes quimioterapéuticos adecuados son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen antraciclinas (por ejemplo, daunomicina y doxorubicina), metotrexato, vindesina, neocarzinostatina, cis-platino, clorambucilo, arabinosido de citosina, 5-fluorouridina, micalanina, ricina y calicicina. Los agentes

quimioterapéuticos se conjugan al anticuerpo utilizando procedimientos convencionales (ver, por ejemplo, Hermentin y Seiler (1988) Behring Inst. Mitt. 82, 197-215).

Los agentes que producen señales detectables son útiles in vivo e in vitro para fines de diagnóstico. El agente que produce la señal produce una señal medible que es detectable por medios externos, generalmente la medición de la radiación electromagnética. En su mayor parte, el agente productor de señal es una enzima o cromóforo, o emite luz por fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Los cromóforos incluyen colorantes que absorben la luz en la región ultravioleta o visible, y pueden ser sustratos o productos de degradación de reacciones catalizadas por enzimas.

La invención contempla además polipéptidos heteromultiméricos a los que están unidos restos diana o informadores. Los restos diana son los primeros miembros de los pares de unión. Los agentes antitumorales, por ejemplo, se conjugan a segundos miembros de dichos pares y, por lo tanto, se dirigen al sitio donde se une el anticuerpo. Un ejemplo común de dicho par de unión es la avidina y la biotina. En un modo de realización, la biotina se conjuga con un polipéptido heteromultimérico de la invención, y de este modo proporciona una diana para un agente antitumoral u otro resto que se conjuga a avidina o estreptavidina. Alternativamente, la biotina u otro resto de este tipo está vinculado a un polipéptido heteromultimérico de la invención y se usa como informador, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico en el que un agente productor de señal detectable está conjugado a avidina o estreptavidina.

Los polipéptidos heteromultiméricos pueden administrarse para tratamientos terapéuticos a un paciente que padece un tumor en una cantidad suficiente para prevenir o reducir la progresión del tumor, por ejemplo, el crecimiento, invasividad, metástasis y/o recurrencia del tumor. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunológico del paciente. Los esquemas de dosificación también variarán con el estado de la enfermedad y el estado del paciente, y típicamente variarán desde una dosis de bolo único o infusión continua hasta múltiples administraciones por día (por ejemplo, cada 4-6 horas), o según lo indique el médico que lo trata La condición del paciente. Los anticuerpos de la invención se pueden administrar en dosis únicas de hasta 40 mg/kg de peso corporal o más. Más preferiblemente, los anticuerpos se administran en dosis que varían de 0,2 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal. Debe observarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a ninguna dosis particular.

La presente invención se puede usar para tratar cualquier tumor adecuado, que incluye, por ejemplo, tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, cuello uterino o hígado.

Las formulaciones se preparan para el almacenamiento y uso combinando un polipéptido heteromultimérico purificado de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, vehículo, excipiente) (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Mack Publishing, 2000). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, tampones no tóxicos tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenol, butílico o bencilico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; carbohidratos tales como monosaccharides, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN o polietilenglicol (PEG).

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar de varias formas para tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (por ejemplo, a las membranas mucosas, incluida la administración vaginal y rectal), como parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos; pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluso por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral; o parenteral, incluida la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular).

La formulación terapéutica puede estar en forma de dosificación unitaria. Tales formulaciones incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración por inhalación. En composiciones sólidas tales como tabletas, el ingrediente activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico. Los ingredientes de comprimidos convencionales incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato o gomas cálcicas y otros diluyentes (por ejemplo, agua) para formar una composición sólida de preformulación que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de los mismos. La composición de preformulación sólida se subdivide luego en formas

de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente. Los comprimidos, píldoras, etc. de la nueva composición pueden recubrirse o combinarse de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender una composición interna cubierta por un componente externo. Además, los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistirse a la desintegración y permite que el componente interno pase intacto a través del estómago o se retrase en la liberación. Se puede usar una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen polipéptidos heteromultiméricos de la presente invención complejados con liposomas (Epstein y otros, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 ; Hwang, y otros, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 y Patente de los Estados Unidos 4.485; 045 y 4.544.545). Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la Patente de Estados Unidos 5.013.556. Algunos liposomas se pueden generar por evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los polipéptidos heteromultiméricos también se pueden atrapar en microcápsulas. Dichas microcápsulas se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli- (metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Además se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles tales como poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol de vinilo), polilactidas (patente de EE . UU. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-glicólico degradables como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), acetato de sacarosa isobutirato y poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico.

En algunos modos de realización, el tratamiento implica la administración combinada de un polipéptido heteromultimérico de la presente invención y un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con polipéptidos heteromultiméricos puede ocurrir antes, simultáneamente o después de la administración de quimioterapias. Las quimioterapias contempladas por la invención incluyen sustancias químicas o fármacos que son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente, tales como doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinosido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfan, citoxina, taxol, metotexato , Cisplatino, melfalán, vinblastina, gemcitabina, irinotecán y carboplatino. La administración combinada puede incluir la administración conjunta, ya sea en una única formulación farmacéutica o utilizando formulaciones separadas, o administración consecutiva en cualquier orden, pero generalmente dentro de un período de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. Los esquemas de preparación y dosificación de dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el experto en la materia. La preparación y los esquemas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., MC Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

En otros modos de realización, el tratamiento implica la administración combinada de un polipéptido heteromultimérico de la presente invención y terapia de radiación. El tratamiento con polipéptido heteromultimérico puede ocurrir antes, simultáneamente con o después de la administración de radioterapia. Cualquier esquema de dosificación para dicha radioterapia se puede usar según lo determine el profesional experto.

En otros modos de realización, el tratamiento puede involucrar la administración combinada de polipéptidos heteromultiméricos de la presente invención con anticuerpos contra antígenos asociados a tumores, que incluyen, entre otros, anticuerpos que se unen al receptor de EGF (EGFR) (cetuximab/Erbitux®), el receptor erbB2 (HER2) (trastuzumab/Herceptin®), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (bevacizumab/Avastin®). Además, el tratamiento puede incluir la administración de una o más citoquinas, puede ir acompañado de la extirpación quirúrgica de las células cancerosas o cualquier otra terapia que el médico tratante considere necesaria.

En otros modos de realización, el tratamiento puede implicar la administración combinada de polipéptidos heteromultiméricos de la presente invención y un segundo agente terapéutico. En algunos modos de realización, el segundo agente terapéutico se administra para tratar un efecto secundario causado por la administración del polipéptido heteromultimérico.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un polipéptido heteromultimérico de la presente invención

depende del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, si el polipéptido heteromultimérico se administra para fines terapéuticos. o con fines preventivos, terapia previa, historial clínico del paciente, etc., todo a discreción del médico tratante. El polipéptido heteromultimérico se puede administrar una vez o durante una serie de tratamientos que duran desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad (por ejemplo, reducción del tamaño del tumor). Los horarios de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de las mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo individual. El médico administrador puede determinar fácilmente las dosis óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. En general, la dosis es de 0.01 μg a 100 mg por kg de peso corporal y se puede administrar una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación en función de los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en los fluidos corporales o tejidos.

Se proporcionan kits que comprenden los polipéptidos heteromultiméricos descritos en el presente documento y que pueden usarse para realizar los procedimientos descritos en el presente documento. En ciertos modos de realización, un kit comprende al menos un polipéptido heteromultimérico purificado contra un marcador tumoral en uno o más recipientes. En ciertos modos de realización, un kit comprende al menos dos polipéptidos heteromultiméricos. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los anticuerpos descritos de la presente invención pueden incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

Los modos de realización de la presente divulgación pueden definirse adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos que describen en detalle la preparación de polipéptidos heteromultiméricos de la presente divulgación y procedimientos para usar polipéptidos heteromultiméricos de la presente divulgación. Será evidente para los expertos en la materia que pueden realizarse muchas modificaciones, tanto de los materiales como de los procedimientos, sin apartarse del alcance de la presente divulgación. Siempre que sea posible, se utilizarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a partes iguales o similares. Como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", "o" y "el/la/los/las" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de tales anticuerpos o uno o más anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica. Además, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, pureza, longitudes de polipéptidos y polinucleótidos, y demás, utilizados en la memoria descriptiva, se modifican por el término "aproximadamente", a menos que se indique lo contrario. Por consiguiente, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas de la presente invención.

Todos los diversos modos de realización u opciones descritos en este documento pueden combinarse en cualquiera y todas las variaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Identificación de interacciones candidatas dentro de la interfaz de dimerización de anticuerpos.

Con el fin de comprender mejor la naturaleza de la interfaz de dimerización entre los dominios CH3 de la cadena pesada del anticuerpo, se examinó la estructura cristalina de un dominio CH3 del anticuerpo (estructura reportada por primera vez por Deisenhofer). J. (1981) *Biochemistry*, 20, 2361-2370). En esta estructura, la dimerización de los dos fragmentos Fc está mediada por interacciones entre cadenas entre los dominios CH3 (Figura 1). La superficie de interacción del dominio CH3 contiene una región central de residuos hidrófobos flanqueados por residuos tanto de carácter hidrófilo como cargado. Dentro de la región hidrófoba del núcleo hay tirosinas conservadas que presentan grupos hidroxilo para interacciones hidrófilas potenciales, sirviendo así como residuos hidrófobos y también sirviendo para permitir interacciones hidrófilas. La Figura 2 muestra representaciones de la estructura del dominio CH3 dimerizado. Una hebra está sombreada más oscura que la otra para mayor claridad. Se muestran las cadenas laterales de los aminoácidos que recubren la superficie de interacción entre los dominios CH3. La Figura 3 destaca los aminoácidos seleccionados dentro del dominio CH3 involucrados en posibles interacciones entre cadenas en tres vistas separadas de la estructura. Los números de posición de los aminoácidos en la Figura 3 son relativos a la región constante de la IgG2 humana. La Figura 4 muestra una alineación de los dominios constantes de los isotipos de IgG humana. Se resaltan los residuos particulares que pueden participar en las interacciones entre cadenas y que se indican en la Figura 2. La Tabla 1 enumera la posición del aminoácido correspondiente a estos residuos que están potencialmente involucrados en interacciones entre cadenas para cada uno de los isotipos de IgG humana con nomenclatura de numeración en relación con los dominios constantes de la línea germinal de IgG humana.

Tabla 1

Aminoácido	Residuo de IgG1 Humana #	Residuo de IgG2 Humana #	Residuo de IgG3 Humana #	Residuo de IgG4 Humana #
Tyr	232	228	279	229
Leu	234	230	281	231
Ser	237	233	284	234
Glu o Asp	239	235	286	236
Glu	240	236	287	237
Lys	243	239	290	240
Gln	245	241	292	242
Ser	247	243	294	244
Thr	249	245	296	246
Leu	251	247	298	248
Lys	253	249	300	250
Asn	273	269	320	270
Lys o Asn	275	271	322	272
Thr	277	273	324	274
Val o Met	280	276	327	277
Asp	282	278	329	279
Asp	284	280	331	281
Ser	286	282	333	283
Phe	288	284	335	285
Tyr	290	286	337	287
Lys o Arg	292	288	339	289
Thr	294	290	341	291

Ejemplo 2: Identificación de variantes de Fc que heterodimerizan selectivamente.

5

Se analizó la capacidad de varios tipos de modificaciones en el dominio CH3 de un anticuerpo para determinar su capacidad para generar anticuerpos heterodiméricos espontáneos. Se razonó que al reducir selectivamente las interacciones hidrofílicas que ocurren entre cada cadena CH3, podría ser posible hacer que la homodimerización del anticuerpo fuera menos favorable, y que al introducir simultáneamente sustituciones que hacen que la homodimerización sea desfavorable, pero la heterodimerización permisible, podría ser posible generar pares de variantes de Fc que heterodimerizaran selectivamente, pero tienen muy poca propensión a homodimerizar.

10

Por lo tanto, se creó una serie de pares de variantes y se evaluó su capacidad para formar selectivamente anticuerpos heterodiméricos. Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron en una cadena pesada truncada (denominada minicuerpo) que contiene el conector y la región CH2-CH3 de una cadena pesada, o una cadena pesada del anticuerpo de longitud completa. El uso de dos cadenas pesadas de diferentes tamaños permitió la visualización de las especies de heterodímeros como una molécula de masa molecular intermedia y proporcionó un ensayo para evaluar la propensión relativa de los anticuerpos variantes a formar heterodímeros. Este formato de ensayo se representa en forma de caricatura en la Figura 5. Se probaron varias variantes de pares de anticuerpos. Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron en vectores de expresión de anticuerpos que variaron la identidad de los aminoácidos seleccionados que tienen el potencial de participar en interacciones entre cadenas. Los vectores de expresión que codifican estas secuencias de anticuerpos variantes se transfectaron luego, solos o en combinación con otras cadenas asociadas, a células de mamífero (células HEK 293 humanas). Después de 48 horas, se recogieron los medios acondicionados de las células transfectadas y se sometieron a un análisis Western blot y se sondaron con un anticuerpo dirigido hacia el dominio Fc humano.

15

20

25

Como se muestra en la Figura 6, se diseñaron pares de variantes en las que cada variante tenía poca o ninguna propensión a la homodimerización, pero cuando se coexpresaban podían contribuir de manera eficiente a la formación

de heterodímeros. La coexpresión de la variante de anticuerpo Var2 (que contiene sustituciones de aminoácidos 249 K a E; 286 Y a F; y 288 K a E) con la variante de anticuerpo Var3 (13A) (que contiene sustituciones de aminoácidos 236 E a K; 278 D a K) da como resultado la formación casi exclusiva de heterodímero. La combinación simultánea tanto de la alteración de los aminoácidos cargados para manipular las fuerzas atractivas y repulsivas para favorecer la heterodimerización, como de la alteración de las interacciones de aminoácidos dentro del "núcleo" de la interfaz de dimerización del anticuerpo, se logró aquí mediante la eliminación de las interacciones hidroxilo mediadas por la tirosina central a través de su reemplazo por el residuo de aminoácido fenilalanina no polar, para reducir la propensión a la homodimerización. Esta combinación de manipulaciones permite tanto la reducción efectiva de la homodimerización como la retención de la heterodimerización.

Ejemplo 3: Unión del anticuerpo biespecífico a dos dianas diferentes

Se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para examinar la capacidad de la variante de anticuerpo biespecífico (Var2-Var3) para unirse a los antígenos. Las placas de ELISA se recubrieron ya sea sin antígeno (-), con anticuerpo anti-FLAG (0,05 mg/ml, clon M2 de SIGMA) o con ligando tipo Delta 4 humano recombinante (0,1 mg/ml) (aminoácidos 27-519 con marca carboxi-terminal 8xHis). Las placas recubiertas se incubaron luego con medio de cultivo celular de control (control negativo) o medio condicionado de células transfectadas con vectores de expresión que codifican Var2, Var3 y la cadena ligera L2 como se indica. Después de permitir que se produjera la unión durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron y el anticuerpo unido se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario de anti-IgG humana conjugado con HRP. La variante de anticuerpo biespecífico producida por la coexpresión de variantes Var2 y Var3 posee actividad funcional (Figura 7). La cadena pesada Var3 (13A) y la cadena ligera emparejada son capaces de unirse a DLL4, el antígeno reconocido por el anticuerpo homodimérico primario utilizado para desarrollar Var3, y el brazo de la cadena pesada de Var2 muestra una marca de epítipo FLAG y es capaz de interactuar con anticuerpos anti-FLAG mediante ELISA. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico es capaz de interactuar con dos dianas diferentes, estando cada cadena pesada involucrada en una interacción distinta.

Ejemplo 4: Desarrollo de anticuerpos anti-VEGF.

Los ratones se inmunizaron con VEGF humano y se aislaron los bazos. Las cadenas pesadas se amplificaron por PCR y se insertaron en una biblioteca de fagémidos de genes kappa de cadena ligera humanos. En la biblioteca de fagémidos se recuperaron y seleccionaron resultados en relación con el VEGF humano en tres rondas sucesivas. Se aisló un panel de Fab de VEGF (+) y se analizó en una serie de ensayos para encontrar antagonistas de VEGF (ensayo de proliferación de células HUVEC, ensayo de bloqueo de Biacore).

En un ensayo de proliferación de células HUVEC, un Fab de VEGF (+) (219R0302) inhibió parcialmente la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF (Figura 8). Brevemente, las células HUVEC congeladas (Lonza CC-2517) se sometieron a pases en ECGM (Lonza CC-3124) y se introdujeron en mini-bancos de germoplasma. Las células se descongelaron directamente a partir de células HUVEC de mini-bancos en medio de crecimiento, M199+FBS inactivado por calor al 10% (Gibco Cat#10082139)+50 µg/ml de EGS (BD:354006)+1X heparina + 1 mM L-Gln. Para realizar un ensayo de proliferación, se precubrió una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One Cat#655098) con 50 µl de 10 µg/ml de solución de colágeno de cola de rata, tipo I (BD: 354236, el colágeno I se preparó en ácido acético 0,02N) a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, la placa se aspiró completamente para eliminar la solución de colágeno I y se lavó una vez con 200 µl de DPBS. Las células HUVEC se tripsinizaron fuera del matraz utilizando el reactivo de subclonación de células endoteliales (Lonza: CC-5034). Todas las células se recogieron del matraz y se aislaron mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en medios de inaniación/ensayo (M199+2% H. I.FBS+1XHeparina+1 mM L+5 unidades/ml Heparin-Gln) a una densidad de 10⁵ células/ml. Las células se sembraron en la placa de ensayo a 5000/pocillo, 50 µl/pocillo. Las células se dejaron reposar durante 3 horas en una incubadora a 37°C. Las células se lavaron cuidadosamente una vez con DPBS mediante la adición gota a gota de DPBS 200 µl, y luego se agregaron 100 µl de medio de inaniación. Las células se dejaron incubar a 37°C durante la noche. A la mañana siguiente (ensayo d=0), los anticuerpos de prueba (o control): Avastin y LZ1) se prepararon en combinación con rhVEGF (R&D 293-VE-010). En los casos en que se probó una titulación de diferentes concentraciones de anticuerpos, se prepararon diluciones de 5 veces (a partir de 20 µg/ml de concentración final) en combinación con rhVEGF (5 ng/µl de concentración final) en medios de ensayo. Estas soluciones se preincubaron a 37 °C durante 2 horas. El medio de la placa de ensayo se aspiró cuidadosamente y se agregaron a las células 100 µl de las mezclas de Ab:VEGF. Después de 3-4 días de incubación en una incubadora a 37 °C, se agregó una mezcla adicional de Ab+rhVEGF (la misma concentración final para Ab y rhVEGF) a cada pocillo y se dejó incubar durante otros 4 días. En el día 7, se agregaron 20 µl de reactivo Alamar Blue (InvitrogenCat#DAL1025) a 200 µl de cultivo y se incubaron a 37 °C durante 5 a 6 horas. La placa se leyó con un lector de microplacas de fluorescencia (Ex=530nm/Em=590nm).

Los Fab también se analizaron para ver si bloqueaban la interacción VEGF-VEGFR2 utilizando Biacore 2000. Brevemente, VEGF se inmovilizó en un chip CM5 usando química basada en amins estándar (NHS/EDC). Los Fabs anti-VEGF o Fab de control se hicieron fluir sobre la superficie a 25 µg/ml y, inmediatamente después, se hizo fluir VEGFR2 recombinante sobre la superficie a 10 µg/ml. Tras selección y secuenciación adicionales, también se descubrió una variante de cadena ligera adicional de este Fab (219R0202) y se demostró que tenía propiedades

similares (datos no mostrados). Las secuencias para el 219R0302 y el 219R0202 se muestran como las SEQ ID NO:10-16. El Fab 219R0302 bloqueó completamente la unión de VEGFR2 a un VEGF en un experimento de bloqueo de Biacore (Figura 9).

- 5 Ambas IgG se reformatearon a IgG2, se expresaron y se purificaron para pruebas *in vitro* confirmatorias. Tanto el 219R0202 como el 219R0302 inhibieron completamente la activación inducida por VEGF de células HUVEC casi en la misma medida que el bevacizumab (Avastin) (Figura 10), un agente anti-VEGF aprobado.

10 Las afinidades de IgG se determinaron utilizando un instrumento Biacore 2000. En resumen, las proteínas recombinantes se inmovilizaron en un chip CM5 usando química estándar basada en aminas (NHS/EDC). Para cada Fab e IgG, se inyectaron diferentes concentraciones (100 - 1 nM) sobre la superficie y se recogieron datos cinéticos a lo largo del tiempo. Los datos se ajustaron utilizando la ecuación de ajuste global simultánea para producir constantes de afinidad (KD) para cada Fab e IgG. Se determinaron las afinidades de VEGF humano y de ratón 219R0202/219R0302 y se compararon con Avastin. A diferencia de Avastin, 219R0202 y 219R0302 se unen a VEGF tanto humano como de ratón (Tabla 2). Este dato sugiere que el epítipo 219R0202/219R0302 no es igual que Avastin, que solo se une al VEGF humano.

Tabla 2: 219R0302 y 219R0202 se unen a VEGF humano y de ratón

IgG	hVEGF (nM)	mVEGF (nM)
219R0302	2,1	21
219R0202	1,5	23
Avastin	1,3	NB

20 Ambos anticuerpos también se analizaron en un modelo de xenoinjerto de tumor de mama (UM-PE13) y mostraron una inhibición significativa del crecimiento del tumor (Figura 11). Brevemente, UM-PE13, una línea de xenoinjerto de tumor de mama, se determinó en la Universidad de Michigan. Se utilizaron ratones NOD/SCID machos inmunocomprometidos para el establecimiento de xenoinjertos de tumores UM-PE13. Se inyectaron 300,000 células viables por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones. Una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de entre 65 y 200 mm³, los ratones fueron aleatorizados. Como se muestra en la Figura 11, 219R0302 indujo un retraso en el crecimiento del tumor más fuerte que 219R0202. Avastin mostró el retraso de crecimiento más potente, que era indistinguible del 219R0302, lo que indica que 219R0302 y Avastin tienen una potencia casi equivalente en este modelo. A diferencia de 219R0302, 219R0202 fue estadísticamente diferente tanto de Avastin como de 219R0302.

30 Ejemplo 5: Desarrollo de formatos de anticuerpos biespecíficos.

Utilizando las mutaciones de heterodimerización descubiertas (13A/13B, Figura 12A), se utilizaron dos formatos para generar un anticuerpo biespecífico dirigido a hDLL4 (21M18) y VEGF (219R0302, 219R0202).

35 En el primer formato denominado gen único biespecífico (SGBSP), se usó un conector de 30 aminoácidos (5xGGGGS) para unir genéticamente la cadena ligera a su cadena pesada como lo hizo con anterioridad Lee et al. (Mol. Immunol. 36:61-71 (1999)) (Figura 12B). Al hacerlo, cada unidad de unión usa su propia cadena ligera para formar una unidad de unión Fab que se une a su diana respectiva. Cuando se combinan con las mutaciones biespecíficas (13A/13B) descritas anteriormente, dos genes individuales diferentes se reúnen para formar un anticuerpo biespecífico.

40 En el segundo formato llamado Biespecífico Monovalente (MBSP), se utilizó una cadena ligera común en concierto con dos cadenas pesadas diferentes, una que alberga la mutación 13A y la otra que alberga la mutación 13B (Figura 12C). Para este enfoque, una o ambas de las cadenas pesadas deben poder unirse a su diana en combinación con una cadena ligera común. En algunos casos, la cadena ligera común es la cadena ligera original para una de las cadenas pesadas.

45 Ambos formatos de anticuerpos se construyeron utilizando 21M18 (DLL4 anti-humano) y 219R0302/219R0202 (anti-VEGF) como bloques de construcción. Las cadenas pesadas 21M18 y 219R0202/0302 se clonaron con los mutantes Fc 13B y 13A, respectivamente. Una vez expresado y purificado, cada anticuerpo biespecífico se analizó para determinar la actividad anti-DLL4 y anti-VEGF en comparación con el anticuerpo de control.

50 Para evaluar el doble direccionamiento en el Biacore, se generó una superficie de VEGF de alta densidad como se describió anteriormente y el biespecífico se hizo fluir sobre ella a una alta concentración para saturar la superficie (25 µg/ml). Inmediatamente después de la unión biespecífica a la superficie, la proteína de fusión DLL4-Fc se hizo fluir sobre la misma superficie a 10 µg/ml. Si ambos brazos del biespecífico son funcionales, entonces DLL4 debería unirse al brazo anti-DLL4 no unido del biespecífico unido.

55 Ejemplo 6: Desarrollo de anticuerpo anti-DLL4/anti-VEGF de gen único biespecífico (SGBSP)

Se creó un SGBSP utilizando 21M18 y bien 219R0302 o 219R0202. Ambos SGBSP se expresaron bien y se purificaron mediante cromatografía de proteína A. Para evaluar el nivel de especies homodiméricas versus heterodiméricas, cada SGBSP se analizó utilizando un enfoque isoeléctrico. Dado que las especies homodiméricas (homodímeros 13A/13B) tienen diferentes pI de las especies heterodiméricas, el gel muestra claramente que ambos SGBSP eran heterodímeros en más del 90% en base a densitometría de gel (Figura 13A).

Para analizar su actividad anti-VEGF, los anticuerpos se analizaron en el mismo ensayo de proliferación inducida por VEGF. Como se muestra en la Figura 14, los SGBSP tanto del 219R0302_21M18 como del 219R0202_21M18 inhibieron parcialmente la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF, y este último mostró una actividad significativamente mejor que el primero. Dado que la unidad de unión de VEGF es monomérica en el contexto de la biespecífica, se espera una actividad reducida debido a la pérdida de avidéz en comparación con Avastin o los anticuerpos originales (219R0302/219R0202).

Los SGBSP tanto 219R0302_21M18 como 219R0202_21M18 también se analizaron respecto a su afinidad de VEGF. La afinidad de unión de 219R0202_21M18 SGBSP fue aproximadamente 5 veces más débil (6,9 nM) que la de 219R0202 (1,5 nM), lo que concuerda con una pérdida de avidéz (Tabla 3). La afinidad de unión de SGBSP de 219R0302_21M18 fue aproximadamente 4 veces más débil (7,6 nM) que la de 219R0302 (2,1 nM), lo que concuerda con una pérdida de avidéz (Tabla 3).

Tabla 3: SGBSP y MBSP VEGF Biacore Analysis.

IgG	VEGF (nM)
219R0302	2,1
219R0202	1,5
219R0302_21M18 SGBSP	7,6
219R0202_21M18 SGBSP	6,9
219R0202_21M18 MBSP	21

El SGBSP de 219R0202_21M18 también se probó para determinar su unión a células transfectadas con DLL4 humano en un ensayo de unión FACS (Figura 15). Cuando se comparó con 21M18, hubo una pérdida de aproximadamente 5 veces en la actividad de unión de DLL4 debido a la pérdida de avidéz. En resumen, las células HEK 293 humanas se transfectaron utilizando el reactivo de transfección Fugene 6 según lo recomendado por el fabricante (Roche Inc.). Las células se transfectaron con un vector de expresión de ADnc que codifica DLL4 humano de longitud completa, así como un segundo vector que codifica una proteína fluorescente verde, pcDNA-GFP, para marcar las células transfectadas transitoriamente. Veinticuatro a cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se incubaron con diferentes concentraciones de SGBSP durante 1 hora a 37 °C. Las células se enjuagaron dos veces con medio de tinción (HBSS con 2% de FCS) y se incubaron con un anticuerpo secundario fluorescente, IgG anti-humano de cabra H/L-ficoeritrina (PE), a una dilución 1:200 en PBS durante 1 hora. Las células se analizaron por citometría de flujo utilizando un instrumento FACS Caliber (BD Bioscience). La unión específica de SGBSP se evaluó determinando la presencia de células positivas para la señal de GFP y la señal de PE.

Usando el ensayo de doble direccionamiento descrito anteriormente, los SGBSP tanto 219R0302_21M18 como 219R0202_21M18 mostraron unión tanto a VEGF como a DLL4 como se esperaba (Figura 16A). El SGBSP también mostró una inhibición parcial de la proliferación inducida por VEGF (Figura 17). Por lo tanto, los ensayos confirman que las mutaciones biespecíficas efectivamente reunieron cada unidad de unión de una manera heterodimérica y que cada brazo de unión es funcional.

Ejemplo 7: Desarrollo de anticuerpo anti-DLL4/anti-VEGF monovalente biespecífico (MBSP)

En el segundo ejemplo, se creó un MBSP utilizando la cadena pesada 21M18, la cadena pesada común a 219R0302/219R0202 y la cadena ligera 21M18. El MBSP se expresó bien y se purificó por cromatografía de proteína A. Para evaluar el nivel de especies homodiméricas versus heterodiméricas, el MBSP se analizó utilizando un enfoque isoeléctrico. Dado que las especies homodiméricas (homodímero 13A/13B) tienen diferentes pI del heterodimérico, el análisis de gel IEF mostró que el MBSP era heterodímero en más del 90% en base a densitometría de gel (Figura 13A). Como se muestra en la Figura 13B, el homodímero 21M18 13B restante podría eliminarse aumentando la relación de 21R0202 de cadena pesada (13A) a 21M18 de cadena pesada (13B).

Dado que la unidad de unión de VEGF es monomérica y ha perdido su LC original en el contexto de la biespecífica, se espera una actividad de unión reducida debido a la pérdida de avidéz y de la contribución de la cadena ligera a la unión. Como confirmación de esta observación, la afinidad de unión de MBSP fue aproximadamente 14 veces más débil (21 nM) que la de 219R0202 (1,5 nM), lo cual concuerda con la pérdida de avidéz y de la unión de la cadena

ligera en comparación con el anticuerpo original (Tabla 3).

El MBSP también se probó para determinar la unión a células transfectadas con DLL4 humanas en un ensayo de unión FACS (Figura 15). Cuando se comparó con 21M18, hubo una pérdida de aproximadamente 3 veces en la actividad de unión de DLL4 debido a la pérdida de avidéz.

Usando el ensayo de doble direccionamiento como se describió anteriormente, el MBSP mostró la unión tanto a VEGF como DLL4 como se esperaba (Figura 16B). Este ensayo confirmó que las mutaciones biespecíficas efectivamente reunieron cada unidad de unión de una manera heterodimérica y que cada brazo de unión es funcional.

SECUENCIAS

Secuencia Var 1 (13B) (SEQ ID NO:1) (las sustituciones de aminoácidos se muestran en **negrita**)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSNFGTQYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG
 KEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVE**EG**FYPSDIAVEW
 ESNQGPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS**EL**TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

Secuencia Var 1 (13B) - sin CH1 o bisagra (SEQ ID NO:4) (las sustituciones de aminoácidos se muestran en **negrita**)

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
 VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LV**EG**FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS**EL**TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia Var 1 (13B) - solo CH3 (SEQ ID NO:5) (las sustituciones de aminoácidos se muestran en **negrita**)

KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVE**EG**FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG
 SFFLYS**EL**TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia Var 2 (SEQ ID NO:2)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSNFGTQYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG
 KEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVE**EG**FYPSDIAVEW
 ESNQGPENNYKTTTPMLDSDGSFFL**F**SELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

Secuencia Var 2 - sin CH1 o bisagra (SEQ ID NO:6)

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
 VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVE**EG**FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL**F**SELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia Var 2 - solo CH3 (SEQ ID NO:7)

KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVE**EG**FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG
 SFFL**F**SELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia Var3 (13A) (SEQ ID NO:3) (las sustituciones de aminoácidos se muestran en **negrita**)

AS**T**KG**P**SVF**P**LAPCS**R**STSE**S**TAA**L**G**L**CV**K**DY**F**PE**P**VT**V**SW**N**SG**A**L**T**SG**V**H**T**F**P**AV**L**Q**S**SG**L**Y**S**L
 S**S**V**V**T**V**P**S**S**N**FG**T**Q**T**Y**T**C**N**V**D**H**K**P**S**N**T**K**V**D**K**T**V**E**R**K**C**C**V**E**C**P**P**C**P**A**P**P**V**A**G**P**S**V**F**L**F**P**P**K**P**K**D**T**L**
 M**I**S**R**T**P**E**V**T**C**V**V**D**V**S**H**E**D**P**E**V**Q**F**N**W**Y**V**D**G**V**E**V**H**N**A**K**T**K**P**R**E**E**Q**F**N**S**T**F**R**V**V**S**V**L**T**V**V**H**Q**D**W**L**N**G**
 K**E**Y**K**C**K**V**S**N**K**G**L**P**A**P**I**E**K**T**I**S**K**T**K**G**Q**P**R**E**P**Q**V**Y**T**L**P**P**S**R**E****K**M**T**K**N**Q**V**S**L**T**C**L**V**K**G**F**Y**P**S**D**I**A**V**E**W**
 E**S**N**G**Q**P**E**N**N**Y**K**T**T**P**P**M**L**K**S**D**G**S**F**F**L**Y**S**K**L**T**V**D**K**S**R**W**Q**Q**G**N**V**F**S**C**S**V**M**H**E**A**L**H**N**H**Y**T**Q**K**S**L**S**L**S**P**G
 K

Secuencia Var3 (13A) - sin CH1 o bisagra (SEQ ID NO:8) (las sustituciones de aminoácidos se muestran en negrita)

P**S**V**F**L**F**P**P**K**P**K**D**T**L**M**I**S**R**T**P**E**V**T**C**V**V**D**V**S**H**E**D**P**E**V**Q**F**N**W**Y**V**D**G**V**E**V**H**N**A**K**T**K**P**R**E**E**Q**F**N**S**T**F**R**V**
 V**S**V**L**T**V**V**H**Q**D**W**L**N**G**K**E**Y**K**C**K**V**S**N**K**G**L**P**A**P**I**E**K**T**I**S**K**T**K**G**Q**P**R**E**P**Q**V**Y**T**L**P**P**S**R**E****K**M**T**K**N**Q**V**S**L**T**C**
 L**V**K**G**F**Y**P**S**D**I**A**V**E**W**E**S**N**G**Q**P**E**N**N**Y**K**T**T**P**P**M**L**K**S**D**G**S**F**F**L**Y**S**K**L**T**V**D**K**S**R**W**Q**Q**G**N**V**F**S**C**S**V**M**H**E**A**L
 H**N**H**Y**T**Q**K**S**L**S**L**S**P**G**K

5

Secuencia Var3 (13A) - solo CH3 (SEQ ID NO:9) (las sustituciones de aminoácidos se muestran en negrita)

K**T**K**G**Q**P**R**E**P**Q**V**Y**T**L**P**P**S**R**E**K**M**T**K**N**Q**V**S**L**T**C**L**V**K**G**F**Y**P**S**D**I**A**V**E**W**E**S**N**G**Q**P**E**N**N**Y**K**T**T**P**P**M**L**K**S**D**G
 S**F**F**L**Y**S**K**L**T**V**D**K**S**R**W**Q**Q**G**N**V**F**S**C**S**V**M**H**E**A**L**H**N**H**Y**T**Q**K**S**L**S**L**S**P**G**K

10

219R0302/0202 VH Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:10)

Q**V**Q**L**K**Q**S**G**A**E**L**V**K**P**G**A**S**V**K**L**S**C**K**A**S**G**Y**T**F**T**N**Y**W**M**H**W**V**K**L**R**P**G**Q**G**F**E**W**I**G**D**I**N**P**S**N**G**G**T**S**Y**N**E**K**F**K
 R**K**A**T**L**T**V**D**K**S**S**T**A**Y**M**Q**L**S**S**L**T**S**E**D**S**A**V**Y**Y**C**T**I**H**Y**D**N**S**Y**A**M**D**Y**W**G**Q**G**T**S**V**T**V**S**S**A**S**T**

15

219R0302/0202 HC Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:11)

Q**V**Q**L**K**Q**S**G**A**E**L**V**K**P**G**A**S**V**K**L**S**C**K**A**S**G**Y**T**F**T**N**Y**W**M**H**W**V**K**L**R**P**G**Q**G**F**E**W**I**G**D**I**N**P**S**N**G**G**T**S**Y**N**E**K**F**K
 R**K**A**T**L**T**V**D**K**S**S**T**A**Y**M**Q**L**S**S**L**T**S**E**D**S**A**V**Y**Y**C**T**I**H**Y**D**N**S**Y**A**M**D**Y**W**G**Q**G**T**S**V**T**V**S**S**A**S**T**K**G**P**S**V**F**P
 L**A**P**C**S**R**S**T**S**E**S**T**A**A**L**G**L**V**K**D**Y**F**PE**P**VT**V**SW**N**SG**A**L**T**SG**V**H**T**F**P**AV**L**Q**S**SG**L**Y**S**L**S**S**V**T**V**P**S**S**N**
 F**G**T**Q**T**Y**T**C**N**V**D**H**K**P**S**N**T**K**V**D**K**T**V**E**R**K**C**C**V**E**C**P**P**C**P**A**P**P**V**A**G**P**S**V**F**L**F**P**P**K**P**K**D**T**L**M**I**S**R**T**P**E**V**T**C
 V**V**D**V**S**H**E**D**P**E**V**Q**F**N**W**Y**V**D**G**V**E**V**H**N**A**K**T**K**P**R**E**E**Q**F**N**S**T**F**R**V**V**S**V**L**T**V**V**H**Q**D**W**L**N**G**K**E**Y**K**C**K**V**S**N**K**

G**L**P**A**P**I**E**K**T**I**S**K**T**K**G**Q**P**R**E**P**Q**V**Y**T**L**P**P**S**R**E**E**M**T**K**N**Q**V**S**L**T**C**L**V**K**G**F**Y**P**S**D**I**A**V**E**W**E**S**N**G**Q**P**E**N**N**Y
 K**T**T**P**P**M**L**D**S**D**G**S**F**F**L**Y**S**K**L**T**V**D**K**S**R**W**Q**Q**G**N**V**F**S**C**S**V**M**H**E**A**L**H**N**H**Y**T**Q**K**S**L**S**L**S**P**G**K**

20

219R0302/0202 HC Secuencia de ADN (SEQ ID NO:12)

C**A**G**G**T**G**C**A**A**T**T**G**A**A**G**C**A**G**T**C**T**G**G**G**G**C**T**G**A**A**C**T**G**G**T**G**A**A**G**C**C**T**G**G**G**G**C**T**T**C**A**G**T**G**A**A**G**T**T**G**T**C**C**T**G
 C**A**A**G**G**C**T**T**C**T**G**G**C**T**A**C**A**C**T**T**C**A**C**C**A**A**C**T**A**C**T**G**G**A**T**G**C**A**C**T**G**G**G**T**G**A**A**G**C**T**G**A**G**G**C**C**T**G**G**A**C**A**G
 G**C**T**T**T**G**A**G**T**G**G**A**T**T**G**G**A**G**A**T**A**T**T**A**A**T**C**C**C**A**G**C**A**A**T**G**G**T**G**G**T**A**C**T**A**G**C**T**A**C**A**A**T**G**A**A**G**T**T**C**A**A**G
 A**G**A**A**A**G**G**C**C**A**C**A**C**T**G**A**C**T**G**T**A**G**A**C**A**A**A**T**C**C**T**C**C**A**G**C**A**C**A**G**C**C**T**A**C**A**T**G**C**A**A**C**T**C**A**G**C**A**G**C**C**T**G**A**C
 A**T**C**T**G**A**G**G**A**C**T**C**T**G**C**G**G**T**C**T**A**T**T**A**C**T**G**T**A**C**A**A**T**A**C**A**C**T**A**C**T**A**T**G**A**T**A**A**T**T**C**C**T**A**T**G**C**T**A**T**G**G**A**C**T
 A**C**T**G**G**G**G**T**C**A**A**G**G**A**C**C**T**C**A**G**T**C**A**C**C**G**T**C**A**G**C**T**C**A**G**C**C**A**G**C**A**C**A**A**A**G**G**G**C**C**C**T**A**G**C**G**T**C**T**T**C**C**C**T**
 C**T**G**G**C**T**C**C**C**T**G**C**A**G**C**A**G**G**A**C**C**A**G**C**G**A**G**A**C**A**G**C**C**C**C**T**G**G**G**C**T**G**C**T**G**G**T**C**A**A**G**G**A**C**T**A**
 C**T**T**C**C**C**C**G**A**A**C**C**G**T**G**A**C**G**G**T**G**T**C**G**T**G**A**A**C**T**C**A**G**G**C**G**C**T**C**T**G**A**C**C**A**G**C**G**G**C**G**T**G**C**A**C**A**C**C**T**T**C**C
 C**A**G**C**T**G**T**C**T**A**C**A**G**T**C**C**T**C**A**G**G**A**C**T**A**C**T**C**C**C**T**C**A**G**C**A**G**C**G**T**G**G**T**G**A**C**C**G**T**G**C**C**C**T**C**C**A**G**C**A**A**C**
 T**T**C**G**G**C**A**C**C**C**A**G**A**C**T**A**C**A**C**T**G**C**A**A**C**G**T**A**G**A**T**C**A**C**A**A**G**C**C**C**A**G**C**A**A**C**A**C**A**A**G**G**T**G**G**A**C**A**A**G**A**C**
 A**G**T**T**G**A**G**C**G**C**A**A**A**T**G**T**T**G**T**G**T**C**G**A**G**T**G**C**C**C**A**C**C**G**T**G**C**C**A**G**C**A**C**C**A**C**C**T**G**T**G**G**C**A**G**G**A**C**C**G**T**C**A**G**
 T**C**T**T**C**C**T**C**T**T**C**C**C**C**C**A**A**A**A**C**C**A**A**G**A**C**A**C**C**T**A**T**G**A**T**T**C**C**C**G**A**C**C**C**T**G**A**G**G**T**A**C**G**T**C**A**C**G**T**G**C
 G**T**G**T**G**G**T**G**G**A**C**T**G**A**G**C**A**C**G**A**A**G**C**C**C**A**G**G**T**C**C**A**G**T**T**C**A**A**C**T**G**G**T**A**C**T**A**C**T**G**G**A**C**G**G**C**G**T**G**G**A
 G**G**T**G**C**A**T**A**A**T**G**C**C**A**A**G**A**C**A**A**A**G**C**C**A**C**G**G**G**A**G**G**A**G**C**A**G**T**T**C**A**A**C**A**G**C**A**C**G**T**T**C**C**G**T**G**T**G**G**T**C**A**G**C**G
 T**C**T**C**A**C**C**G**T**T**G**T**G**C**A**C**A**G**G**A**C**T**G**G**C**T**G**A**A**C**G**G**C**A**A**G**G**A**G**T**A**C**A**A**G**T**G**C**A**A**G**G**T**C**T**C**A**A**C**A**A
 G**G**C**C**T**C**C**A**G**C**C**C**C**A**T**C**G**A**G**A**A**A**C**C**A**T**C**T**C**C**A**A**A**A**C**C**A**A**A**G**G**G**C**A**G**C**C**C**C**G**A**A**C**C**A**C**A**G**G**T**
 G**T**A**C**A**C**C**T**G**C**C**C**C**A**T**C**C**C**G**G**A**G**A**G**A**T**G**A**C**C**A**A**G**A**C**C**A**G**G**T**C**A**G**C**C**T**G**A**C**C**T**G**A**C**C**T**G**C**T**G**G**T**C**A**
 A**A**G**G**C**T**T**C**T**A**C**C**C**A**G**C**G**A**C**A**T**C**G**C**C**G**T**G**G**A**G**T**G**G**G**A**G**A**G**C**A**A**T**G**G**G**C**A**G**C**C**G**G**A**A**C**A**A**C**T**A**C**
 A**A**G**A**C**C**A**C**A**C**T**C**C**C**A**T**G**T**G**G**A**C**T**C**C**A**C**G**G**C**T**C**C**T**T**C**T**T**C**C**T**C**T**A**C**A**G**C**A**A**G**C**T**C**A**C**C**G**T**G**G**A**
 C**A**A**G**A**G**C**A**G**G**T**G**G**C**A**G**C**A**G**G**G**G**A**A**C**G**T**C**T**T**C**T**A**T**G**T**C**C**G**T**A**T**G**C**A**T**G**A**G**G**C**T**C**T**G**C**A**A**C**C**
 A**C**T**A**C**A**C**G**C**A**A**G**A**G**C**C**T**C**T**C**C**T**G**T**C**T**C**C**G**G**G**T**A**A**

219R0302 LC Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:13)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYVNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQTVPSRFSGR
 GSGTHFTFTISSLQPEDLATYYCQQYDDLPTFGRGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

219R0302 LC Secuencia de ADN (SEQ ID NO:14)

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGTCATCTGTCGGAGACAGAGTCACCATCAC
 TTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATGTAAATTGGTATCAACAAAAACCAGGGAAAGCCC
 CTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAACCTGCAAACAGGGGTCATCAAGGTTGAGTGAAGG
 GGATCTGGGACACATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATCTGGCAACATATTA
 CTGTCAACAATATGATGATCTTCCCTCCACTTTTGGCAGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTA
 CGGTGGCTGCACCATCTGCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC
 TCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA
 CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA

GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

10

219R0202 LC Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:15)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINNHLAWYQQKPGKVPKSLIYAASNLHSGVPSKFSGS
 GSGTHFTLI ISSLQPEDLATYYCQQYDNLPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

219R0202 LC Secuencia de ADN (SEQ ID NO:16)

GATATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCACTGCTGTCATCTGTCGGAGACAGAGTCACCATCAC
 TTGTCCGGGCGAGTCAGGGCATCAATAATCATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCC
 CTAAGTCCCTCATATATGCTGCATCCAATCTCCATAGTGGCGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGT
 GGATCTGGGACACACTTCACTCTCATCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTA
 CTGTCAACAGTATGATAATCTCCCCCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTA
 CGGTGGCTGCACCATCTGCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC
 TCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA
 CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
 GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

20

219R0202_SG (Var3/13A) Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:17) (la secuencia conectora está **subrayada en negrita**) (las sustituciones de 13A se muestran en **negrita**)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINNHLAWYQQKPGKVPKSLIYAASNLHSGVPSKFSGS
 GSGTHFTLI ISSLQPEDLATYYCQQYDNLPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC **GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**QVQLKQSGAELVKPG
 ASVKLSCKASGYFTFTNYWMHWKLRPGQGFIEWIGDINPSNGGTSYNEKFKRKATLTVDKSSSTAY
 MQLSSLTSEDSAVYYCTIHYYDNSYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTÝTCNVDHKPS
 NTKVDKTVRKKCCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKG
 QPREPQVÝTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLKSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25

219R0302_SG (Var3/13A) Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:18) (la secuencia conectora está **subrayada en negrita**) (las sustituciones de 13A se muestran en **negrita**)

ES 2 708 124 T3

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCQASQDISNYVNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQTVPSRFSGR
GSGTHFTFTISSLQPEDLATYYCQQYDDLPTFGRGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
ASVKLSCKASGYFTFTNYWMHWKLRPGQGFIEWIGDINPSNGGTSYNEKFKRKATLTVDKSSSTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCTIHYDNSYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPS
NTKVDKTKVERKCCVECPPEAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSRREKMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLKSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK

21M18_SG (Var1/13B) Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:19) (la secuencia conectora está subrayada en
negrita) (las sustituciones de 13B se muestran en negrita)

5 DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSVDPDR
FSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
KPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVFTTDTST
TAYMELRLSRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPK
PSNTKVDKTKVERKCCVECPPEAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
KQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLLSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK

21R0302/0202 CDR1 de cadena pesada (SEQ ID NO:20)
GYTFTNYWMH

10 21R0302/0202 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:21)
SINPSNGGTSYNEKFKR

15 21R0302/0202 CDR3 de cadena pesada (SEQ ID NO:22)
HYDNSYAMDY

21R0302 CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO:23)
QASQDISNYVN

20 21R0302 CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO:24)
DASNLQT

25 21R0302 CDR3 de cadena ligera (SEQ ID NO:25)
QQYDDLPP

21R0202 CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO:26)
RASQGINNHLAW

30 21R0202 CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO:27)
AASNLS

21R0202 CDR3 de cadena ligera (SEQ ID NO:28)
QQYDNLPL

35 21R0302 VL Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:29)

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCQASQDISNYVNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQTVPSRFSGR
GSGTHFTFTISSLQPEDLATYYCQQYDDLPTFGRGKLEIKRT

40 21R0202 VL Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:30)

ES 2 708 124 T3

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINNHLAWYQOKPGKVPKSLIYAASNLSGVPSKFSGS
GSGTHFTLISSLPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGTKVEIKRT

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un procedimiento para preparar un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a VEGF y DLL4, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer y un segundo polipéptido de inmunoglobulina que contiene el dominio CH3, comprendiendo el procedimiento sustituir al menos un aminoácido dentro del dominio CH3 del primer polipéptido de inmunoglobulina y sustituir al menos un aminoácido dentro del dominio CH3 del segundo polipéptido de inmunoglobulina para promover la formación de un anticuerpo biespecífico, en el que el anticuerpo biespecífico se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 (a) una IgG1 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 253 y 292 de la SEQ ID NO:32 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 240 y 282 de la SEQ ID NO:32 se reemplazan con lisina;
- 15 (b) una IgG2 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 249 y 288 de la SEQ ID NO:33 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 236 y 278 de SEQ ID NO:33 se reemplazan con lisina;
- 20 (c) una IgG3 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 300 y 339 de la SEQ ID NO:34 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 287 y 329 de SEQ ID NO:34 se reemplazan con lisina; y
- 25 (d) una IgG4 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 250 y 289 de la SEQ ID NO:35 se reemplazan con glutamato o aspartato, y en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 237 y 279 de SEQ ID NO:35 se reemplazan con lisina,
- 30 en el que el primer polipéptido que contiene el dominio CH3 comprende un primer polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un primer polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina, y el segundo polipéptido que contiene el dominio CH3 comprende un segundo polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un segundo polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina; y
- 35 en el que el primer polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina y el segundo polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina son idénticos en secuencia de aminoácidos.
- 2.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo biespecífico comprende una IgG2 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 249 y 288 de la SEQ ID NO:33 son glutamato, y en donde los aminoácidos en las posiciones en el el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondiente a las posiciones 236 y 278 de la SEQ ID NO:33 es lisina.
- 40 **3.** El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo biespecífico comprende una primera secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:7; y una segunda secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.
- 45 **4.** Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a VEGF y DLL4, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer y un segundo polipéptido de inmunoglobulina que contiene el dominio CH3, en el que el anticuerpo biespecífico se selecciona del grupo que consiste en:
- 50 (a) una IgG1 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 253 y 292 de la SEQ ID NO:32 se reemplazan con glutamato o aspartato, y
- 55 en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 240 y 282 de la SEQ ID NO:32 se reemplazan con lisina;
- (b) una IgG2 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 249 y 288 de la SEQ ID NO:33 se reemplazan con glutamato o aspartato, y
- 60 en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 236 y 278 de la SEQ ID NO:33 se reemplazan con lisina;
- (c) una IgG3 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 300 y 339 de la SEQ ID NO:34 se reemplazan con glutamato o aspartato, y
- 65 en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 287 y 329 de la SEQ ID NO:34 se reemplazan con lisina; y

- (d) una IgG4 humana, en la que los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 250 y 289 de la SEQ ID NO:35 se reemplazan con glutamato o aspartato, y
- 5 en la que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 237 y 279 de la SEQ ID NO:35 se reemplazan con lisina,
- 10 en el que el primer polipéptido que contiene el dominio CH3 comprende un primer polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un primer polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina, y el segundo polipéptido que contiene el dominio CH3 comprende un segundo polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina que se une específicamente a un segundo polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina; y
- 15 en el que el primer polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina y el segundo polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina son idénticos en secuencia de aminoácidos.
- 20 **5.** El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 4, que comprende una IgG2 humana, en donde los aminoácidos en las posiciones en el primer polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 249 y 288 de la SEQ ID NO:33 son glutamato, y
- 25 en el que los aminoácidos en las posiciones en el segundo polipéptido de inmunoglobulina correspondientes a las posiciones 236 y 278 de la SEQ ID NO:33 son lisina.
- 6.** Un anticuerpo biespecífico de la reivindicación 4, que comprende una primera secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7; y una segunda secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9.
- 30 **7.** El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
- 8.** Un anticuerpo biespecífico que comprende un primer polipéptido de inmunoglobulina que contiene el dominio CH3 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:7, y un segundo polipéptido de inmunoglobulina que contiene el dominio CH3 que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9.
- 9.** Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 4-8.
- 35 **10.** Una célula huésped que comprende un polinucleótido de la reivindicación 9.
- 11.** Un procedimiento para preparar un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 en condiciones que dan como resultado la expresión del anticuerpo o polipéptido.
- 40 **12.** El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 4-8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 13.** Uso del anticuerpo de las reivindicaciones 4-8 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 45 **14.** El anticuerpo para el uso de la reivindicación 12, o el uso de la reivindicación 13, en el que el tratamiento del cáncer comprende un segundo agente terapéutico o múltiples agentes terapéuticos.
- 15.** El anticuerpo para el uso de la reivindicación 14, en el que el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

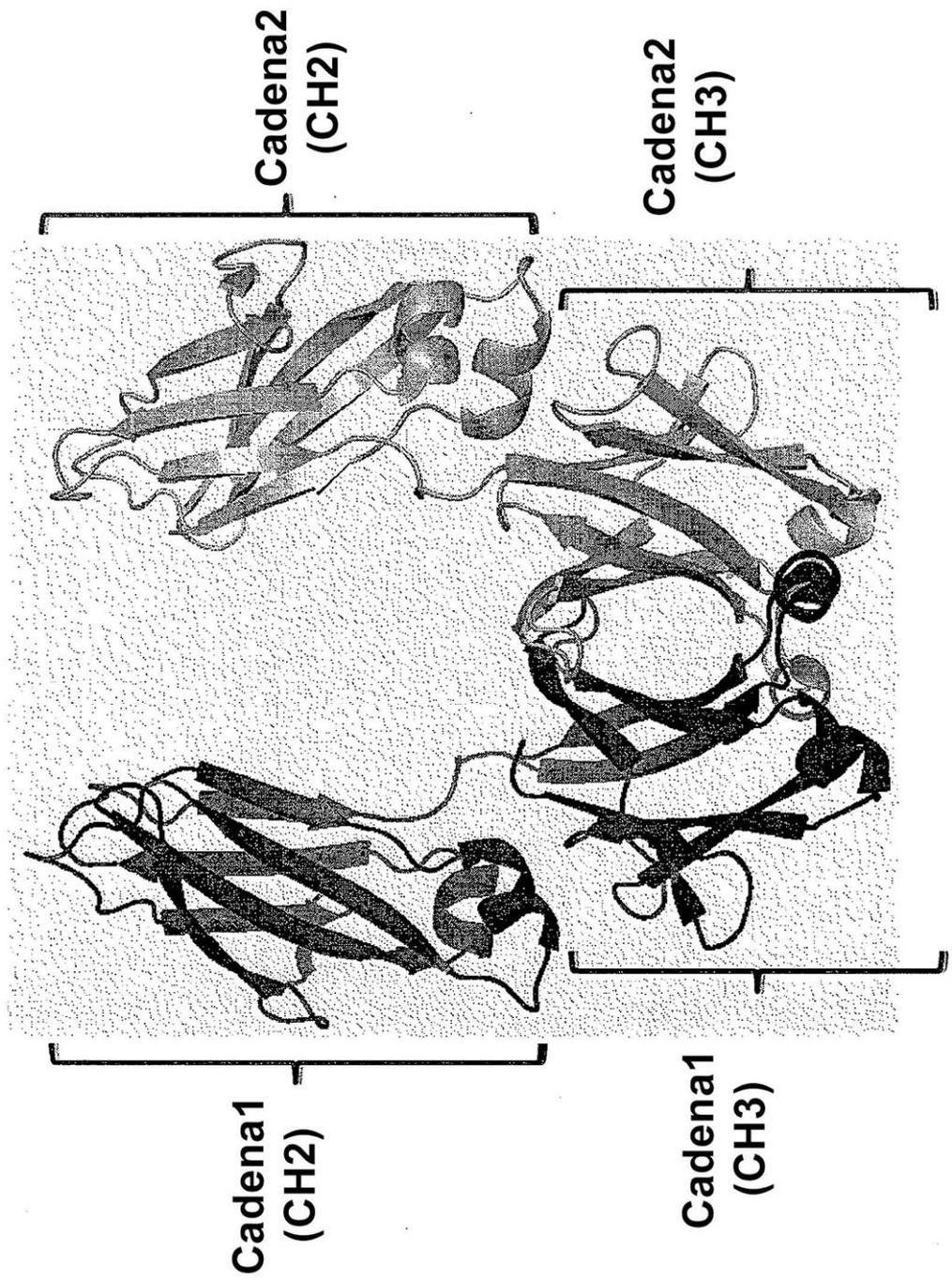


Figura 1

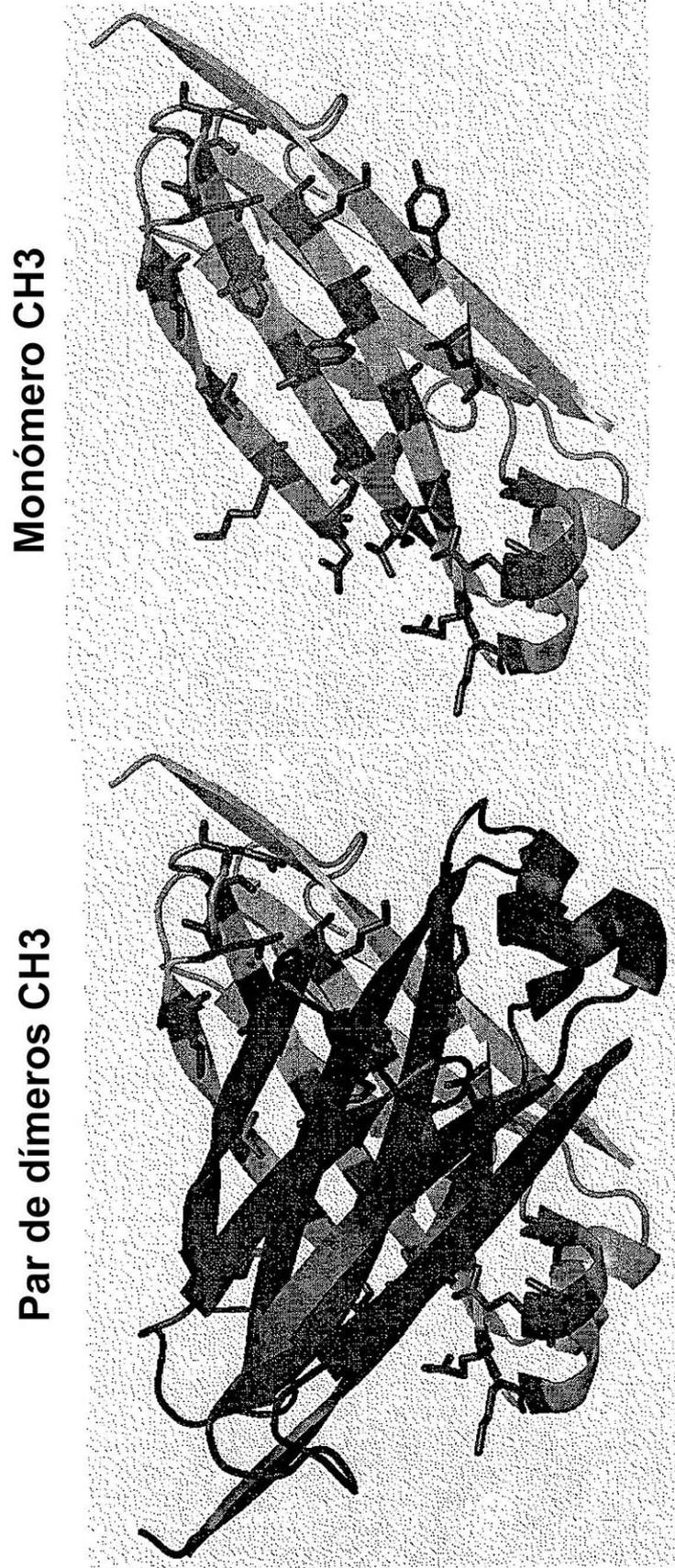


Figura 2

Figura 3

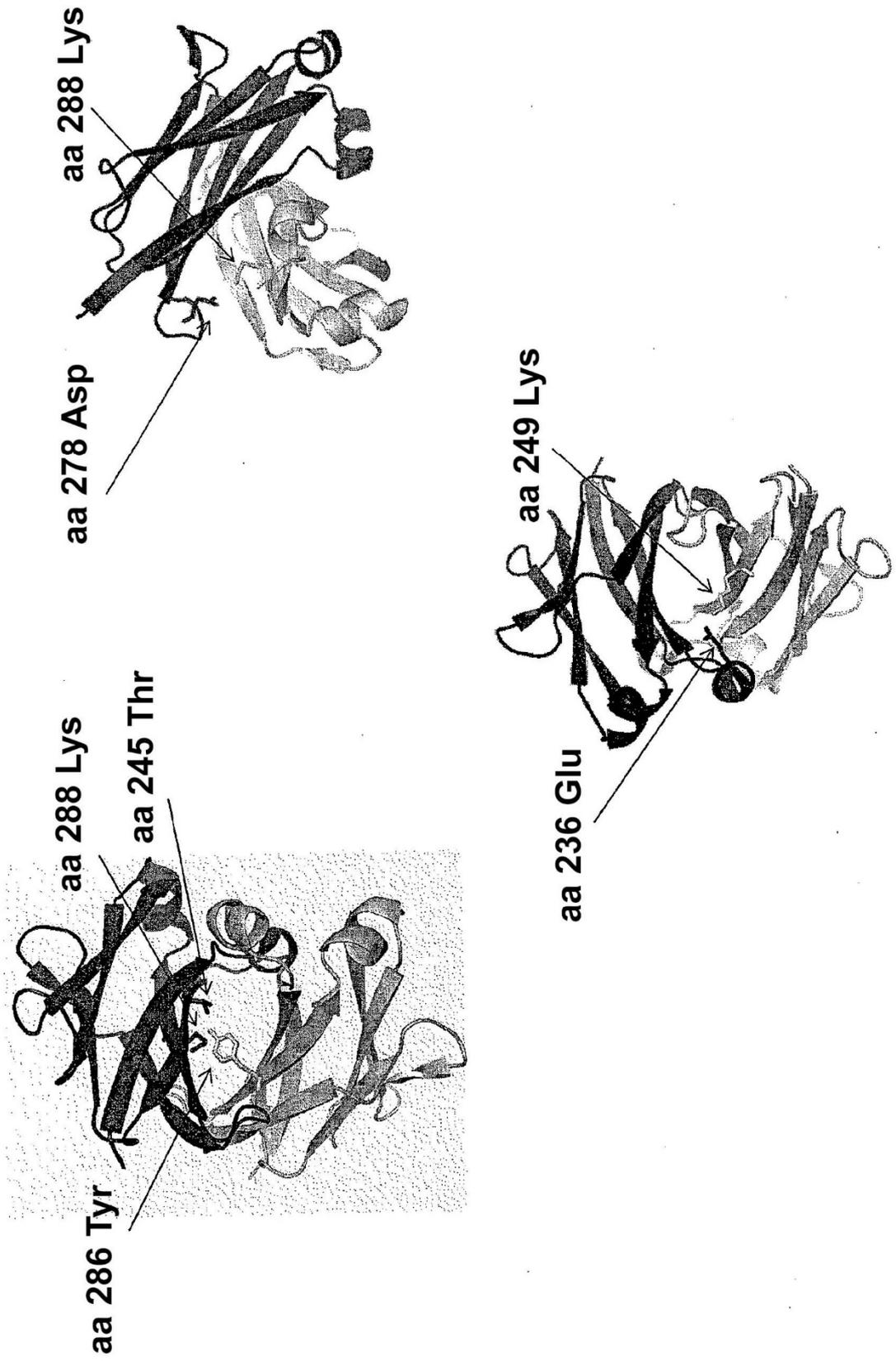


Figura 4

CH1

I GHG1 HUMANA 1 ASTKGPSVFPLAPSSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 I GHG2 HUMANA 1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 I GHG3 HUMANA 1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 I GHG4 HUMANA 1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

bisagra

I GHG1 HUMANA 61 GLVSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKVE
 I GHG2 HUMANA 61 GLVSLSSVTVTPSSNEGTQTYTCNVDDHKPSNTKVDKTVR
 I GHG3 HUMANA 61 GLVSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVELKTPLDGDTHTTCPCPCPEPKSC
 I GHG4 HUMANA 61 GLVSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVDDHKPSNTKVDKRVES

CH2

I GHG1 HUMANA 100 PKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKPKDT
 I GHG2 HUMANA 101 ---KCCVECPCCPAPPEVAGPSVFLFPPPKPKDT
 I GHG3 HUMANA 121 DTPPCPCPCPEPKSCDTPPCPCPCPEPKSCDTPPCPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKPKDT
 I GHG4 HUMANA 101 ---KYGPPCPCPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKPKDT

I GHG1 HUMANA 134 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTRVVSVLTVLLH
 I GHG2 HUMANA 130 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTRVVSVLTVWH
 I GHG3 HUMANA 181 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTRVVSVLTVLR
 I GHG4 HUMANA 131 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTRVVSVLTVLLH

CH3

I GHG1 HUMANA 194 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 I GHG2 HUMANA 190 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 I GHG3 HUMANA 241 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 I GHG4 HUMANA 191 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISRAKQPREPOVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK

I GHG1 HUMANA 254 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 I GHG2 HUMANA 250 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
 I GHG3 HUMANA 301 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
 I GHG4 HUMANA 251 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE

I GHG1 HUMANA 314 ALHNHYTQKSLSLSPGK
 I GHG2 HUMANA 310 ALHNHYTQKSLSLSPGK
 I GHG3 HUMANA 361 ALHNREYTKSLSLSPGK

Figura 5

Determinar el tamaño de las variantes de anticuerpo producidas. La proteína heterodimérica tiene masa molecular intermedia.

Coexpresar vectores de expresión que codifican variantes de anticuerpos de diferente tamaño

longitud total mini-cuerpo

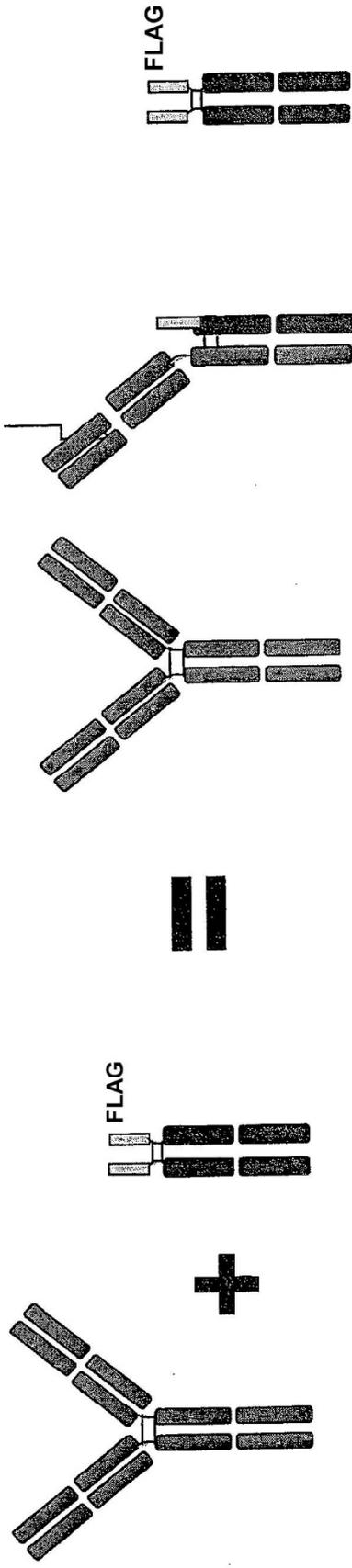


Figura 6

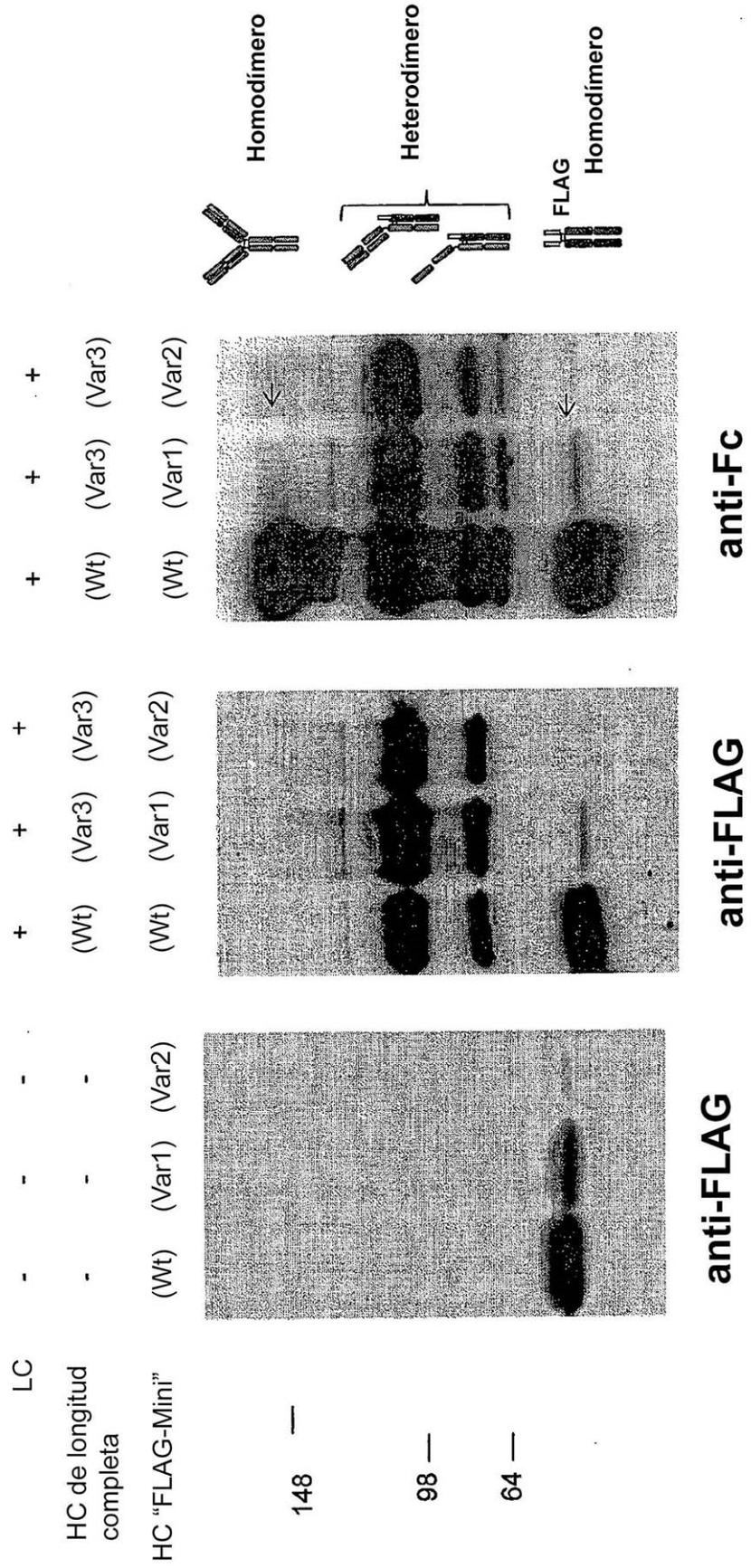


Figura 7

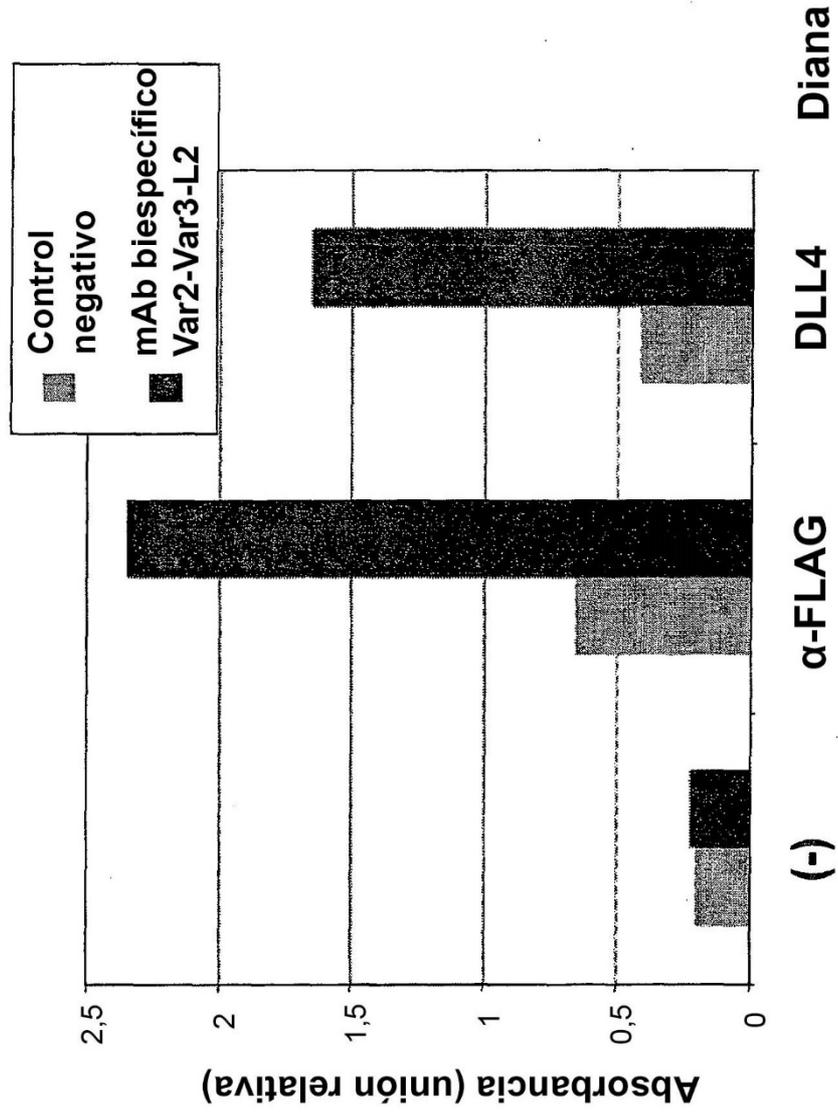


Figura 8

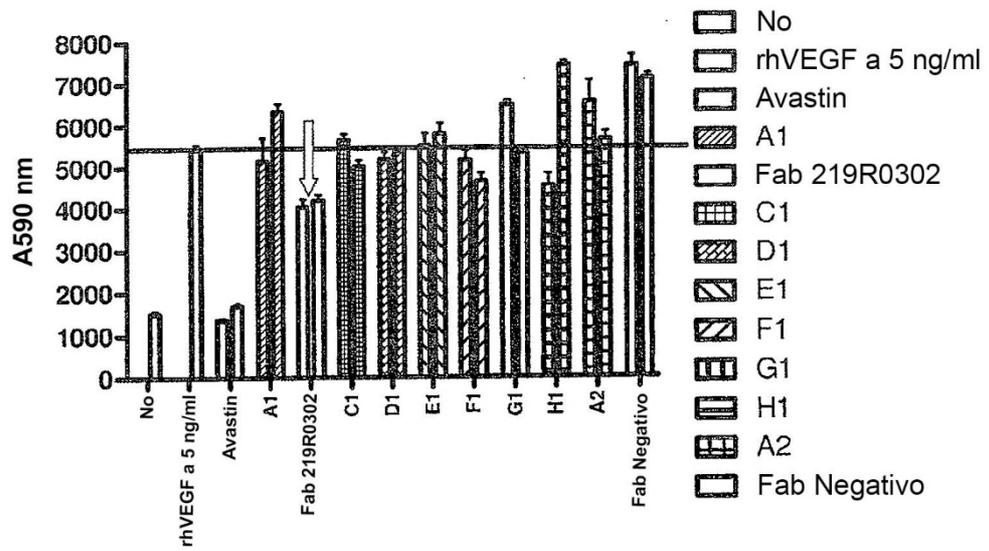


Figura 9

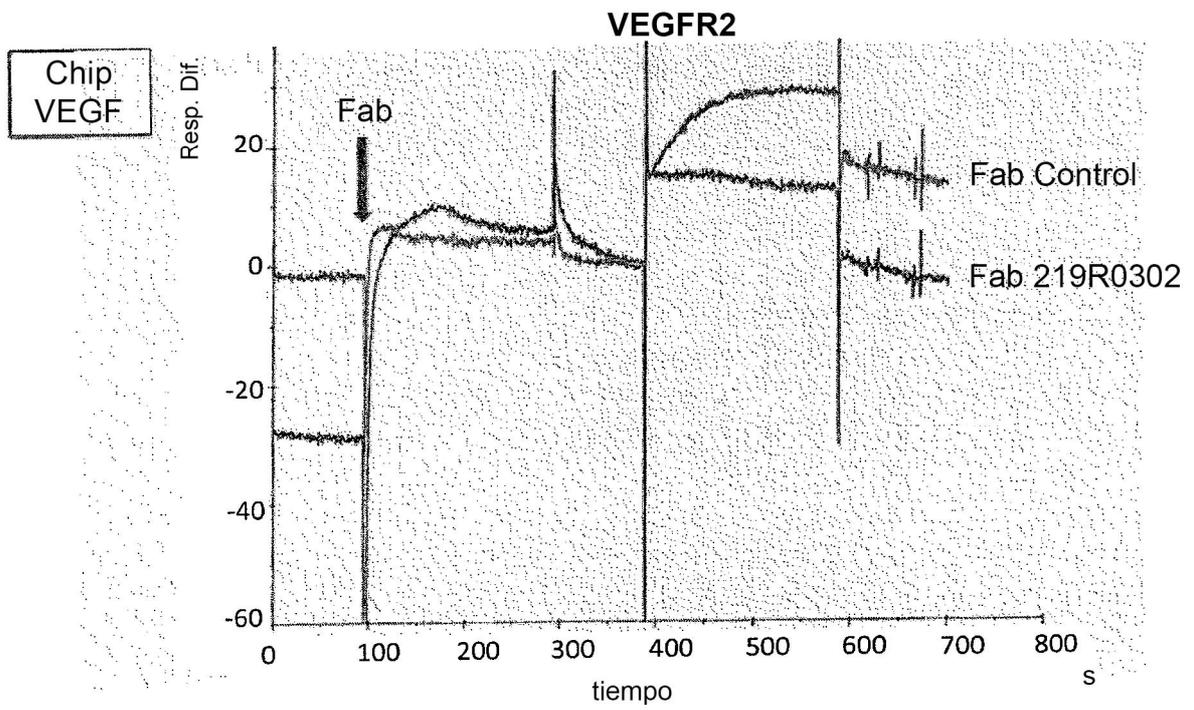


Figura 10

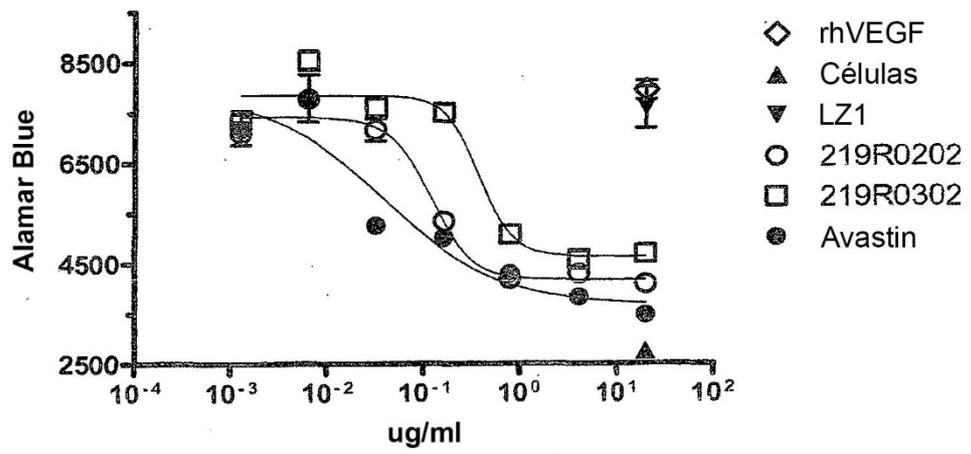


Figura 11

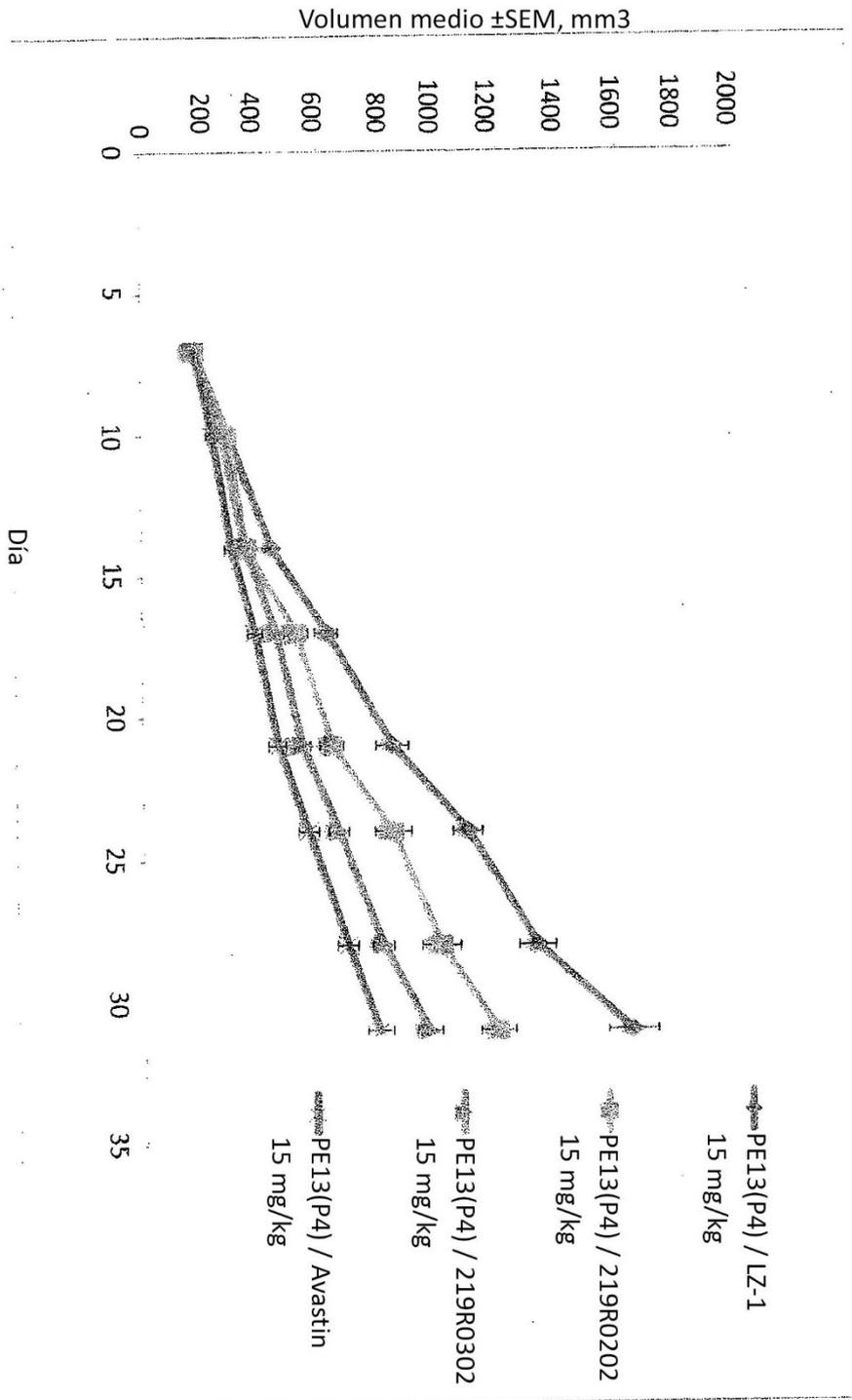


Figura 12

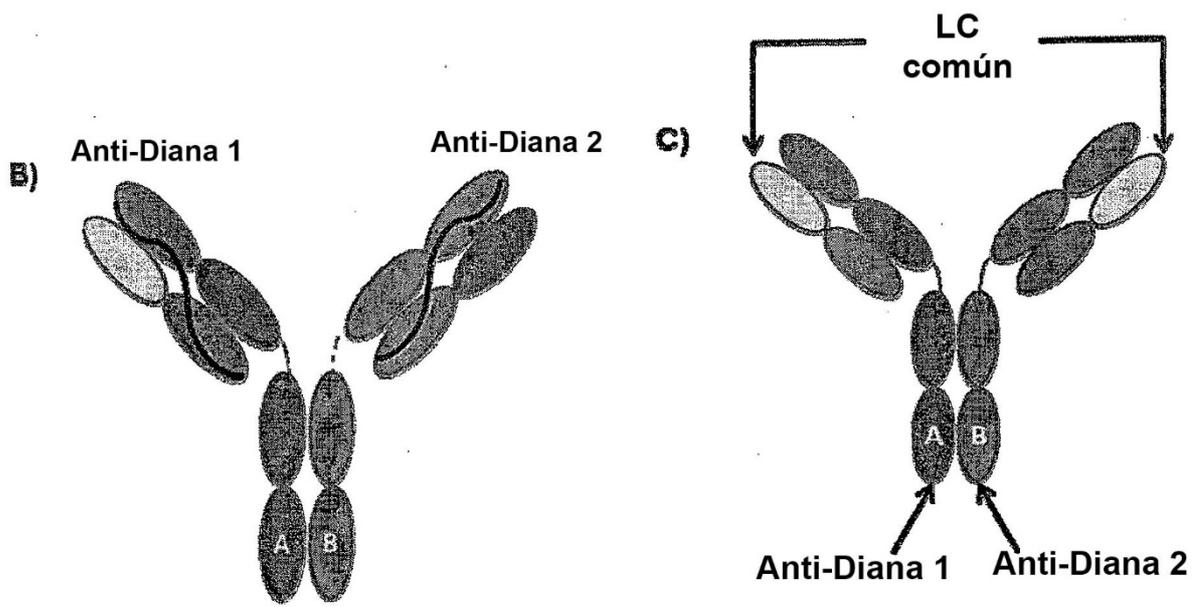


Figura 13

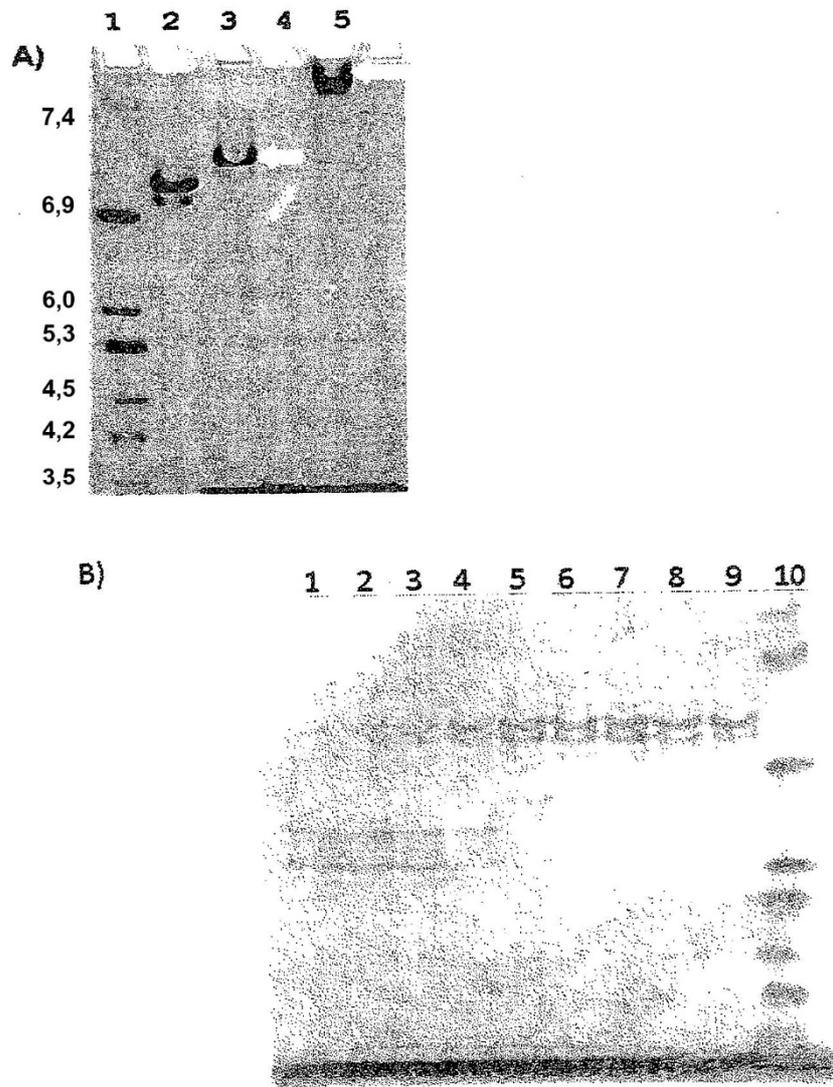


Figura 14

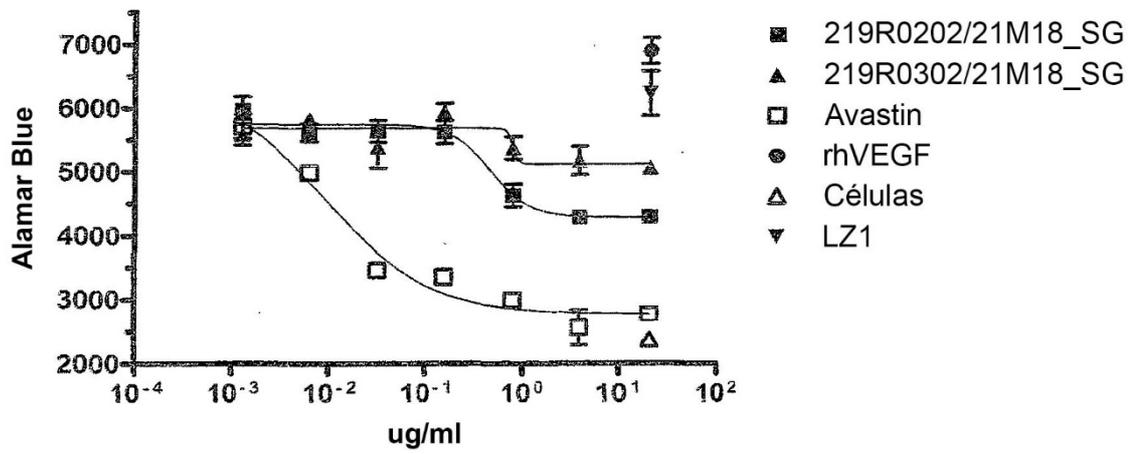


Figura 15

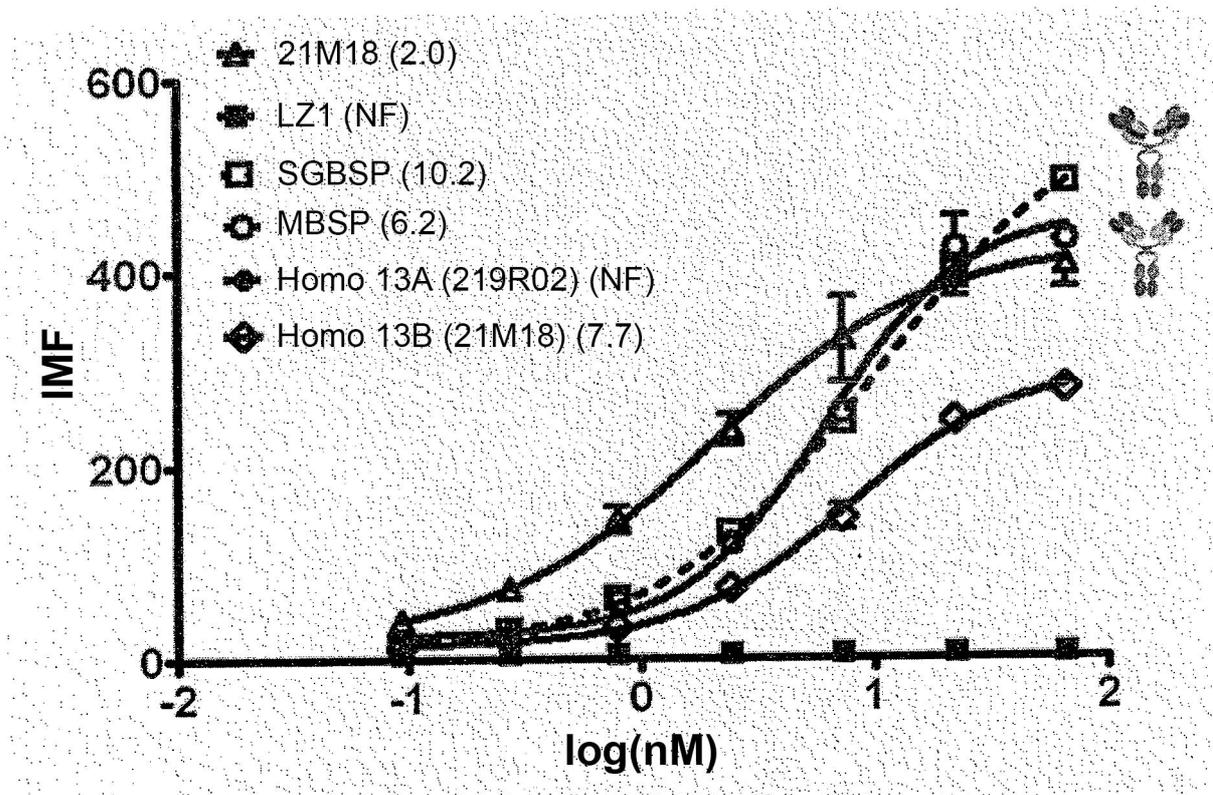


Figura 16

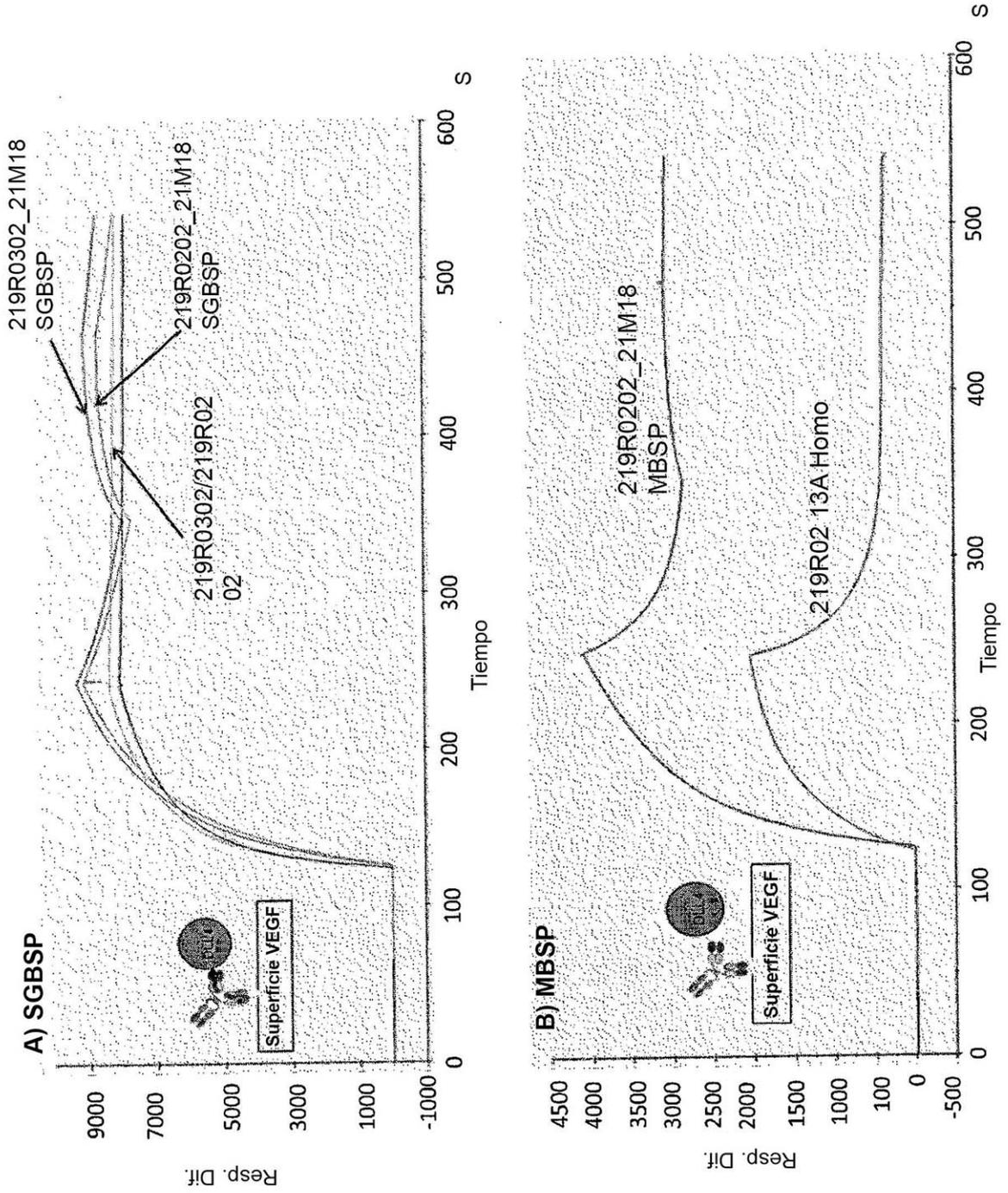


Figura 17

