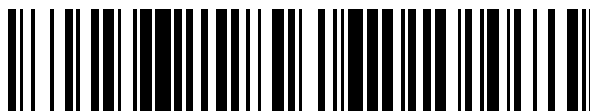


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 749**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015 PCT/EP2015/057165**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015 E 15741892 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3126395**

54 Título: **Anticuerpos multiespecíficos**

30 Prioridad:

02.04.2014 EP 14163165

30.07.2014 EP 14179034

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

11.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHAEFER, WOLFGANG;
KLEIN, CHRISTIAN;
IMHOF-JUNG, SABINE;
KLOSTERMANN, STEFAN;
MOLHOJ, MICHAEL y
REGULA, JOERG THOMAS**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 747 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos multiespecíficos

5 La presente invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos novedosos, su fabricación y uso.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas genomanipuladas, tal como los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos que se pueden unir a dos o más antígenos, son conocidos en la técnica. Dichas proteínas de unión multiespecíficas se pueden generar usando fusión de células, conjugación química o técnicas de ADN recombinante.

15 Se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos multiespecíficos recombinantes en el pasado reciente, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos tetravalentes por fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpos IgG y dominios monocatenarios (véase, por ejemplo, Coloma, M.J., *et al.*, Nature Biotech. 15 (1997) 159-163; el documento WO 2001/077342; y Morrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234).

20 También se han desarrollado otros varios formatos nuevos en los que la estructura del núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) ya no se conserva, tal como dia, tria o tetracuerpos, minicuerpos, varios formatos monocatenarios (scFv, Bis-scFv), que se pueden unir a dos o más antígenos (Holliger, P., *et al.*, Nature Biotech. 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., y Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., *et al.*, J. Immunol. Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., *et al.*, Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297).

25 Todos estos formatos usan conectores bien para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a otra proteína de unión (por ejemplo, scFv) o para fusionar, por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv (Fischer, N., y Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). Si bien es obvio que los conectores tienen ventajas para la genomanipulación de anticuerpos biespecíficos, también pueden causar problemas en los entornos terapéuticos. De hecho, estos péptidos exógenos podrían provocar una respuesta inmunitaria contra el propio conector o el punto de unión entre la proteína y el conector. Además, la naturaleza flexible de estos péptidos los hace más propensos a la escisión proteolítica, que potencialmente da lugar a una estabilidad de anticuerpos deficiente, agregación y una inmunogenicidad incrementada. Además, se puede desear conservar funciones efectoras, tales como, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), que están mediadas a través de la parte Fc, manteniendo un alto grado de similitud con los anticuerpos naturales.

35 Por tanto, idealmente, se debería tener como objetivo desarrollar anticuerpos biespecíficos que sean muy similares en estructura general a los anticuerpos naturales (como IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) con una desviación mínima de las secuencias humanas.

40 En un enfoque, se han producido anticuerpos biespecíficos que son muy similares a los anticuerpos naturales usando la tecnología de cuadros (véase Milstein, C., y Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540) basada en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes que expresan anticuerpos monoclonales murinos con las especificidades deseadas del anticuerpo biespecífico. Debido al emparejamiento aleatorio de dos cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos diferentes dentro de la línea celular de hibridoma-híbrido (o quadroma) resultante, se generan hasta diez especies diferentes de anticuerpos, de las que solo una es el anticuerpo biespecífico funcional deseado. Debido a la presencia de subproductos emparejados incorrectamente y la reducción significativa de los rendimientos de producción, se requieren procedimientos de purificación sofisticados (véase, por ejemplo, Morrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234). En general, se mantiene el mismo problema de subproductos emparejados incorrectamente si se usan técnicas de expresión recombinante.

50 Un enfoque para eludir el problema de subproductos emparejados incorrectamente, que se conoce como "botones en ojales", tiene como objetivo forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpo diferentes introduciendo mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfase de contacto. En una cadena se reemplazaron aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "ojal". A la inversa, se introducen aminoácidos con cadenas laterales grandes en el otro dominio CH3, para crear un "botón". Al coexpresar estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que tienen que ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se observaron rendimientos altos de formación de heterodímero ("botón-ojal") frente a la formación de homodímero ("ojal-ojal" o "botón-botón") (Ridgway, J.B., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y documento WO 96/027011). El porcentaje de heterodímero se podría incrementar adicionalmente remodelando las superficies de interacción de los dos dominios CH3 usando un enfoque de presentación en fagos y la introducción de un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35). Se describen nuevos enfoques para la tecnología de botones en ojales, por ejemplo, en el documento EP 1 870 459 A1. Aunque este formato parece muy atractivo, actualmente no hay datos disponibles que describan la progresión hacia la clínica. Una limitación importante de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos originales tienen que ser idénticas para evitar el emparejamiento incorrecto y la formación de moléculas inactivas. Por tanto, esta técnica no es apropiada como base para desarrollar fácilmente anticuerpos recombinantes, tri o tetraspecíficos contra tres o cuatro antígenos comenzando a partir de dos anticuerpos contra el primer y el segundo antígeno, ya que las cadenas pesadas de estos

anticuerpos y/o las cadenas ligeras idénticas se deben optimizar primero y a continuación se tienen que añadir otros péptidos de unión al antígeno contra el tercer y cuarto antígeno.

5 El documento WO 2006/093794 se refiere a composiciones de unión a proteínas heterodiméricas. El documento WO 99/37791 describe derivados de anticuerpos polivalentes. Morrison, S.L., *et al.*, J. Immunol. 160 (1998) 2802-2808 se refieren a la influencia del intercambio de dominios de región variable en las propiedades funcionales de IgG.

10 El documento WO 2013/02362 se refiere a polipéptidos heterodimerizados. El documento WO 2013/12733 se refiere a polipéptidos que comprenden regiones Fc heterodiméricas. El documento WO 2012/131555 se refiere a inmunoglobulinas heterodiméricas genomanipuladas. El documento EP 2647707 se refiere a inmunoglobulinas heterodiméricas genomanipuladas.

15 El documento WO 2013/026835 se refiere a anticuerpos biespecíficos, anticuerpos sin Fc con un entrecruzamiento de dominios. El documento WO 2009/080251, el documento WO 2009/080252, el documento WO 2009/080253, el documento WO 2009/080254 y Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-1191 se refieren a anticuerpos IgG bivalentes y biespecíficos con un entrecruzamiento de dominios.

20 Los anticuerpos multiespecíficos con reemplazo/intercambio de VH/VL en una unión para evitar el emparejamiento incorrecto de las cadenas ligeras (CrossMab^{VH-VL}) que se describen en el documento WO 2009/080252 (véase también Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-1191) reducen claramente los subproductos causados por el emparejamiento erróneo de una cadena ligera contra un primer antígeno con la cadena pesada equivocada contra el segundo antígeno (en comparación con los enfoques sin dicho intercambio de dominios). Sin embargo, su preparación no está completamente libre de productos secundarios. El producto secundario principal se basa en una interacción de tipo Bence-Jones (véase también Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-1191; en la fig. S11 del Suplemento; y Klein, C. *et al.*, MABS, vol. 4 n.º 6 (2012) 653-663).

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de una reducción adicional de dichos productos secundarios para mejorar, por ejemplo, el rendimiento de dichos anticuerpos biespecíficos.

30 Sumario de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico de subclase IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana, que comprende:

35 a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno; y

40 b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y en el que los dominios variables VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y

45 en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Otro modo de realización de la invención es un procedimiento para la preparación de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de

50 A) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican

a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno; y

55 b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y

60 en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

B) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y

65

C) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

Otro modo de realización de la invención es un ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención.

5 Otro modo de realización de la invención son vectores de expresión que contienen el ácido nucleico de acuerdo con la invención que pueden expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped.

Otro modo de realización de la invención es una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la invención.

10 Otro modo de realización de la invención es una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica o diagnóstica, que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Otro modo de realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Otro modo de realización de la invención es un procedimiento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento, caracterizado por administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

20 De acuerdo con la invención, la proporción de un anticuerpo multiespecífico deseado en comparación con los principales productos secundarios de tipo Bence-Jones no deseados se puede mejorar mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con las cargas opuestas en posiciones aminoacídicas específicas en los dominios CH1 y CL.

Descripción de las figuras

25 **Figura 1** Algunos ejemplos de anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención con reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en una interfase del dominio CH1/CL:

30 al menos el aminoácido en la posición 124 del dominio CL se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y

35 al menos el aminoácido en la posición 147 del dominio CH1 o el aminoácido en la posición 213 del dominio CH1 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Figura 1A: Reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en la interfase del dominio CH1/CL del otro brazo de unión del anticuerpo.

40 **Figura 1B:** Reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en la interfase del dominio CH1/CL del otro brazo de unión del anticuerpo, y modificaciones de la interfase del dominio CH3/CH3 para garantizar la heterodimerización de la cadena pesada (como, por ejemplo, la tecnología de botones en ojales o tecnologías de heterodimerización alternativas como, por ejemplo, la sustitución de aminoácidos cargados con su respectiva carga opuesta).

45 **Figura 2A** Ejemplo de anticuerpo multiespecífico con reemplazo de dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y sin mutaciones en una interfase de dominio CH1/CL (lateral izquierdo) y el producto secundario principal de este anticuerpo multiespecífico (debido a la interacción del dominio VL-VL de tipo Bence-Jones). Otras posibles variantes como productos secundarios potenciales no se detectaron ni directamente por espectrometría de masas; ni por espectrometría de masas después de digestión con plasmina o LysC mediante análisis de los fragmentos fab de los mismos.

50 **Figura 2B** Origen del producto secundario principal del anticuerpo multiespecífico con reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y sin mutaciones en una interfase del dominio CH1/CL (debido a la interacción del dominio VL-VL de tipo Bence-Jones).

55 **Figura 3** **Figura 3A:** secuencias de aminoácidos naturales (wt) en el dominio CH1 (se muestran dos isotipos de IgG) con las posiciones aminoacídicas 147 y 213 subrayadas y resaltadas (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Figura 3B: secuencias de aminoácidos naturales (wt) en el dominio CL del isotipo kappa con las posiciones aminoacídicas 124 y 123 subrayadas y resaltadas (numeración de acuerdo con Kabat).

60 **Figura 3C:** secuencias de aminoácidos naturales (wt) en el dominio CL del isotipo lambda con las posiciones aminoacídicas 124 y 123 subrayadas y resaltadas (numeración de acuerdo con Kabat).

65 **Figura 4** **Figura 4A:** Reducción del producto secundario principal de tipo Bence-Jones mediante sustituciones de aminoácidos cargados individuales de acuerdo con la invención en la interfase CH1/CL.

Ejemplos de anticuerpos multiespecíficos anti-*Ang2-VEGF* de acuerdo con la invención con intercambio/reemplazo del dominio VH/VL (*CrossMAB^{Vh-VL}*).

5 Comparación de aminoácidos naturales (wt) y combinaciones diferentes de sustituciones de aminoácidos cargados individuales

1) anticuerpo multiespecífico anti-*Ang2-VEGF* *CrossMAB^{Vh-VL}* natural (wt) sin sustituciones aminoacídicas específicas en la interfase CH1/CL,

10 2) anticuerpos multiespecíficos anti-*Ang2-VEGF* de acuerdo con la invención i) con sustituciones en la posición 124 del dominio CL es, y en la posición 147 del dominio CH1 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) o ii) con sustituciones en la posición 124 del dominio CL es, y en la posición 213 del dominio CH1 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

15 3) otros anticuerpos multiespecíficos anti-*Ang2-VEGF* *CrossMAB^{Vh-VL}* con sustituciones en diferentes posiciones

Figura 4B: Secuencias (SEQ ID NO) de los anticuerpos multiespecíficos para los que se muestran los resultados en la figura 4A.

20 **Figura 5** **Figura 5A:** Reducción del producto secundario principal de tipo Bence-Jones mediante sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL.

Ejemplos de anticuerpos multiespecíficos anti-*Ang2-VEGF* de acuerdo con la invención con intercambio/reemplazo del dominio VH/VL (*CrossMAB^{Vh-VL}*).

25 Comparación de aminoácidos naturales (wt) y combinaciones diferentes de sustituciones de aminoácidos cargados

Figura 5B: Secuencias (SEQ ID NO) de los anticuerpos multiespecíficos para los que se muestran los resultados en la figura 5A.

30 **Figura 6** **Figura 6A:** Reducción del producto secundario principal de tipo Bence-Jones mediante sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL.

Ejemplos de anticuerpos multiespecíficos anti-*IL-17/TWEAK* de acuerdo con la invención con intercambio/reemplazo del dominio VH/VL (*CrossMAB^{Vh-VL}*).

35 Comparación de aminoácidos naturales (wt) y combinaciones diferentes de sustituciones de aminoácidos cargados

Figura 6B: Secuencias (SEQ ID NO) de los anticuerpos multiespecíficos para los que se muestran los resultados en la figura 6A.

40 **Figura 7** Algunos ejemplos de anticuerpos multiespecíficos bivalentes de acuerdo con la invención con reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en una interfase del dominio CH1/CL, en los que los anticuerpos multiespecíficos están desprovistos de un fragmento Fc (formato Fab-CrossFab^{VH-VL} y CrossFab^{VH-VL}-Fab):

45 al menos el aminoácido en la posición 124 del dominio CL se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R), y al menos el aminoácido en la posición 147 del dominio CH1 o el aminoácido en la posición 213 del dominio CH1 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

50 **Figura 7A:** Reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en la interfase del dominio CH1/CL del otro brazo de unión del anticuerpo.

55 **Figura 7B:** Reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión de anticuerpo con mutación específica en la interfase del dominio CH1/CL del mismo brazo de unión de anticuerpo; y otras mutaciones específicas en la interfase del dominio CH1/CL del otro brazo de unión de anticuerpo.

60 **Figura 7C:** Reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en la interfase del dominio CH1/CL del otro brazo de unión del anticuerpo.

Figura 8 Algunos ejemplos de anticuerpos multiespecíficos trivalentes de acuerdo con la invención con reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en una interfase del dominio CH1/CL, en los que los anticuerpos multiespecíficos están desprovistos de un fragmento Fc (formato Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}):

65

al menos el aminoácido en la posición 124 del dominio CL se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y

al menos el aminoácido en la posición 147 del dominio CH1 o el aminoácido en la posición 213 del dominio CH1 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Figura 8A, B, C: Reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en la interfase del dominio CH1/CL de los otros brazos de unión del anticuerpo.

Figura 8D: Reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo con mutación específica en la interfase del dominio CH1/CL del mismo brazo de unión de anticuerpo; y otras mutaciones específicas en la interfase del dominio CH1/CL de los otros brazos de unión del anticuerpo.

Figura 9 Ejemplo de anticuerpos multiespecíficos tetravalentes de acuerdo con la invención con reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en una interfase del dominio CH1/CL, en los que los anticuerpos multiespecíficos están desprovistos de un fragmento Fc (formato Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}):

al menos el aminoácido en la posición 124 del dominio CL se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y

al menos el aminoácido en la posición 147 del dominio CH1 o el aminoácido en la posición 213 del dominio CH1 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat):

Reemplazo del dominio VH/VL en un brazo de unión del anticuerpo y mutaciones específicas en la interfase del dominio CH1/CL de los otros brazos de unión del anticuerpo.

Descripción detallada de la invención

Los anticuerpos multiespecíficos con un reemplazo/intercambio de dominios en un brazo de unión (CrossMabVH-VL) se describen en detalle en el documento WO 2009/080252 y Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-11191. Reducen claramente los subproductos causados por el emparejamiento erróneo de una cadena ligera contra un primer antígeno con la cadena pesada equivocada contra el segundo antígeno (en comparación con los enfoques sin dicho intercambio de dominios). Sin embargo, su preparación no está completamente libre de productos secundarios. El producto secundario principal se basa en una interacción de tipo Bence-Jones (véase también Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108 (2011) 11187-11191; en la fig. S11 del Suplemento).

Se identificó un enfoque para la reducción adicional de dichos productos secundarios para mejorar el rendimiento de dichos anticuerpos multiespecíficos (es decir, anticuerpos multiespecíficos, que comprenden un reemplazo/intercambio de dominios VH/VL solo en el(los) brazo(s) de unión de una especificidad de antígeno, mientras que el(los) brazo(s) de unión de la otra especificidad de antígeno no comprende(n) un reemplazo/intercambio de dominios VH/VL, sino que se trata de una disposición de dominios de anticuerpos naturales como se indica en la **fig. 1**), mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con la carga opuesta en posiciones aminoacídicas específicas en los dominios CH1 y CL.

Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico de subclase IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana, que comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno; y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y en el que los dominios variables VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y

en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

De acuerdo con el concepto de la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende las modificaciones como se indica anteriormente solo en el dominio constante CL de la primera cadena ligera y en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada.

Por tanto, para dicho segundo anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno comprendido en un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, se aplica lo siguiente:

- 5 - dentro de la cadena ligera, el dominio de cadena ligera variable VL se reemplaza por el dominio de cadena pesada variable VH de dicho anticuerpo; y
- dentro de la cadena pesada, el dominio de cadena pesada variable VH se reemplaza por el dominio de cadena ligera variable VL de dicho anticuerpo; y
- 10 - los dominios constantes CL y CH1 en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo no se reemplazan entre sí (permanecen sin intercambiar).

Por tanto, para dicho anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno comprendido en un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, se aplica lo siguiente:

- 15 - dentro de dicha primera cadena ligera derivada de dicho primer anticuerpo, la disposición secuencial de los dominios de la cadena ligera (CL-VL) permanece inalterada; y
- 20 - dentro de dicha primera cadena pesada derivada de dicho primer anticuerpo, la disposición secuencial de los dominios de la cadena pesada (por ejemplo, CH1-VH o CH3-CH2-CH1-VH) permanece inalterada (por lo tanto, dicho anticuerpo que se une específicamente al primer anticuerpo no incluye un intercambio de dominios, en particular no un intercambio de VH/VL).

En otras palabras, dicho anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno comprendido en un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende:

- 25 - una primera cadena ligera derivada de dicho primer anticuerpo que comprende una disposición secuencial de los dominios de la cadena ligera de VL-CL (dirección desde N terminal a C terminal); y
- 30 - una primera cadena pesada derivada de dicho primer anticuerpo que comprende una disposición secuencial de los dominios de la cadena pesada de CH1-VH (dirección desde N terminal a C terminal) (en un modo de realización, la primera cadena pesada comprende una disposición secuencial de la dominios de la cadena pesada de CH3-CH2-CH1-VH en dirección desde N terminal a C terminal).

35 La "cadena ligera de un anticuerpo", como se usa en el presente documento, es un polipéptido que comprende en la dirección N terminal a C terminal un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, abreviado como VL-CL.

40 La "cadena pesada de un anticuerpo", como se usa en el presente documento, es un polipéptido que comprende en la dirección N terminal a C terminal un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio de cadena pesada constante 1 (CH1) de anticuerpo.

45 En un modo de realización de la invención, la cadena pesada del anticuerpo multiespecífico incluye en la dirección N terminal a C terminal un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio de cadena pesada constante 1 (CH1) de anticuerpo y está desprovisto de dominios constantes de cadena pesada CH2 y CH3, por tanto, abreviados como VH-CH1. En un modo de realización, los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención comprenden al menos dos fragmentos Fab, en los que el primer fragmento Fab comprende al menos un sitio de unión a antígeno específico para un primer antígeno; y el segundo fragmento Fab comprende al menos un sitio de unión a antígeno específico para un segundo antígeno, en los que en el segundo fragmento Fab los dominios variables VL y VH en la

50 segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí; y en los que el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de un dominio Fc; y en los que en el dominio constante CL de la cadena ligera del primer fragmento Fab, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en los que en el dominio constante CH1 de la cadena pesada del primer fragmento Fab, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

55

Como se usa en el presente documento, "fragmento Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL variable y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH variable y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. Los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con este modo de realización comprenden al menos dos fragmentos Fab, en los que se intercambian las regiones variables de la cadena pesada y ligera del segundo fragmento Fab. Debido al intercambio de las regiones variables, dicho segundo fragmento Fab también se denomina "fragmento cross-Fab" o "fragmento xFab" o "fragmento Fab de entrecruzamiento". En dicho segundo fragmento Fab en el que se intercambian las regiones variables de la cadena pesada y ligera de Fab, la molécula de Fab de entrecruzamiento comprende una cadena pesada modificada compuesta por la

60 región variable de cadena ligera (VL) y la región constante de cadena pesada (CH1), y una cadena ligera modificada

65

compuesta por la región variable de cadena pesada (VH) y la región constante de cadena ligera (CL). Esta molécula de Fab de entrecruzamiento también se denomina CrossFab^{VH/VL}.

5 La expresión "dominio Fc" o "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. Por ejemplo, en los anticuerpos naturales, el dominio Fc está compuesto por dos fragmentos de proteínas idénticos, derivados del segundo y tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas del anticuerpo en los isotipos IgG, IgA e IgD; los dominios de Fc de IgM e IgE contienen tres dominios constantes de cadena pesada (dominios CH 2-4) en cada cadena polipeptídica. "Desprovisto del dominio Fc", como se usa en el presente documento, significa que los anticuerpos biespecíficos de la invención no comprenden un dominio CH2, CH3 y CH4; es decir, la cadena pesada constante consiste únicamente en uno o más dominios CH1.

15 En un modo de realización, el primer y segundo fragmento Fab están conectados por medio de un conector peptídico. La expresión "conector peptídico", como se usa en el presente documento, indica un péptido con una secuencia de aminoácidos, que es preferentemente de origen sintético. En un modo de realización, se usa un conector peptídico para conectar uno de los fragmentos Fab al extremo C o N del otro fragmento Fab para formar un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención. En un modo de realización preferente, dicho conector peptídico es un péptido con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 5 aminoácidos, en un modo de realización con una longitud de 5 a 100, en otro modo de realización de 10 a 50 aminoácidos. En un modo de realización, dicho conector peptídico es (GxS)_n o (GxS)_nG_m con G = glicina, S = serina, y (x = 3, n = 3, 4, 5 o 6, y m = 0, 1, 2 o 3) o (x = 4, n = 2, 3, 4 o 5 y m = 0, 1, 2 o 3), en otro modo de realización x = 4 y n = 2 o 3, en otro modo de realización x = 4 y n = 2. En un modo de realización, dicho conector peptídico es (G4S)₂. El conector peptídico se usa para conectar el primer y el segundo fragmento Fab. En un modo de realización, el primer fragmento Fab está conectado al extremo C o N del segundo fragmento Fab.

25 En otro modo de realización preferente de la invención, la cadena pesada de un anticuerpo comprende en dirección N terminal a C terminal un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio de cadena pesada constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio constante de cadena pesada 2 (CH2) de anticuerpo y un dominio constante de cadena pesada 3 (CH3) de anticuerpo, abreviados como VH-CH1-CH2-CH3.

30 En caso de que el anticuerpo multiespecífico comprenda los dominios VH-CH1-CH2-CH3 en cada cadena pesada, un aspecto adicional de la invención es mejorar aún más la proporción de un anticuerpo multiespecífico deseado en comparación con los productos secundarios no deseados, que puede ser por modificaciones del primer y segundo dominio CH3 de dicho anticuerpo multiespecífico para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen este primer y segundo dominio CH3.

35 Existen varios enfoques para las modificaciones en CH3 para garantizar la heterodimerización, que se describen bien, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Típicamente, en todos de dichos enfoques, el primer dominio CH3 y el segundo dominio CH3 se genomanipulan ambos de manera complementaria de modo que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) ya no se pueda homodimerizar consigo mismo, sino que es forzado a heterodimerizarse con el otro dominio CH3 genomanipulado de forma complementaria (de modo que el primer y segundo dominio CH3 se heterodimerizan y no se forman homodímeros entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3). Estos diferentes enfoques para una heterodimerización de cadena pesada mejorada se contemplan como diferentes alternativas en combinación con las modificaciones de la cadena pesada-ligera (intercambio/reemplazo de VH y VL en un brazo de unión y la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en la interfase CH1/CL) en los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención, lo que reduce el emparejamiento incorrecto de la cadena ligera y los productos secundarios de tipo Bence-Jones.

50 En un modo de realización de la invención (en caso de que el anticuerpo multiespecífico comprenda dominios CH3 en las cadenas pesadas), los dominios CH3 de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se alteran para soportar la heterodimerización

55 - sustituyendo al menos un aminoácido del dominio CH3 de la primera cadena pesada, y
 - sustituyendo al menos un aminoácido del dominio CH3 de la segunda cadena pesada, en el que dicho aminoácido está enfrentado al al menos un aminoácido del dominio CH3 de la primera cadena pesada dentro de la estructura terciaria del anticuerpo multiespecífico,

60 en el que los respectivos aminoácidos dentro de los dominios CH3 de la primera y la segunda cadena pesada, respectivamente

65 - se sustituyen de modo que los aminoácidos de cargas opuestas de la cadena lateral se introduzcan en las cadenas pesadas opuestas, o

- se sustituyen de modo que los aminoácidos con volúmenes grandes y pequeños de la cadena lateral se introducen en las cadenas pesadas opuestas, con lo que se crea una protuberancia por un aminoácido con un volumen grande de la cadena lateral en un dominio CH3, que se puede situar en una cavidad localizada dentro del otro dominio CH3, en el que la cavidad se ha creado por un aminoácido con un volumen pequeño de la cadena lateral.

En un modo de realización preferente de la invención (en caso de que el anticuerpo multiespecífico comprenda dominios CH3 en las cadenas pesadas), los dominios CH3 de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se alteran mediante la tecnología de "botón en ojal" que se describe en detalle con varios ejemplos, por ejemplo, en el documento WO 96/027011, J.B., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y Merchant, A.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681; y el documento WO 98/050431. En este procedimiento, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza aún más los heterodímeros (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) e incrementa el rendimiento.

Por tanto, en un modo de realización de la invención, dicho anticuerpo multiespecífico (comprende un dominio CH3 en cada cadena pesada y) se caracteriza además por que el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada del anticuerpo en a) y el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada del anticuerpo en b) se encuentran cada uno en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo, en el que dicha interfase se altera para promover la formación del anticuerpo multiespecífico, en el que la alteración se caracteriza por que:

i) el dominio CH3 de una cadena pesada se altera, de modo que, dentro de la interfase original del dominio CH3 de la una cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico, se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen mayor de la cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de la una cadena pesada que se puede situar en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada; y

ii) el dominio CH3 de la otra cadena pesada se altera, de modo que, dentro de la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la una cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico, se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen más pequeño de la cadena lateral, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro de la que se puede situar una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de la una cadena pesada.

En un modo de realización de la invención, dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen mayor de la cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

En un modo de realización de la invención, dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen más pequeño de la cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

En un aspecto de la invención, ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de modo que se puede formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3. Por tanto, de acuerdo con este aspecto de la invención, el dominio CH3 de la una cadena pesada se altera adicionalmente, de modo que, dentro de la interfase original del dominio CH3 de la una cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico, se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de cisteína (C), y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se altera aún más, de modo que, dentro de la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la una cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico, se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de cisteína (C), de modo que se puede formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3 por medio de los residuos de cisteína introducidos.

En un modo de realización preferente, dicho anticuerpo multiespecífico comprende una mutación aminoacídica T366W en un dominio CH3 de la "cadena de botón" y las mutaciones aminoacídicas T366S, L368A, Y407V en el otro dominio CH3 de la "cadena de ojal". También se puede usar un puente disulfuro intercatenario adicional entre los dominios CH3 (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677-681), por ejemplo, introduciendo una mutación aminoacídica Y349C en el dominio CH3 de la "cadena de ojal"; y una mutación aminoacídica E356C o una mutación aminoacídica S354C en el dominio CH3 de la "cadena de botón".

En un modo de realización preferente, dicho anticuerpo multiespecífico (que comprende un dominio CH3 en cada cadena pesada) comprende las mutaciones aminoacídicas S354C y T366W en un dominio CH3 y las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (con la mutación aminoacídica S354C adicional en un dominio CH3 y la mutación aminoacídica Y349C adicional en el otro dominio CH3 formando un puente disulfuro intercatenario) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Otras técnicas de modificaciones de CH3 para garantizar la heterodimerización se contemplan como alternativas de la invención y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205,

WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 y WO 2013/096291.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento EP 1 870 459A1 se usa de forma alternativa. Este enfoque se basa en la introducción de sustituciones/mutaciones de aminoácidos cargados con la carga opuesta en posiciones aminoacídicas específicas en la interfase de los dominios CH3/CH3 entre ambas cadenas pesadas. Un modo de realización preferente para dichos anticuerpos multiespecíficos son las mutaciones aminoacídicas R409D y K370E en el dominio CH3 de una cadena pesada y las mutaciones aminoacídicas D399K y E357K en el dominio CH3 de la otra cadena pesada del anticuerpo multiespecífico (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro modo de realización, dicho anticuerpo multiespecífico comprende una mutación aminoacídica T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botón" y las mutaciones aminoacídicas T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal"; y adicionalmente comprende las mutaciones aminoacídicas R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botón" y las mutaciones aminoacídicas D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

En otro modo de realización, dicho anticuerpo multiespecífico comprende las mutaciones aminoacídicas S354C y T366W en el dominio CH3 de una cadena pesada y las mutaciones aminoacídicas Y349C, T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la otra cadena pesada; o dicho anticuerpo multiespecífico comprende las mutaciones aminoacídicas Y349C y T366W en el dominio CH3 de una cadena pesada y las mutaciones aminoacídicas S354C, T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la otra cadena pesada y adicionalmente comprende las mutaciones aminoacídicas R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botón" y las mutaciones aminoacídicas D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2013/157953 se usa de forma alternativa. En un modo de realización, el dominio CH3 de una cadena pesada comprende una mutación aminoacídica T366K y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende una mutación aminoacídica L351D. En otro modo de realización, el dominio CH3 de la una cadena pesada comprende además una mutación aminoacídica L351K. En otro modo de realización, el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende además una mutación aminoacídica seleccionada de Y349E, Y349D y L368E (en un modo de realización, L368E).

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2012/058768 se usa de forma alternativa. En un modo de realización, el dominio CH3 de una cadena pesada comprende las mutaciones aminoacídicas L351Y e Y407A y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende las mutaciones aminoacídicas T366A y K409F. En otro modo de realización, el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende además una mutación aminoacídica en la posición T411, D399, S400, F405, N390 o K392. En un modo de realización, dicha mutación aminoacídica se selecciona del grupo que consiste en

- a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E e T411W,
- b) D399R, D399W, D399Y y D399K,
- c) S400E, S400D, S400R y S400K,
- d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V y F405W,
- e) N390R, N390K y N390D,
- f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F y K392E.

En otro modo de realización, el dominio CH3 de una cadena pesada comprende las mutaciones aminoacídicas L351Y e Y407A y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende las mutaciones aminoacídicas T366V y K409F. En otro modo de realización, el dominio CH3 de una cadena pesada comprende una mutación aminoacídica Y407A y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende las mutaciones aminoacídicas T366A y K409F. En otro modo de realización, el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende además las mutaciones aminoacídicas K392E, T411E, D399R y S400R.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2011/143545 se usa de forma alternativa. En un modo de realización, la modificación aminoacídica de acuerdo con el documento WO 2011/143545 se introduce en el dominio CH3 de la cadena pesada en una posición seleccionada del grupo que consiste en 368 y 409.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2011/090762, que también usa la tecnología de botón en ojal descrita anteriormente, se usa de forma alternativa. En un modo de realización, el dominio CH3 de una cadena pesada comprende una mutación aminoacídica T366W y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende una mutación aminoacídica Y407A. En un modo de realización, el dominio CH3 de una cadena pesada comprende una mutación aminoacídica T366Y y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende una mutación aminoacídica Y407T.

En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es de isotipo IgG2 y el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2010/129304 se usa de forma alternativa.

5 En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2009/089004 se usa de forma alternativa. En un modo de realización, el dominio CH3 de una cadena pesada comprende una sustitución aminoacídica de K392 o N392 con un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); en otro modo de realización, una mutación K392D o N392D) y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende una sustitución aminoacídica de D399, E356, D356 o E357 con un aminoácido cargado positivamente (en un modo de realización, lisina (K) o arginina (R), en otro modo de realización una sustitución D399K, E356K, D356K o E357K, y en incluso otro modo de realización una mutación D399K o E356K). En otro modo de realización, el dominio CH3 de la una cadena pesada comprende además una sustitución aminoacídica de K409 o R409 con un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); en otro modo de realización una mutación K409D o R409D). En otro modo de realización, el dominio CH3 de la una cadena pesada comprende además o de forma alternativa una sustitución aminoacídica de K439 y/o K370 con un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D)).

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2007/147901 se usa de forma alternativa. En un modo de realización, el dominio CH3 de una cadena pesada comprende las mutaciones aminoacídicas K253E, D282K y K322D y el dominio CH3 de la otra cadena pesada comprende las mutaciones aminoacídicas D239K, E240K y K292D.

En un modo de realización, el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2007/110205 se usa de forma alternativa.

25 Las expresiones "sitio de unión" o "sitio de unión a antígeno", como se usan en el presente documento, indican la región o regiones de una molécula de anticuerpo a la(s) que se une realmente un ligando (por ejemplo, el antígeno o fragmento de antígeno) y que se deriva(n) de un anticuerpo. El sitio de unión a antígeno incluye dominios variables de cadena pesada (VH) del anticuerpo y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo, o pares de VH/VL.

30 Los sitios de unión a antígeno que se unen específicamente al antígeno deseado se pueden derivar a) de anticuerpos conocidos contra el antígeno o b) de anticuerpos nuevos o fragmentos de anticuerpos obtenidos por métodos de inmunización *de novo* usando, entre otros, la proteína antigénica o ácido nucleico o fragmentos de los mismos, o por presentación en fagos.

35 Un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención puede contener seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en diversos grados a la afinidad del sitio de unión por el antígeno. Hay tres CDR de dominio variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR de dominio variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las CDR y las regiones marco (FR) se determina mediante comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en las que esas regiones se han definido de acuerdo con la variabilidad entre las secuencias. También se incluyen dentro del alcance de la invención sitios de unión a antígeno funcionales que comprenden menos CDR (es decir, donde la especificidad de unión se determina mediante tres, cuatro o cinco CDR). Por ejemplo, menos de un conjunto completo de 6 CDR puede ser suficiente para la unión. En algunos casos, un dominio VH o VL será suficiente.

45 La especificidad de los anticuerpos se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo de un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. El término anticuerpo "monoespecífico", como se usa en el presente documento, indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión, de los que cada uno se une al mismo epítipo del mismo antígeno.

50 Los anticuerpos multiespecíficos son, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, tri o tetraspecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen dos especificidades de unión a antígeno diferentes. Los anticuerpos trispecíficos, en consecuencia, son anticuerpos que tienen tres especificidades de unión a antígeno diferentes. Los anticuerpos tetraspecíficos son anticuerpos que tienen cuatro especificidades de unión a antígeno diferentes. En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

Si un anticuerpo tiene más de una especificidad, los epítopos reconocidos se pueden asociar con un único antígeno o con más de un antígeno.

60 El término "valente", como se usa en la presente solicitud, indica la presencia de un número especificado de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Un anticuerpo natural, por ejemplo, tiene dos sitios de unión y es bivalente. Por tanto, el término "trivalente" indica la presencia de tres sitios de unión en una molécula de anticuerpo.

65 En un modo de realización preferente de la invención, los anticuerpos de la invención comprenden regiones constantes de inmunoglobulina de una o más clases de inmunoglobulina. Las clases de inmunoglobulina incluyen los isotipos IgG,

IgM, IgA, IgD e IgE y, en el caso de IgG e IgA, sus subtipos. En un modo de realización preferente, un anticuerpo de la invención tiene una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG.

5 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de aminoácidos única.

10 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se prepara normalmente por técnicas de ADN recombinante. Son preferentes los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferentes de "anticuerpos quiméricos" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación con la unión a C1q y/o unión al receptor de Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN recombinante y transfección génica convencionales y son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; el documento US 5.202.238 y el documento US 5.204.244.

20 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que se han modificado las regiones marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En un modo de realización preferente, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. Otras formas de "anticuerpos humanizados" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en relación con la unión a C1q y/o la unión al receptor de Fc (FcR).

30 Se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). También se pueden producir anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de estirpe germinal humana en dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., *et al.*, Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., *et al.*, Year Immunol. 7 (1993) 33-40). También se pueden producir anticuerpos humanos en colecciones de presentación en fagos (Hoogenboom, H.R., y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., *et al.*, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole, *et al.* y Boerner, *et al.* están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner, P., *et al.*, J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Como se ha mencionado ya para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, también comprende dichos anticuerpos que se modifican en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, en especial en relación a la unión al C1q y/o a la unión a FcR, por ejemplo, por "cambio de clase", es decir, por cambio o mutación de partes del Fc (por ejemplo, mutación de IgG1 a IgG4 y/o IgG1/IgG4).

50 Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "anticuerpo humano recombinante" incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a hipermutación somática *in vivo*. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de secuencias de VH y VL de la estirpe germinal humana y están relacionadas con ellas, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la estirpe germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

60 El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), dominio variable de una cadena pesada (VH)), como se usa en el presente documento, indica cada una del par de cadenas ligera y pesada que está implicado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas ligera y pesada humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de

lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional mediante las regiones marco y forman, conjuntamente con las CDR de la otra cadena, un sitio de unión a antígeno. Las regiones CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel en particular importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y, por lo tanto, proporcionan otro objetivo de la invención.

Las expresiones "región hipervariable" o "parte de un anticuerpo que se une al antígeno", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "marco" o "FR" son aquellas regiones del dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, desde el extremo N al C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada cadena están separadas por dichos aminoácidos marco. Especialmente, la CDR3 de la cadena ligera es la región que más contribuye a la unión a antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "unión", "que se une específicamente" o "unión específica" se refieren a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) con antígeno natural purificado. La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo desde el complejo anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). En un modo de realización, "unión" o "que se une específicamente" significa una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} mol/l o menos, en un modo de realización de 10^{-8} M a 10^{-13} mol/l. Por tanto, un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se une específicamente a cada antígeno para el que es específico con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} mol/l o menos, en un modo de realización con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} a 10^{-13} mol/l. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a su antígeno con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-9} a 10^{-13} mol/l.

La unión del anticuerpo al Fc γ RIII se puede investigar mediante un ensayo BIAcore® (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo desde el complejo anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico que se puede unir específicamente a un anticuerpo. En determinados modos de realización, los determinantes epitópicos incluyen agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, fosforilo o sulfonilo y, en determinados modos de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo.

En determinados modos de realización, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo es de la subclase IgG1 humana, o de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo es de la subclase IgG2 humana.

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo es de la subclase IgG3 humana.

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo es de la subclase IgG4 humana, o de la subclase IgG4 humana con la mutación adicional S228P (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que es de la subclase IgG1 humana o IgG4 humana.

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por ser de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por ser de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por ser de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P y L235E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por ser de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

5 Se ha descubierto ahora que los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención tienen características mejoradas, tales como actividad biológica o farmacológica, propiedades farmacocinéticas o toxicidad. Se pueden usar, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades, tales como el cáncer.

10 La expresión "región constante", como se usa en las solicitudes actuales, indica la suma de los dominios de un anticuerpo distintos de la región variable. La región constante no está implicada directamente en la unión de un antígeno, pero presenta diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de cadena ligera (CL) que se pueden encontrar en las cinco clases de anticuerpos se denominan κ (kappa) y λ (lambda). Los "dominios constantes", como se usan en el presente documento, son de origen humano que proviene de una región de cadena pesada constante de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región kappa o lambda de cadena ligera constante. Dichos dominios y regiones constantes son bien conocidos en el estado de la técnica y, por ejemplo, se describen por Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

20 Como se usa en el presente documento, las posiciones aminoacídicas de todas las regiones y dominios constantes de la cadena pesada y ligera se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descrito en Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD (1991) y se denomina "numeración de acuerdo con Kabat" en el presente documento. Específicamente, el sistema de numeración de Kabat (véanse las páginas 647-660) de Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD (1991) se usa para el dominio constante de cadena ligera CL del isotipo kappa y lambda, y el sistema de numeración del índice EU de Kabat (véanse las páginas 661-723) se usa para los dominios constantes de cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y CH3, lo que se aclara además en el presente documento mediante referencia a la "numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat" en este caso).

30 Mientras que los anticuerpos de la subclase IgG4 muestran una unión al receptor de Fc (Fc γ R1) reducida, los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de hidrato de carbono de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat) son residuos que, si se alteran, proporcionan también una unión reducida al receptor de Fc (Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., *et al.*, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324; documento EP 0 307 434).

40 En un modo de realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una unión reducida a FcR en comparación con un anticuerpo IgG1. Por tanto, el anticuerpo original es, con respecto a la unión a FcR, de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, las mutaciones en el anticuerpo original son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, las mutaciones en el anticuerpo original son, en IgG4, S228P y, en IgG1, L234A y L235A (numeraciones de acuerdo con el índice UE de Kabat).

45 La región constante de un anticuerpo está implicada directamente en la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia mediante la unión del factor del complemento C1q a la región constante de la mayoría de las subclases de anticuerpos IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está causada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión a la región constante son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, por Lukas, T.J., *et al.*, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Bunkhouse, R. y Cobra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., *et al.*, Nature 288 (1980) 338-344; Thomason, J.E., *et al.*, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idiocias, E.E., *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hearer, M., *et al.*, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324; y el documento EP 0 307 434. Dichos sitios de unión a la región constante se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

60 La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células diana humanas por un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan antígeno con un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras tales como PBMC recién aislados o células efectoras purificadas de capas leucocíticas, como monocitos o linfocitos citolíticos naturales (NK) o una línea celular NK en crecimiento permanente.

65 La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" indica un proceso iniciado por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpos IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está causada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión a la parte

Fc son conocidos en el estado de la técnica (véase anteriormente). Dichos sitios de unión a la parte Fc se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran activación del complemento incluyendo la unión a C1q y C3, mientras que la IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q y/o C3.

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se pueden potenciar genomaniplando su componente oligosacárido, como se describe en Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; y el documento US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos terapéuticos más comúnmente usados, son glucoproteínas que tienen un sitio de N-glucosilación conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos acoplados a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, formando extensos contactos con la cadena principal polipeptídica, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en las funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M.R., *et al.*, Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., *et al.*, Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y el documento WO 99/54342 mostraron que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, incrementa significativamente la actividad de ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición del hidrato de carbono en Asn297 o su eliminación también afectan a la unión a Fc γ R y C1q (Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; Davies, J., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294; Mimura, Y., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547; Radaev, S., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483; Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L.C., *et al.*, J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147).

Los procedimientos para potenciar las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2004/065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739.

En un modo de realización preferente de la invención, el anticuerpo multiespecífico se glucosila (si comprende una parte Fc de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferentemente de la subclase IgG1 o IgG3) con una cadena glucídica en Asn297, con lo que la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena glucídica es de un 65 % o más baja (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena glucídica está entre un 5 % y un 65 %, preferentemente entre un 20 % y un 40 %. "Asn297" de acuerdo con la invención significa un aminoácido asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc. En base a variaciones de secuencia mínimas de anticuerpos, Asn297 también estar localizado algunos aminoácidos (normalmente no más de ± 3 aminoácidos) en dirección 5' o 3' de la posición 297, es decir, entre la posición 294 y 300. En un modo de realización, el anticuerpo glucosilado de acuerdo con la invención, la subclase de IgG es de la subclase IgG1 humana, de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A o de la subclase IgG3. En otro modo de realización, la cantidad de ácido N-glucolilneuramínico (NGNA) es de un 1 % o menos y/o la cantidad de alfa-1,3-galactosa N terminal es de un 1 % o menos dentro de dicha cadena glucídica. La cadena glucídica presenta preferentemente las características de los glucanos unidos a N adheridos a Asn297 de un anticuerpo expresado de forma recombinante en una célula CHO.

La expresión "las cadenas glucídicas muestran características de los glucanos unidos a N adheridos a Asn297 de un anticuerpo expresado de forma recombinante en una célula CHO" indica que la cadena glucídica en Asn297 del anticuerpo original de acuerdo con la invención tiene la misma estructura y secuencia de residuos glucídicos, excepto por el residuo de fucosa, que los del mismo anticuerpo expresado en células CHO no modificadas, por ejemplo, como de los que se informa en el documento WO 2006/103100.

El término "NGNA", como se usa en esta solicitud, indica el residuo glucídico ácido N-glucolilneuramínico.

La glucosilación de la IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 como glucosilación de oligosacáridos complejos biantenarios fucosilados centrales terminados con hasta dos residuos de Gal. De las regiones de cadena pesada constante humanas de la subclase IgG1 o IgG3 se informa en detalle por Kabat, E., A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y por Brüggemann, M., *et al.*, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T., W., *et al.*, Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Estas estructuras se designan como residuos de glucano G0, G1 (α -1,6- o α -1,3-) o G2, dependiendo de la cantidad de residuos de Gal terminales (Raju, T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de la parte Fc de un anticuerpo se describe, por ejemplo, por Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207. Los anticuerpos que se expresan de forma recombinante en células huésped CHO no glucomodificadas normalmente están fucosilados en Asn297 en una cantidad de al menos un 85 %. Los oligosacáridos modificados del anticuerpo pueden ser híbridos o complejos. Preferentemente, los oligosacáridos bisecados, reducidos/no fucosilados son híbridos. En otro modo de realización, los oligosacáridos bisecados, reducidos/no fucosilados son complejos.

De acuerdo con la invención, "cantidad de fucosa" significa la cantidad de dicho glúcido dentro de la cadena glucídica en Asn297, que se refiere a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) medida por espectrometría de masas MALDI-TOF y calculada como valor

promedio. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa que se refiere a todas las glucoestructuras identificadas en la muestra tratada con N-glicosidasa F (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con bajo y alto contenido de manosa) por MALDI-TOF.

5 Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden unir a una variedad de antígenos. En un modo de realización de la invención, ni el primer antígeno ni el segundo antígeno son un antígeno de linfocitos T activadores. En un modo de realización de la invención, ni el primer antígeno ni el segundo antígeno son CD3. En un modo de realización, el anticuerpo no se une específicamente a un antígeno de linfocitos T activadores. En un modo de realización, el anticuerpo no se une específicamente a CD3.

10 En un modo de realización de la invención, el primer o el segundo antígeno es TWEAK humano. En un modo de realización de la invención, el primer o el segundo antígeno es IL17 humana. En un modo de realización de la invención, el primer antígeno es TWEAK humano y el segundo antígeno es IL17 humana. En un modo de realización de la invención, el primer antígeno es IL17 humana y el segundo antígeno es TWEAK humano.

15 TWEAK humano (UniProtKB O43508, inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF) es una proteína transmembranaria de tipo II asociada a la superficie celular. TWEAK se describe en Chicheportiche, Y., *et al.*, J. Biol. Chem. 272 (1997) 32401-32410; Marsters, S.A., *et al.*, Curr. Biol. 8 (1998) 525-528; Lynch, C.N., *et al.*, J. Biol. Chem. 274 (1999) 8455-8459. La forma activa de TWEAK es un homotrímero soluble. TWEAK humano y murino muestran una identidad de secuencia de un 93 % en el dominio de unión al receptor. El receptor de TWEAK Fn14 (proteína de 14 kDa inducible por el factor de crecimiento de fibroblastos) es una proteína transmembranaria de tipo I de 129 aa que consiste en un solo dominio rico en cisteína en el dominio de unión a ligando. La señalización de TWEAK se produce por medio de la activación de la vía de NF-KB. El ARNm de TWEAK se expresa en una variedad de tejidos y se encuentra en la mayoría de los órganos principales como el corazón, el cerebro, el músculo esquelético y el páncreas, tejidos relacionados con el sistema inmunitario como el bazo, los ganglios linfáticos y el timo. Se ha detectado ARNm de Fn14 en células del corazón, el cerebro, el pulmón, la placenta, las CE vasculares y el músculo liso. Los ratones genomanipulados por desactivación génica TWEAK-null y Fn14-null son viables, sanos y fértiles, tienen más linfocitos citolíticos naturales y muestran una respuesta inflamatoria innata potenciada. TWEAK está implicado en la apoptosis, proliferación, angiogénesis, penumbra isquémica, edema cerebral, esclerosis múltiple.

20 La IL-17 humana (también denominada IL17-A; CTLA-8, Swiss Prot Q16552, IL17) es una citocina proinflamatoria producida por un subconjunto de linfocitos T cooperadores (llamados Th17) que se ha relacionado con la patogenia de la EM. La IL-17A desempeña un papel en la inducción de otras citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión. El tratamiento de animales con anticuerpos neutralizantes de IL-17A disminuye la incidencia de la enfermedad y la gravedad en la encefalomielite autoinmunitaria (Komiyama, Y. *et al.*, J. Immunol. 177 (2006) 566-573). La IL-17A está sobreexpresada en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM (Hellings, P.W. *et al.*, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28 (2003) 42-50; Matusevicius, D. *et al.*, Multiple Sclerosis 5 (1999) 101-104; documento WO 2005/051422). Además, los anticuerpos neutralizantes contra IL-17A reducen la gravedad y la incidencia de la artritis inducida por colágeno en el modelo de AR de ratón, y se pueden detectar niveles altos de IL-17A en el líquido sinovial de las articulaciones inflamadas de pacientes con AR (Ziolkowska, M. *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 2832-2838; Kotake, S., *et al.*, J. Clin. Invest. 103 (1999) 1345-1352; Hellings, P.W. *et al.*, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28 (2003) 42-50).

25 El anticuerpo de acuerdo con la invención se produce preferentemente por medios recombinantes. Por tanto, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención y otro aspecto es una célula que comprende dicho ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención. Son conocidos ampliamente en el estado de la técnica procedimientos para la producción recombinante y comprenden la expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas con el aislamiento posterior del anticuerpo y, normalmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de anticuerpos como se ha mencionado anteriormente em una célula huésped, se insertan ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas modificadas respectivas en vectores de expresión por procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariontas o eucarióticas apropiadas, como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis). Son bien conocidos procedimientos generales para la producción recombinante de anticuerpos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., *et al.*, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

30 Los anticuerpos producidos por células huésped pueden experimentar escisión postraducciona de uno o más, en particular uno o dos, aminoácidos del extremo C de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped por expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica una cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa, o puede incluir una variante escindida de la cadena pesada de longitud completa (también denominada en el presente documento una cadena pesada variante escindida). Este puede ser el caso cuando los dos aminoácidos C terminales finales de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

65

Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas que incluyen dominios CH3 se indican en el presente documento sin dipéptido glicina-lisina C terminal, si no se indica de otro modo.

5 En un modo de realización, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, comprende un dipéptido de glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, comprende un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

10 Las composiciones de la invención, tales como las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, comprenden una población de anticuerpos de la invención. La población de anticuerpos puede comprender anticuerpos que tienen una cadena pesada de longitud completa y anticuerpos que tienen una cadena pesada variante escindida. La población de anticuerpos puede consistir en una mezcla de anticuerpos que tienen una cadena pesada de longitud completa y anticuerpos que tienen una cadena pesada variante escindida, en la que al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de los anticuerpos tienen una cadena pesada variante escindida.

15 En un modo de realización, una composición que comprende una población de anticuerpos de la invención comprende un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, con un dipéptido de glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, una composición que comprende una población de anticuerpos de la invención comprende un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, con un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

20 En un modo de realización, dicha composición comprende una población de anticuerpos compuesta de anticuerpos que comprenden una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento; anticuerpos que comprenden una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, con un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y anticuerpos que comprenden una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, con un dipéptido de glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

25 Los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepahrose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y el ARN que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dichos ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN se puede insertar en vectores de expresión, que se transfectan a continuación en células huésped tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

30 Las variantes de secuencia de aminoácidos (o mutantes) del anticuerpo multiespecífico se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos. Dichas modificaciones se pueden realizar, sin embargo, solo en un intervalo muy limitado, por ejemplo, como se describe anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de los anticuerpos mencionadas anteriormente, tales como el isotipo IgG y la unión al antígeno, pero pueden mejorar aún más el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de las proteínas o facilitar la purificación. En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoácidas conservadoras.

35 Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

- 50 (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 55 (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- 60 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Tabla 1 - Aminoácidos con propiedades específicas

Aminoácido	3 letras	1 letra	Polaridad de cadena lateral	Carga de cadena lateral (pH 7,4)
Alanina	Ala	A	apolar	neutro
Arginina	Arg	R	polar básico	positivo
Asparagina	Asn	N	polar	neutro
Ácido aspártico	Asp	D	polar ácido	negativo
Cisteína	Cys	C	apolar	neutro
Ácido glutámico	Glu	E	polar ácido	negativo
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro
Glicina	Gly	G	apolar	neutro
Histidina	His	H	polar básico	positivo (10 %) neutro (90 %)
Isoleucina	Ile	I	apolar	neutro
Leucina	Leu	L	apolar	neutro
Lisina	Lys	K	polar básico	positivo
Metionina	Met	M	apolar	neutro
Fenilalanina	Phe	F	apolar	neutro
Prolina	Pro	P	apolar	neutro
Serina	Ser	S	polar	neutro
Treonina	Thr	T	polar	neutro
Triptófano	Trp	W	apolar	neutro
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro
Valina	Val	V	apolar	neutro

5 La expresión "célula huésped", como se usa en la presente solicitud, indica cualquier tipo de sistema celular que se puede genomanipular para generar los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En un modo de realización, se usan células HEK293 y células CHO como células huésped. Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y todas de dichas designaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica para la que se ha realizado el cribado en la célula transformada inicialmente. Cuando se pretenden designaciones distintas, quedará claro en el contexto.

15 La expresión en células NS0 se describe, por ejemplo, por Barnes, L.M., *et al.*, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., *et al.*, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, por Durocher, Y., *et al.*, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., *et al.*, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK 293) se describe por Schlaeger, E.J., y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.J., en J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

20 Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

25 Un ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia precursora o secuencia líder secretora está enlazado de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una proteína precursora que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si está situado de modo que facilite la traducción. En general, "enlazado de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, que son contiguas y están en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se consigue por unión en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, entonces se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

35 La purificación de anticuerpos se realiza para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandedo

de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase Ausubel, F., *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987). Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio en modo mixto), adsorción tiófila (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenófilas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente documento se divulga el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de una composición farmacéutica. En el presente documento también se divulga un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéutico" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para su administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, raquídea o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

Una composición de la presente invención se puede administrar por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la técnica, la ruta y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas rutas de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones tampón salinas y acuosas. Los vehículos farmacéuticos incluyen soluciones acuosas o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, quieren decir modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

El término cáncer como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón de tipo bronquioloalveolar, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma endometrial, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de partes blandas, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores de la médula espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma hipofisario y sarcoma de Ewing, incluyendo versiones resistentes al tratamiento de cualquiera de los cánceres anteriores o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, se puede producir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Independientemente de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden variar las concentraciones de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sean tóxicas para el paciente. La concentración de dosificación seleccionada dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y antecedentes médicos anteriores del paciente que se trata, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición sea administrable mediante jeringuilla. Además del agua, el vehículo es preferentemente una solución salina tamponada isotónica.

La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición.

El término "transformación", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una célula huésped. Si se usan células sin formidables barreras de la pared celular como células huésped, la transfección se lleva a cabo, por ejemplo, mediante el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio como se describe por Graham y Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546 y siguientes. Sin embargo, también se pueden usar otros procedimientos para introducir ADN en células, tal como por inyección nuclear o por fusión de protoplastos. Si se usan células procariotas o células que contienen construcciones de pared celular sustanciales, por ejemplo, un procedimiento de transfección es el tratamiento con calcio usando cloruro de calcio como se describe por Cohen, F.N., *et al.*, *PNAS* 69 (1972) 7110 y siguientes.

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el que un ácido nucleico se transcribe en ARNm y/o al proceso por el que el ARNm transcrito (también denominado transcrito) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan conjuntamente producto génico. Si el polinucleótido se deriva del ADN genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el ajuste del ARNm.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular autorreplicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones como se describe.

Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula huésped apropiada, se puede transcribir y traducir en un polipéptido. Un "sistema de expresión" normalmente se refiere a una célula huésped adecuada compuesta de un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

En lo que sigue, se enumeran modos de realización específicos de la invención:

1. Un anticuerpo multiespecífico de subclase IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana, que comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno; y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y en el que los dominios variables VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y

en el que

en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

2. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 1,

en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el que en el dominio constante

CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

- 5 3. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 2,
en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat);
- 10 y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 15 4. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 1,
en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 20 5. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 1,
en el que en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat); y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 25 6. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 3,
en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat),
- 30 y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 35 7. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que los dominios constantes CL de la primera cadena ligera en a) y la segunda cadena ligera en b) son de isotipo kappa.
- 40 8. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 6, en el que el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) es de isotipo lambda y el dominio constante CL de la segunda cadena ligera en b) es de isotipo kappa.
- 45 9. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 6, en el que los dominios constantes CL de la primera cadena ligera en a) y la segunda cadena ligera en b) son de isotipo lambda.
- 50 10. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, en el que en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera en b), en el que el aminoácido en la posición 124 no se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) y que es de isotipo kappa, el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (en un modo de realización preferente por ácido glutámico (E)) (numeración de acuerdo con Kabat).
- 55 11. El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes, caracterizado por que un primer dominio CH3 de la primera cadena pesada del anticuerpo en a) y un segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada del anticuerpo en b) se encuentran cada uno en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo, en el que dicha interfase se altera para promover la formación del anticuerpo multiespecífico, en el que la alteración se caracteriza por que:
- 60 i) el dominio CH3 de una cadena pesada se altera, de modo que, dentro de la interfase original del dominio CH3 de la una cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico, se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen mayor de la cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de la una cadena pesada que se puede situar en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada; y
- 65

- ii) el dominio CH3 de la otra cadena pesada se altera, de modo que, dentro de la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la una cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico, se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen más pequeño de la cadena lateral, generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro de la que se puede situar una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de la una cadena pesada.
- 5
12. El anticuerpo de acuerdo con el modo de realización 11, caracterizado por que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen mayor de la cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), y dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen más pequeño de la cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).
- 10
13. El anticuerpo de acuerdo con los modos de realización 11 o 12, caracterizado por que ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de modo que se puede formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.
- 15
14. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes en el que el anticuerpo es biespecífico.
- 20
15. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes que se une específicamente a TWEAK humano y que se une específicamente a IL17 humana, en el que
- A) el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24, y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 25; y
- 25
- B) el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 26, y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 27.
16. Un anticuerpo biespecífico que comprende
- 30
- a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a un TWEAK humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24, y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 25; y
- 35
- b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a una IL-17 humana, que comprende un dominio de cadena pesada variable (VH) de SEQ ID NO: 26, y un dominio de cadena ligera variable (VL) de SEQ ID NO: 27; en el que los dominios variables VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y
- 40
- en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 45
17. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con el modo de realización 17, en el que
- en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat); y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 50
18. Un anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 15 a 17 para su uso en el tratamiento del cáncer, o enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, artropatía psoriásica, enfermedades musculares, por ejemplo, distrofia muscular, esclerosis múltiple, enfermedades renales crónicas, enfermedades óseas, por ejemplo, degeneración ósea en mieloma múltiple, lupus eritematoso diseminado, nefritis lúpica y lesión vascular.
- 55
19. Uso de un anticuerpo de acuerdo con uno de los modos de realización 15 a 17 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, o enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, artropatía psoriásica, enfermedades musculares, por ejemplo, distrofia muscular, esclerosis múltiple, enfermedades renales crónicas, enfermedades óseas, por ejemplo, degeneración ósea en mieloma múltiple, lupus eritematoso diseminado, nefritis lúpica y lesión vascular.
- 60
- 65

20. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 17, caracterizado por que dicho anticuerpo es de la subclase IgG1 humana o IgG4 humana.
- 5 21. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno de los modos de realización 1 a 17 y 20, caracterizado por ser de subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 10 22. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 17 y 20 a 21, caracterizado por ser de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 15 23. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes 1 a 17 y 20, caracterizado por ser de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P y L235E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 20 24. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 17, y 20 a 23, caracterizado por ser de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 25 25. Un procedimiento para la preparación de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 17 y 20 a 23, que comprende las etapas de
- 25 A) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican
- 30 a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno; y
- b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y en el que los dominios variables VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y
- 35 en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat);
- 40 B) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
- C) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.
- 45 26. Ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 17 y 20 a 23.
- 50 27. Vector de expresión que contiene el ácido nucleico de acuerdo con el modo de realización 26 que puede expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped.
- 55 28. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con el modo de realización 27.
29. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 17 y 20 a 23 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 60 30. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización 1 a 10, y 14 a 17, en el que el anticuerpo comprende al menos dos fragmentos Fab, en el que el primer fragmento Fab comprende al menos un sitio de unión a antígeno específico para un primer antígeno; y el segundo fragmento Fab comprende al menos un sitio de unión a antígeno específico para un segundo antígeno, en el que en el segundo fragmento Fab los dominios variables VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí; y en el que el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de un dominio Fc.
- 65 31. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 30, en el que el anticuerpo comprende de dos a cuatro fragmentos Fab.

32. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el modo de realización 30 o 31, en el que el anticuerpo se une específicamente a Ang-2 y VEGF humanos.

5 33. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped del modo de realización 32 de modo que se produzca el anticuerpo.

34. El procedimiento del modo de realización 33, que comprende además recuperar el anticuerpo de la célula huésped.

10 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de esta se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las secuencias de aminoácidos

- 15 **SEQ ID NO: 1** cadena ligera (LC) <Ang-2> natural (wt)
- SEQ ID NO: 2** cadena pesada (HC) <Ang-2> natural (wt)
- SEQ ID NO: 3** cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt)
- 20 **SEQ ID NO: 4** cadena ligera (LC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt)
- SEQ ID NO: 5** cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución Q124K
- 25 **SEQ ID NO: 6** cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E
- SEQ ID NO: 7** cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K213E
- SEQ ID NO: 8** cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución E123K
- 30 **SEQ ID NO: 9** cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución Q124K y sustitución E123K
- SEQ ID NO: 10** cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E y sustitución K213E
- SEQ ID NO: 11** cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución Q124R y sustitución E123K
- 35 **SEQ ID NO: 12** cadena ligera (LC) <VEGF> con sustitución Q124E
- SEQ ID NO: 13** cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución E124K y sustitución E123K
- 40 **SEQ ID NO: 14** cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E y sustitución K213D
- SEQ ID NO: 15** cadena ligera (LC) <IL-17> natural (wt)
- SEQ ID NO: 16** cadena pesada (HC) <IL-17> natural (wt)
- 45 **SEQ ID NO: 17** cadena pesada (HC) <TWEAK> con intercambio de VH-VL natural (wt)
- SEQ ID NO: 18** cadena ligera (LC) <TWEAK> con intercambio de VH-VL natural (wt)
- 50 **SEQ ID NO: 19** cadena ligera (LC) <IL-17> con sustitución Q124K y sustitución E123R
- SEQ ID NO: 20** cadena pesada (HC) <IL-17> con sustitución K147E y sustitución K213E
- SEQ ID NO: 21** cadena ligera (LC) <TWEAK> con sustitución Q124E
- 55 **SEQ ID NO: 22** cadena pesada (HC) <IL-17> con sustitución K147E y sustitución K213D
- SEQ ID NO: 23** cadena ligera (LC) <IL-17> con sustitución Q124K y sustitución E123K
- 60 **SEQ ID NO: 24** dominio de cadena pesada variable VH <TWEAK > 305-HC4
- SEQ ID NO: 25** dominio de cadena ligera variable VL <TWEAK> 305-LC2
- SEQ ID NO: 26** dominio de cadena pesada variable VH <IL-17> HC136
- 65 **SEQ ID NO: 27** dominio de cadena ligera variable VL <IL-17> LC136

- SEQ ID NO: 28** cadena pesada (HC) <TWEAK> con intercambio de VH-VL natural (wt) (que comprende el dipéptido GK terminal)
- 5 **SEQ ID NO: 29** cadena pesada (HC) <IL-17> con sustitución K147E y sustitución K213E (que comprende el dipéptido GK terminal)
- SEQ ID NO: 30** cadena pesada (HC) <IL-17> con sustitución K147E y sustitución K213D (que comprende el dipéptido GK terminal)
- 10 **SEQ ID NO: 31** cadena pesada (HC) <Ang-2> natural (wt) (que comprende el dipéptido GK terminal)
- SEQ ID NO: 32** cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt) (que comprende el dipéptido GK terminal)
- 15 **SEQ ID NO: 33** cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E (que comprende dipéptido GK terminal)
- SEQ ID NO: 34** cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K213E (que comprende dipéptido GK terminal)
- 20 **SEQ ID NO: 35** cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E y sustitución K213E (que comprende el dipéptido GK terminal)
- SEQ ID NO: 36** cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E y sustitución K213D (que comprende el dipéptido GK terminal)
- 25 **SEQ ID NO: 37** cadena pesada (HC) <IL-17> natural (wt) (que comprende el dipéptido GK terminal)
- SEQ ID NO: 38** cadena pesada (HC) de Fab₂-CrossFab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <Ang-2> naturales (wt) acopladas a una cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt) por medio de conectores de glicina-serina
- 30 **SEQ ID NO: 39** cadena pesada (HC) de Fab₂-CrossFab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <Ang-2> con sustituciones K147E y K213E acopladas a una cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt) por medio de conectores de glicina-serina
- 35 **SEQ ID NO: 40** cadena pesada (HC) de CrossFab-Fab que incluye una cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt) acoplada a una cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustituciones K147E y K213E por medio de conectores de glicina-serina
- 40 **SEQ ID NO: 41** cadena pesada (HC) de CrossFab-Fab que incluye una cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt) acoplada a una cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustituciones K147E y K213E por medio de conectores de glicina-serina
- 45 **SEQ ID NO: 42** cadena pesada (HC) de CrossFab2-Fab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt) acopladas a una cadena pesada (HC) <Ang-2> natural (wt) por medio de conectores de glicina-serina
- SEQ ID NO: 43** cadena pesada (HC) de CrossFab2-Fab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt) acopladas a una cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustituciones K147E y K231E por medio de conectores de glicina-serina
- 50 **SEQ ID NO: 44** cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL con sustitución K147E
- SEQ ID NO: 45** cadena ligera (LC) <VEGF> con intercambio de VH-VL con sustitución Q124K
- 55 **SEQ ID NO: 46** cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL con sustitución K147E y K213E
- SEQ ID NO: 47** cadena ligera (LC) <VEGF> con intercambio de VH-VL con sustitución E123K y Q124K

60 **Ejemplos**

Materiales y procedimientos

65 La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de cadenas de anticuerpos están numerados y se

mencionan de acuerdo con los sistemas de numeración de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) como se define anteriormente.

5 Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10

Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos preparados por síntesis química. Los segmentos génicos de longitud de 600-1800 pb, que estaban flanqueados por sitios singulares de escisión de endonucleasas de restricción, se ensamblaron por hibridación y unión de oligonucleótidos, incluyendo amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron por medio de los sitios de restricción indicados, por ejemplo, KpnI/SacI o AscI/PacI en un vector de clonación pGA4 basado en pPCRScript (Stratagene). Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmaron por secuenciación de ADN. Los fragmentos de síntesis génica se ordenaron de acuerdo con las especificaciones dadas en Genearth (Regensburg, Alemania).

15

20

Determinación de las secuencias de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria realizada en MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).

25

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

Se usaron el paquete de programa informático de GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), versión 10.2 y el paquete Vector NTI Advance, versión 8.0 de Infomax, para la creación, cartografiado, análisis, anotación e ilustración de secuencias.

30

Vectores de expresión

Para la expresión de los anticuerpos descritos, se aplicaron variantes de plásmidos de expresión para células con expresión transitoria (por ejemplo, en HEK293 EBNA o HEK293-F) basada en una organización de ADNc con o sin un promotor de CMV-Intrón A o en una organización genómica con un promotor de CMV.

35

Además del casete de expresión de anticuerpos, los vectores contenían:

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

La unidad de transcripción de gen del anticuerpo se componía de los siguientes elementos:

45

- sitio(s) de restricción único(s) en el extremo 5'
- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano,
- 50 - seguido de la secuencia del Intrón A en el caso de la organización del ADNc,
- una región no traducida en 5' derivada de un gen de anticuerpo humano,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina,
- 55 - la cadena de anticuerpo humano (natural o con intercambio de dominios) como ADNc o como organización genómica con la organización exón-intrón de inmunoglobulina
- una región no traducida en 3' con una secuencia señal de poliadenilación, y
- 60 - sitio(s) de restricción único(s) en el extremo 3'.

Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpo como se describe a continuación se generaron por PCR y/o síntesis génica y se ensamblaron mediante procedimientos y técnicas recombinantes conocidos mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, usando sitios de restricción únicos en los vectores respectivos. Las secuencias de ácido nucleico subclonadas se verificaron mediante secuenciación de ADN. Para las

65

transfecciones transitorias, se prepararon mayores cantidades de los plásmidos mediante la preparación del plásmido a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Técnicas de cultivo celular

5

Se usaron técnicas estándar de cultivo celular como se describe en *Current Protocols in Cell Biology* (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

10

Se expresaron anticuerpos multiespecíficos mediante cotransfección transitoria de los plásmidos de expresión respectivos en HEK293-EBNA de crecimiento adherente o en células HEK29-F que crecen en suspensión como se describe a continuación.

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-EBNA

15

Se expresaron anticuerpos multiespecíficos mediante cotransfección transitoria de los plásmidos de expresión respectivos (por ejemplo, que codifican la cadena pesada y pesada modificada, así como la cadena ligera y ligera modificada correspondiente) en células HEK293-EBNA de crecimiento adherente (línea celular de riñón embrionario humano 293 que expresa el antígeno nuclear para el virus de Epstein-Barr; número de depósito de American Type Culture Collection ATCC n.º CRL-10852, Lote 959 218) cultivado en DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco, Gibco®) complementado con Ultra Low IgG FCS al 10 % (suero de bovino fetal, Gibco®), L-Glutamina 2 mM (Gibco®), y 250 µg/ml de geneticina (Gibco®). Para la transfección, se usó el reactivo de transfección FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) en una proporción de reactivo FuGENE™ (µl) con respecto a ADN (µg) de 4:1 (con un intervalo de 3:1 a 6:1). Se expresaron proteínas a partir de los plásmidos respectivos usando una proporción molar de plásmidos que codifican cadena ligera y cadena pesada (modificada y natural) de 1:1 (equimolar) que varía de 1:2 a 2:1, respectivamente. Se alimentaron las células el día 3 con L-glutamina a 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco®]. Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpo multiespecífico se recogieron del día 5 al 11 después de la transfección mediante centrifugación y se almacenaron a -20 °C. La información general con respecto a la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas en, por ejemplo, células HEK293 se proporciona en: Meissner, P. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

30

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

Se generaron anticuerpos multiespecíficos mediante transfección transitoria con los plásmidos respectivos (por ejemplo, que codificaban la cadena pesada y pesada modificada, así como la cadena ligera y ligera modificada correspondiente) usando el sistema HEK293-F (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se transfectaron células HEK293-F (Invitrogen) que crecían en suspensión en un matraz de agitación o en un fermentador agitado en un medio de expresión FreeStyle™ 293 sin suero (Invitrogen) con una mezcla de los cuatro plásmidos de expresión y 293fectin™ o fectina (Invitrogen). Para un matraz de agitación de 2 l (Coming), se sembraron células HEK293-F a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/ml en 600 ml y se incubaron a 120 rpm, 8 % de CO₂. El día después de que las células se transfectaran a una densidad celular de aprox. $1,5 \times 10^6$ células/ml con aprox. 42 ml de mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 µg de ADN plasmídico total (1 µg/ml) que codificaba la cadena pesada o pesada modificada, respectivamente, y la cadena ligera correspondiente en una proporción equimolar y B) 20 ml de Opti-MEM +1,2 ml de 293fectin o Fectin (2 µl/ml). De acuerdo con el consumo de glucosa, se le añadió solución de glucosa durante el transcurso de la fermentación. El sobrenadante que contenía el anticuerpo secretado se recogió después de 5-10 días y los anticuerpos se purificaron directamente a partir del sobrenadante o el sobrenadante se congeló y se almacenó.

45

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de los anticuerpos purificados se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al.*, *Protein Science*, 1995, 4, 2411-1423.

50

Determinación de la concentración de anticuerpos en sobrenadantes

La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se estimó mediante inmunoprecipitación con microesferas de proteína A agarosa (Roche). Se lavaron tres veces 60 µl de microesferas de proteína A agarosa en TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 al 1 %). Posteriormente, se aplicaron 1-15 ml de sobrenadante de cultivo celular a las microesferas de proteína A agarosa equilibradas previamente en TBS-NP40. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las microesferas se lavaron en una columna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) una vez con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato 2x (PBS 2x, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de citrato de Na 100 mM, pH 5,0. El anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de 35 µl de tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen). La mitad de la muestra se combinó con el agente reductor de muestras NuPAGE® o se dejó sin reducir, respectivamente, y se calentó durante 10 min a 70 °C. En consecuencia, se aplicaron 5-30 µl a un 4-12 % de NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (con tampón MOPS para SDS-PAGE en condiciones no reductoras y tampón MES con aditivo de tampón de migración NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen) para SDS-PAGE en condiciones reductoras) y se tiñó con azul de Coomassie.

65

La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se midió cuantitativamente mediante cromatografía HPLC de afinidad. En resumen, se aplicaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos y derivados que se unen a Proteína A a una columna de Applied Biosystems Poros A/20 en KH₂PO₄ 200 mM, citrato de sodio 100 mM, pH 7,4 y se eluyeron de la matriz con NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM, pH 2,5, en un sistema Agilent HPLC 1100. Se cuantificó la proteína eluida por absorbancia UV e integración de áreas de picos. Un anticuerpo IgG1 estándar purificado sirvió como patrón.

De forma alternativa, la concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se midió mediante ELISA no competitivo de IgG. En resumen, se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche) con 100 µl/pocillo de molécula de captura de IgG antihumana biotinilada F(ab')₂-h-Fcy> BI (Dianova) a 0,1 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente o, de forma alternativa, durante la noche a 4 °C y posteriormente se lavan tres veces con 200 µl/pocillo de PBS, Tween al 0,05 % (PBST, Sigma). Se añadió a los pocillos 100 µl/pocillo de una serie de dilución en PBS (Sigma) del sobrenadante de cultivo celular que contenía el anticuerpo respectivo y se incubó durante 1-2 horas en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo unido se detectó con 100 µl de F(ab')₂-h-Fcy>POD (Dianova) a 0,1 µg/ml como anticuerpo de detección durante 1-2 horas en un agitador de placas de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se lavó tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detectó mediante la adición de 100 µl de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se realizó en un espectrómetro Fluor Tecan a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

Purificación de proteínas

Se purificaron proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados en referencia a los protocolos estándar. En resumen, se aplicaron anticuerpos a una columna de proteína A Sepharose (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. La elución de los anticuerpos se logró a pH 2,8 seguido de neutralización inmediata de la muestra. La proteína agregada se separó de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200; GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0. Se combinaron las fracciones de los anticuerpos monoméricos, se concentraron (si era necesario) usando, por ejemplo, un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), se congelaron y se almacenaron a -20 °C o -80 °C. Parte de las muestras se proporcionaron para el análisis de proteínas posterior y la caracterización analítica, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (CET) o espectrometría de masas.

SDS-PAGE

El sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen Corp.) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usó un 10 % o un 4-12 % de geles NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) y un MES NuPAGE® (geles en condiciones reductoras, con aditivo de tampón de migración NuPAGE® Antioxidant) o tampón de migración MOPS (geles en condiciones no reductoras).

Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (CET) para la determinación de la agregación y del estado oligomérico de los anticuerpos por cromatografía HPLC. En resumen, se aplicaron anticuerpos purificados por proteína A a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en PBS 2x en un sistema HPLC Dionex. Se cuantificó la proteína eluida por absorbancia UV e integración de áreas de picos. BioRad Gel Filtration Standard 151-1901 sirvió como patrón.

Espectrometría de masas

Esta sección describe la caracterización de los anticuerpos multiespecíficos con intercambio de VH/VL (VH/VL CrossMabs) con hincapié en su correcto ensamblaje. Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (EM-IEN) de los CrossMab intactos desglucosilados y los CrossMab desglucosilados/digeridos con plasmina o, de forma alternativa, desglucosilados/digeridos con LysC limitada.

Los CrossMab VH/VL se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las digestiones con plasmina o LysC limitada (Roche) se realizaron con 100 µg de CrossMab VH/VL desglucosilados en un tampón Tris pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó por medio de EM-IEN en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

Determinación de la unión y afinidad de unión de anticuerpos multiespecíficos a los antígenos respectivos usando resonancia de plasmón de superficie (SPR) (BIAcore)

La unión de los anticuerpos generados a los antígenos respectivos (por ejemplo, ANG2 y VEGF) se investiga mediante resonancia de plasmón de superficie usando un instrumento BIACORE (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). En resumen, para las mediciones de la afinidad se inmovilizan anticuerpos de cabra contra IgG humana, JIR 109-005-098, en un chip CM5 por medio de acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos contra el antígeno respectivo. La unión se mide en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005 %, pH 7,4), 25 °C (o de forma alternativa a 37 °C). Se le añadió antígeno (R&D Systems o interno purificado) en diversas concentraciones en solución. La asociación se midió mediante una inyección de antígeno de 80 segundos a 3 minutos; la disociación se midió lavando la superficie del chip con tampón HBS durante 3-10 minutos y se estimó el valor de KD usando un modelo de unión 1:1 de Langmuir. Los datos de control negativo (por ejemplo, curvas de tampón) se restan de las curvas de muestra para la corrección de la deriva intrínseca respecto al valor de referencia del sistema y para la reducción de la señal-ruido. El programa informático de evaluación de Biacore respectivo se usa para el análisis de 5 sensoigramas y para el cálculo de datos de afinidad.

Ejemplo 1A

Producción y expresión de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) en un brazo de unión y con 10 sustituciones de aminoácidos cargados individuales en la interfase CH1/CL

En un primer ejemplo, se generaron anticuerpos multiespecíficos que se unen a la angiopoyetina-2 (ANG2) humana y al VEGF humano como se describe en la sección de procedimientos generales mediante técnicas clásicas de biología molecular y se expresan de forma transitoria en células HEK293 como se describe anteriormente. En las figuras 1A a C se proporciona un esquema general de estos anticuerpos multiespecíficos respectivos. Para comparación también se prepararon los anticuerpos con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL natural (wt) sin sustitución en la interfase CH1/CL. También se usaron otras sustituciones alternativas en estrecha proximidad en la interfase CH1/CL (mencionadas, por ejemplo, en el documento EP 2647707) para comparación. Los anticuerpos multiespecíficos se expresaron usando 20 plásmidos de expresión que contenían los ácidos nucleicos que codificaban las secuencias de aminoácidos representadas en la tabla 2a.

Tabla 2a: Secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras (LC) y cadenas pesadas (HC) de anticuerpos multiespecíficos anti-Ang2-VEGF Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0396, Ang2VEGF-0397, Ang2VEGF-0394, Ang2VEGF-0395 con intercambio/reemplazo de dominios VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*): naturales (wt) y diferentes combinaciones de sustituciones de aminoácidos cargados individuales

Anticuerpo	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0396	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0397	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0394	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0395	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

Para todas las construcciones, se usó la tecnología de heterodimerización de botones en ojales con una sustitución de botón típica (T366W) en el primer dominio CH3 y las correspondientes sustituciones de ojal (T366S, L368A e Y407V) en el segundo dominio CH3 (así como dos residuos adicionales de cisteína introducidos S354C/Y349'C) (contenido en las respectivas secuencias de cadena pesada (HC) representadas anteriormente)

Ejemplo 1B

Purificación y caracterización de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL 15 (*CrossMab^{Vh-VL}*) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados individuales en la interfase CH1/CL

Los anticuerpos multiespecíficos expresados anteriormente se purificaron del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Todos los anticuerpos multiespecíficos se pueden producir con buenos rendimientos y son estables.

Los productos obtenidos se caracterizaron por su identidad por espectrometría de masas y propiedades analíticas tales como pureza por SDS-PAGE, contenido de monómero y estabilidad.

Espectrometría de masas

Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (EM-IEN) de los CrossMab intactos desglucosilados y los CrossMab desglucosilados/digeridos con plasmina o, de forma alternativa, desglucosilados/digeridos con LysC limitada.

Los CrossMab VH/VL se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las 10 digestiones con plasmina o LysC limitada (Roche) se realizaron con 100 pg de CrossMab VH/VL desglucosilados en un tampón Tris pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó por medio de EM-IEN en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

Los resultados se muestran en la tabla 2 y en la figura 4a.

10

Tabla 2b: Reducción del producto secundario principal de tipo Bence-Jones mediante sustituciones de aminoácidos cargados individuales de acuerdo con la invención en la interfase CH1/CL

	CL ANG-2 (posición 124)	CL ANG-2 (posición 123)	CH1 ANG-2 (posición 147)	CH1 ANG-2 (posición 213)	CH1 VEGF	CL VEGF	Producto secundario principal (emparejamiento incorrecto de tipo Bence-Jones) % por EM
Ang2VEGF-0273	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt	~ <u>20</u>
Ang2VEGF-0396	Q124K	wt	K147E	wt	wt	wt	~ <u>3</u>
Ang2VEGF-0397	Q124K	wt	wt	K213E	wt	wt	~ <u>3</u>
Ang2VEGF-0394	wt	E123K	K147E	wt	wt	wt	~ <u>15</u>
Ang2VEGF-0395	wt	E123K	wt	K213E	wt	wt	~ <u>15</u>

Los resultados en la tabla 2b y la figura 4a muestran que con las sustituciones de aminoácidos cargados individuales con la carga opuesta en los dominios CH1 y CL de acuerdo con la invención/como se describe para la invención (par CL:Q124K y CH1:K147E; o par CL:Q124K y CH1:K213E) el producto secundario principal (emparejamiento incorrecto de tipo Bence-Jones) se reduce fuertemente cuando se compara con el anticuerpo multiespecífico natural sin dichas sustituciones (reducción de ~17 %). Con otras 10 sustituciones en estrecha proximidad (par CL:Q123K y CH1:K147E; o par CL:Q123K y CH1:K213E) solo una ligera reducción del producto secundario principal en comparación con el anticuerpo multiespecífico natural sin dichas sustituciones (reducción de ~5 %).

20

Ejemplo 1C

Propiedades de unión a antígeno de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (CrossMab^{Vh-VL}) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados individuales en la interfase CH1/CL

25

La unión de los anticuerpos multiespecíficos de los ejemplos previos 1A y 1B a sus respectivos antígenos diana, es decir, ANG2 y VEGF, se evaluó mediante Biacore®.

30

La unión de VEGF se evaluó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se investigó la unión de los anticuerpos indicados contra VEGFA-121 humano mediante resonancia de plasmón de superficie usando un instrumento BIACORE® T200 (GE Healthcare). Alrededor de 10 000 (UR) de anticuerpo anti-His (1 µg/ml de anticuerpo anti-His; código de pedido: 28995056; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) se acoplaron en un chip Serie S CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de aminas suministrado por GE Healthcare. se usó HBS-N (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, GE Healthcare) como tampón de migración durante el procedimiento de inmovilización. Para la siguiente caracterización cinética, la muestra y el tampón de migración fueron PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween20 al 0,05 %) a pH 7,4. La cubeta de lectura se fijó a 25 °C y el bloque de muestra se fijó a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración antes de la caracterización cinética.

35

40

VEFGA-121-His se capturó inyectando una solución de 0,5 µg/ml durante 30 s a un caudal de 5 µl/min. Se midió la asociación mediante inyección de los anticuerpos indicados en diversas concentraciones en solución durante 180 s a un caudal de 30 µl/min, comenzando con 1000 nM en diluciones seriadas 1:3. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 600 s y se desencadenó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró mediante un lavado de 60 s con una solución de glicina a pH 1,5 a un caudal de 30 µl/min. Las diferencias en el índice de refracción aparente se corrigieron restando la respuesta obtenida a partir de una superficie de anticuerpo anti-His. También se restan las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de K_D y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

45

50

La unión a Ang-2 se evaluó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se investigó la unión de los anticuerpos indicados contra Ang-2-RBD-Fc humano mediante resonancia de plasmón de superficie usando un instrumento BIACORE® T200 (GE Healthcare). Alrededor de 8000 (UR) de anticuerpo de cabra anti-F(ab')₂ humano (10 µg/ml de anti-F(ab')₂ humano; código de pedido: 28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) se acoplaron en un chip Serie S CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de aminas suministrado por GE Healthcare. Se usó HBS-N (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, GE Healthcare) como tampón de migración durante el procedimiento de inmovilización. Para la siguiente caracterización cinética, la muestra y el tampón de migración fueron PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween20 al 0,05 %) a pH 7,4. La cubeta de lectura se fijó a 25 °C y el bloque de muestra se fijó a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración antes de la caracterización cinética.

El anticuerpo biespecífico se capturó inyectando una solución 5 nM durante 25 s a un flujo de 5 µl/min. Se midió la asociación mediante inyección de Ang2-RBD-Fc humano en diversas concentraciones en solución durante 120 s a un caudal de 30 µl/min, comenzando con 100 nM en diluciones seriadas 1:3. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 180 s y se desencadenó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró mediante un lavado de 60 s con una solución de glicina a pH 2,1 a un caudal de 30 µl/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie de anticuerpo de cabra anti-F(ab')₂ humano. También se restan las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de K_D aparente se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

Como ejemplo comparativo, se evaluó en paralelo un anticuerpo de referencia que se une específicamente a Ang2 y VEGF que comprende un intercambio/reemplazo de dominios VH/VL pero que carece de sustituciones de aminoácidos cargados (anticuerpo Ang2VEGF-0273 de la **tabla 2b**).

Los resultados se indican en las **tablas 2c y 2d**.

Tabla 2c: Afinidad por VEGF de los anticuerpos indicados

Muestra	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0396	3
Ang2VEGF-0397	4
Ang2VEGF-0394	3
Ang2VEGF-0395	4

Tabla 2d: Afinidad por Ang2 de los anticuerpos indicados

Muestra	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0396	17
Ang2VEGF-0397	14
Ang2VEGF-0394	12
Ang2VEGF-0395	15

Todos los anticuerpos sometidos a prueba se unen específicamente a ambas dianas, Ang2 y VEGF, y presentan una afinidad por el antígeno en el intervalo nanomolar.

Ejemplo 1D

Estabilidad de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (CrossMAb^{Vh-VL}) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados individuales en la interfase CH1/CL

Para evaluar la estabilidad de las construcciones de anticuerpos, se evaluaron la estabilidad térmica así como las temperaturas de inicio de la agregación de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Se prepararon muestras de los anticuerpos indicados a una concentración de 1 mg/ml en histidina/cloruro de histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, se transfirieron a una matriz de microcubetas de 10 µl y se registraron datos de dispersión de luz estática, así como datos de fluorescencia tras excitación con un láser de 266 nm con un instrumento Optim1000 (Avacta Inc.), mientras que las muestras se calentaron a una tasa de 0,1 °C/min de 25 °C a 90 °C.

La temperatura de inicio de la agregación (T_{agg}) se define como la temperatura a la que se empieza a incrementar la intensidad de la luz dispersada. La temperatura de fusión (T_m) se define como el punto de inflexión en un gráfico de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda.

5 Los resultados se muestran en la **tabla 2e**.

Tabla 2e: Temperatura de inicio de la agregación (T_{agg}) y temperatura de fusión (T_m) de los anticuerpos indicados

Muestra	T_{agg} (°C)	T_m (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0396	56,9	62,0
Ang2VEGF-0397	56,0	61,7
Ang2VEGF-0394	56,9	62,2
Ang2VEGF-0395	56,8	62,1

10 **Ejemplo 1E**

Rendimiento de producción de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMab*^{Vh-VL}) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados individuales en la interfase CH1/CL

15

Los rendimientos de producción de los anticuerpos multiespecíficos indicados se evaluaron después de la purificación de Proteína A (ProtA). Los resultados se muestran en la **tabla 2f**.

Tabla 2e: Rendimientos de producción [mg/l de sobrenadante] de los anticuerpos indicados

20

Muestra	ProtA
Ang2VEGF-0273	65
Ang2VEGF-0396	80,8
Ang2VEGF-0397	68,4
Ang2VEGF-0394	79,2
Ang2VEGF-0395	93,6

Ejemplo 2A

25

Producción y expresión de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMab*^{Vh-VL}) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL

30

En un primer ejemplo, se generaron anticuerpos multiespecíficos que se unen a la angiopoyetina-2 (ANG2) humana y al VEGF humano como se describe en la sección de procedimientos generales mediante técnicas clásicas de biología molecular y se expresan de forma transitoria en células HEK293 como se describe anteriormente. En las figuras 1A a C se proporciona un esquema general de estos anticuerpos multiespecíficos respectivos. Para comparación también se prepararon los anticuerpos con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL natural (wt) sin sustitución en la interfase CH1/CL. Los anticuerpos multiespecíficos se expresaron usando plásmidos de expresión que contenían los ácidos nucleicos que codificaban las secuencias de aminoácidos representadas en la tabla 3a.

35

Tabla 3a: Secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras (LC) y cadenas pesadas (HC) de anticuerpos multiespecíficos anti-Ang2-VEGF Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0274, Ang2VEGF-0282, Ang2VEGF-0283, Ang2VEGF-0284, Ang2VEGF-0285, Ang2VEGF-0286 con intercambio/reemplazo de dominios VH/VL (*CrossMab*^{Vh-VL}): naturales (wt) y diferentes combinaciones de sustituciones de aminoácidos cargados

40

Anticuerpo	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

Anticuerpo	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

5 Para todas las construcciones, se usó la tecnología de heterodimerización de botones en ojales con una sustitución de botón típica (T366W) en el primer dominio CH3 y las correspondientes sustituciones de ojal (T366S, L368A e Y407V) en el segundo dominio CH3 (así como dos residuos adicionales de cisteína introducidos S354C/Y349'C) (contenido en las respectivas secuencias de cadena pesada (HC) representadas anteriormente).

Ejemplo 2B

10 **Purificación y caracterización de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMab*^{VH-VL}) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL**

15 Los anticuerpos multiespecíficos expresados anteriormente se purificaron del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Todos los anticuerpos multiespecíficos se pueden producir con buenos rendimientos y son estables.

Los productos obtenidos se caracterizaron por su identidad por espectrometría de masas y propiedades analíticas tales como pureza por SDS-PAGE, contenido de monómero y estabilidad.

20 Espectrometría de masas

Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (EM-IEN) de los CrossMab intactos desglucosilados y los CrossMab desglucosilados/digeridos con plasmina o, de forma alternativa, desglucosilados/digeridos con LysC limitada.

25 Los CrossMab VH/VL se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las digestiones con plasmina o LysC limitada (Roche) se realizaron con 100 µg de CrossMab VH/VL desglucosilados en un tampón Tris pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó por medio de EM-IEN en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

Los resultados se muestran en la tabla 17 y en la figura 5a.

35 **Tabla 3b: Reducción del producto secundario principal de tipo Bence-Jones mediante sustituciones de aminoácidos cargados individuales de acuerdo con la invención en la interfase CH1/CL**

	CL ANG-2	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	Producto secundario principal (emparejamiento incorrecto de tipo Bence-Jones) % por EM
Ang2VEGF-0273	wt: Q124 (kappa)	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	~20%
Ang2VEGF-0274	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	wt	0
Ang2VEGF-0282	Q124R	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0283	E124K (lambda)	E123K	K147E	K213E	wt	wt:	0
Ang2VEGF-0284	Q124R	E123K	K147E	K213D	wt	wt	0
Ang2VEGF-0285	Q124R	E123K	K147E	K213D	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0286	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0

40 Los resultados en la tabla 3b y la figura 5a muestran que con las sustituciones dobles de aminoácidos cargados con la carga opuesta en los dominios CH1 y CL de acuerdo con la invención/como se describe para la invención (CL:Q124K/E123K y CH1:K147E/K213E; CL:Q124R/E123K y CH1:K147E/K213E; CL:Q124R/E123K y CH1:K147E/K213D) el producto secundario principal (emparejamiento incorrecto de tipo Bence-Jones) se elimina completamente cuando se compara con el anticuerpo multiespecífico natural sin dichas sustituciones. Esto es independiente de la sustitución individual adicional Q124E en el dominio CL del otro brazo de unión, que no influye en la expresión ni en el perfil de productos secundarios.

Ejemplo 2C

Propiedades de unión a antígeno de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMAB^{Vh-VL}*) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL

5 La unión de los anticuerpos multiespecíficos de los ejemplos previos 2A y 2B a sus respectivos antígenos diana, es decir, ANG2 y VEGF, se evaluó mediante Biacore® como se explica en el ejemplo 1C.

10 Como ejemplo comparativo, se evaluó en paralelo el anticuerpo de referencia que se une específicamente a Ang2 y VEGF que comprende un intercambio/reemplazo de dominios VH/VL pero que carece de sustituciones de aminoácidos cargados (anticuerpo Ang2VEGF-0273 de la **tabla 2b**).

Los resultados se indican en las **tablas 3c y 3d**.

Tabla 3c: Afinidad por VEGF de los anticuerpos indicados

15

Muestra	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0274	3
Ang2VEGF-0282	4
Ang2VEGF-0283	4
Ang2VEGF-0284	4
Ang2VEGF-0285	4
Ang2VEGF-0286	4

Tabla 3d: Afinidad por Ang2 de los anticuerpos indicados

Muestra	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0274	17
Ang2VEGF-0282	14
Ang2VEGF-0283	15
Ang2VEGF-0284	13
Ang2VEGF-0285	14
Ang2VEGF-0286	12

20 Todos los anticuerpos sometidos a prueba se unen específicamente a ambas dianas, Ang2 y VEGF, y presentan una afinidad por el antígeno en el intervalo nanomolar.

Ejemplo 2D

25 **Estabilidad de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMAB^{Vh-VL}*) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados individuales en la interfase CH1/CL**

30 Para evaluar la estabilidad de las construcciones de anticuerpos, se evaluaron la estabilidad térmica así como las temperaturas de inicio de la agregación como se explica en el ejemplo 1D.

Los resultados se muestran en la **tabla 3e**.

Tabla 3e: Temperatura de inicio de la agregación (T_{agg}) y temperatura de fusión (T_m) de los anticuerpos indicados

35

Muestra	T_{agg} (°C)	T_m (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0274	53,5	58,9
Ang2VEGF-0282	56,9	61,4
Ang2VEGF-0283	56,3	61,0
Ang2VEGF-0284	56,3	61,1
Ang2VEGF-0285	56,3	61,1

Muestra	T _{agg} (°C)	T _m (°C)
Ang2VEGF-0286	56,3	61,6

Ejemplo 3A

Producción y expresión de anticuerpos multiespecíficos que se unen a IL-17 y TWEAK con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMab*^{Vh-VL}) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL

En un primer ejemplo, se generaron anticuerpos multiespecíficos que se unen a la IL-17 humana y a TWEAK humano como se describe en la sección de procedimientos generales mediante técnicas clásicas de biología molecular y se expresan de forma transitoria en células HEK293 como se describe anteriormente. En las figuras 1A a C se proporciona un esquema general de estos anticuerpos multiespecíficos respectivos. Para comparación también se prepararon los anticuerpos con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL natural (wt) sin sustitución en la interfase CH1/CL. Los anticuerpos multiespecíficos se expresaron usando plásmidos de expresión que contenían los ácidos nucleicos que codificaban las secuencias de aminoácidos representadas en la tabla 4a.

Tabla 4a: Secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras (LC) y cadenas pesadas (HC) de anticuerpos multiespecíficos anti-TWEAK-IL17 TweakIL17-0096, TweakIL17-0097, TweakIL17-0098, TweakIL17-0099, TweakIL17-0100, TweakIL17-0101 con intercambio/reemplazo de dominios VH/VL (*CrossMab*^{Vh-VL}): naturales (wt) y diferentes combinaciones de sustituciones de aminoácidos cargados

Anticuerpo	LC IL17	HC IL17	HC TWEAK	LC TWEAK
TweakIL 17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL 17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL 17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL 17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL 17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL 17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

Para todas las construcciones, se usó la tecnología de heterodimerización de botones en ojales con una sustitución de botón típica (T366W) en el primer dominio CH3 y las correspondientes sustituciones de ojal (T366S, L368A e Y407V) en el segundo dominio CH3 (así como dos residuos adicionales de cisteína introducidos S354C/Y349C) (contenido en las respectivas secuencias de cadena pesada (HC) representadas anteriormente).

Ejemplo 3B

Purificación y caracterización de anticuerpos multiespecíficos que se unen a IL-17 y TWEAK con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMab*^{Vh-VL}) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL

Los anticuerpos multiespecíficos expresados anteriormente se purificaron del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Todos los anticuerpos multiespecíficos se pueden producir con buenos rendimientos y son estables.

Los productos obtenidos se caracterizaron por su identidad por espectrometría de masas y propiedades analíticas tales como pureza por SDS-PAGE, contenido de monómero y estabilidad.

Espectrometría de masas

Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (EM-IEN) de los *CrossMab* intactos desglucosilados y los *CrossMab* desglucosilados/digeridos con plasmina o, de forma alternativa, desglucosilados/digeridos con LysC limitada.

Los *CrossMab* VH/VL se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las digestiones con plasmina o LysC limitada (Roche) se realizaron con 100 µg de *CrossMab* VH/VL desglucosilados en un tampón Tris pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó por medio de EM-IEN en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

Los resultados se muestran en la tabla 17 y en la figura 6a.

Tabla 4b: Reducción del producto secundario principal de tipo Bence-Jones mediante sustituciones de aminoácidos cargados individuales de acuerdo con la invención en la interfase CH1/CL

	CL IL17 (posición 124)	CL IL17 (posición 123)	CH1 IL17 (posición 147)	CH1 IL17 (posición 213)	CH1 TWEAK	CL TWEAK (posición 124)	Producto secundario principal (emparejamiento incorrecto de tipo Bence- Jones) % por EM
TweakIL17-0096	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	<u>~20%</u>
TweakIL17-097	Q124K	E123R	K147E	K213E	wt	Q124E	0
TweakIL17-0098	Q124K	E123R	K147E	K213D	wt	wt	0
TweakIL17-0099	Q124K	E123R	K147E	K213D	wt	Q124E	0
TweakIL17-0100	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0
TweakIL17-0101	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	wt	no determ.

5 Los resultados en la tabla 2b y la figura 6a muestran que con las sustituciones dobles de aminoácidos cargados con la carga opuesta en los dominios CH1 y CL de acuerdo con la invención/como se describe para la invención (CL:Q124K/E123R y CH1:K147E/K213E; CL:Q124K/E123R y CH1:K147E/K213D; CL:Q124K/E123K y CH1:K147E/K213E) el producto secundario principal (emparejamiento incorrecto de tipo Bence-Jones) se elimina completamente cuando se compara con el anticuerpo multiespecífico natural sin dichas sustituciones. Esto es independiente de la sustitución individual adicional Q124E en el dominio CL del otro brazo de unión, que no influye en la expresión ni en el perfil de productos secundarios.

Ejemplo 4A

15 **Producción y expresión de anticuerpos multiespecíficos bivalentes y trivalentes que se unen a Ang2 y VEGF, en los que los anticuerpos están desprovistos de fragmentos Fc e incluyen un intercambio/reemplazo de dominios VH/VL en un brazo de unión y una o más sustituciones de aminoácidos cargados en la interfase CH1/CL**

20 En otro ejemplo, se generaron anticuerpos multiespecíficos que se unen a la Ang2 humana y al VEGF humano como se describe en la sección de procedimientos generales mediante técnicas clásicas de biología molecular y se expresan de forma transitoria en células HEK293 como se describe anteriormente. Los anticuerpos generados incluían en el brazo de unión que se une específicamente a VEGF un fragmento Fab con un intercambio de dominios VH/VL y en otro brazo de unión que se une específicamente a Ang2 un fragmento Fab sin intercambios de dominio, mientras que el anticuerpo multiespecífico está desprovisto de un fragmento Fc. En consecuencia, la primera cadena ligera se deriva de un anticuerpo que se une específicamente a Ang2 humano y comprende en la dirección de N terminal a C terminal los dominios VL-CL. Las cadenas pesadas del primer anticuerpo (anti-Ang2) y el segundo (anti-VEGF) están conectadas por medio de un conector peptídico de glicina-serina. En la cadena pesada del anticuerpo que se une específicamente a VEGF, el dominio variable original VH se reemplaza por el dominio variable VL derivado del anticuerpo anti-VEGF. Por tanto, el polipéptido que comprende las cadenas pesadas de los anticuerpos anti-Ang2 y anti-VEGF comprende en la dirección de N terminal a C terminal los dominios VH(Ang2)-CH1(Ang2)-conector-VL(VEGF)-CH1(VEGF). En la cadena ligera que se une específicamente a VEGF humano, el dominio variable original VL se reemplaza por el dominio variable VH derivado del anticuerpo anti-VEGF. Por tanto, la cadena ligera modificada del anticuerpo anti-VEGF comprende en la dirección de N terminal a C terminal los dominios VH-CL. Las sustituciones de los distintos aminoácidos en la interfase CH1/CL se indican en la **tabla 5b**.

35 En este ejemplo, se generaron anticuerpos multiespecíficos de tres estructuras generales:

- 40 i) anticuerpo biespecífico Ang2-VEGF multiespecífico bivalente de un formato CrossFab_{VH-VL}-(Fab) (estructura general indicada en la fig. 7C);
- ii) anticuerpo biespecífico Ang2-VEGF multiespecífico trivalente de un formato (CrossFab_{VH-VL})₂-Fab (estructura general indicada en la fig. 8C (neu));
- 45 iii) anticuerpo biespecífico Ang2-VEGF multiespecífico trivalente de un formato (Fab)₂-CrossFab_{VH-VL};

Para comparación también se preparan los anticuerpos con intercambio/reemplazo de dominios VH/VL naturales (wt) sin sustitución en la interfase CH1/CL. Los anticuerpos multiespecíficos se expresan usando plásmidos de expresión que contienen los ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas en la tabla 5a.

50 **Tabla 5a: Secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras (LC) y cadenas pesadas (HC) de anticuerpos multiespecíficos anti-Ang2-VEGF con intercambio/reemplazo de dominios VH/VL: naturales ("no cargados") y diferentes combinaciones de sustituciones de aminoácidos cargados ("cargados")**

Anticuerpo	LC Ang2	HC	LC VEGF
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-no cargado (Ang2VEGF-0452)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 4
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-cargado (Ang2VEGF-0447)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 4
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>-no cargado (Ang2VEGF-0453)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 4
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-cargado (Ang2VEGF-0448)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 4
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-no cargado	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 4
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-cargado	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 4

Tabla 5b: Sustituciones de aminoácidos en la interfase CH1/CL en los anticuerpos de acuerdo con la invención mencionada en la tabla 5^a

	Ang2				VEGF	
	CL (posición 124)	CL (posición 123)	CH1 (posición 147)	CH1 (posición 213)	CH1	CL (posición 124)
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-no cargado (Ang2VEGF-0452)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-cargado (Ang2VEGF-0447)	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>-no cargado (Ang2VEGF-0453)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-cargado (Ang2VEGF-0448)	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-no cargado	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>-cargado	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt

5

Ejemplo 4B:

Producción y expresión de anticuerpos multiespecíficos bivalentes y trivalentes que se unen a ANG2 y VEGF, en los que los anticuerpos están desprovistos de fragmentos Fc e incluyen un intercambio/reemplazo de dominios VH/VL en un brazo de unión y una o más sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL

10

La proteína secretada se purificó mediante procedimientos estándar usando purificación por afinidad.

Los rendimientos de producción después de la purificación por afinidad y la fracción de la molécula de anticuerpo como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño analítica se indican en la **tabla 5c**.

15

Tabla 5c: Rendimiento de producción y fracción de anticuerpo deseado después de la purificación por afinidad

Anticuerpo	Rendimiento [mg/l]	Fracción [%] de anticuerpo por CET analítica
Ang2VEGF-0452	37,8	64,1
Ang2VEGF-0447	26,7	88,5
Ang2VEGF-0453	4,2	88,5
Ang2VEGF-0448	9,7	92,4

20

Espectrometría de masas: Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (EM-IEN) de los anticuerpos intactos desglucosilados y los anticuerpos desglucosilados/digeridos con plasmina o, de forma alternativa, desglucosilados/digeridos con LysC limitada.

25

Las construcciones VH/VL Fab-CrossFab se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las digestiones con plasmina o LysC limitada (Roche) se realizaron con 100 µg de VH/VL Fab-CrossFab desglucosilados en un tampón Tris pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó por medio de EM-IEN en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

30

Debido a un intervalo de masas superpuesto entre el material proporcionado y nuestros procedimientos de EM, las muestras se adquirieron con dos procedimientos diferentes para ver productos secundarios potenciales en un intervalo de masas mayor. Mientras se trabaja en el intervalo de masas mayor (1000-4000 m/z) el procedimiento incluye voltaje CID (en este caso, un cCID de 90), la medición en el intervalo de masas más bajo (600-2000) no usa CID. Con la aplicación de CID, existe una probabilidad más alta de adquirir fragmentos que aparecen para fragmentar la fuente en el espectrómetro de masas.

Los resultados se muestran en la **tabla 5d**.

Tabla 5d: Productos secundarios de los anticuerpos indicados como se analiza por EM cuantificados relativamente contra la molécula principal deseada

Anticuerpo	Fracción del producto secundario [%] por EM	Producto secundario
Ang2VEGF-0452	6 %	producto secundario con emparejamiento incorrecto con dos cadenas ligeras de Ang2 VL-CL
Ang2VEGF-0447	0	<i>no detectado</i>
Ang2VEGF-0453	4,4 %	producto secundario con emparejamiento incorrecto con tres cadenas ligeras de Ang VL-CL;
	35,7 %	producto secundario con emparejamiento incorrecto con dos cadenas ligeras de Ang VL-CL y una cadena de VEGF VH-CL
Ang2VEGF-0448	0	<i>no detectado</i>

Ejemplo 4C:

Propiedades de unión al antígeno de anticuerpos multiespecíficos bivalentes y trivalentes que se unen a ANG2 y VEGF, en los que los anticuerpos están desprovistos de fragmentos Fc e incluyen un intercambio/reemplazo de dominios VH/VL en un brazo de unión y una o más sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL

La unión de los anticuerpos multiespecíficos de los ejemplos previos 4A y 4B a sus respectivos antígenos diana, es decir, ANG2 y VEGF, se evaluó mediante Biacore®.

La unión de VEGF se evaluó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se investigó la unión de los anticuerpos indicados contra VEGFA-121 humano mediante resonancia de plasmón de superficie usando un instrumento BIACORE® T200 (GE Healthcare). El objetivo de 50 UR de VEGFA-121-His se acoplaron en un chip Serie S C1 (GE Healthcare BR-1005-35) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de aminos suministrado por GE Healthcare. Se usó HBS-N (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, GE Healthcare) como tampón de migración durante el procedimiento de inmovilización. Para la siguiente caracterización cinética, la muestra y el tampón de migración fueron PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween20 al 0,05 %) a pH 7,4. La cubeta de lectura se fijó a 25 °C y el bloque de muestra se fijó a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración antes de la caracterización cinética.

Se midió la asociación mediante inyección del anticuerpo indicado en diversas concentraciones en solución durante 180 s a un caudal de 30 µl/min, comenzando con 100 nM en diluciones seriadas 1:3. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 300 s y se desencadenó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró mediante un lavado de 30 s con una solución de H₃PO₄ (ácido fosfórico) al 0,85 % a un caudal de 30 µl/min. Las diferencias en el índice de refracción aparente se corrigieron restando la respuesta obtenida a partir de una superficie de anticuerpo anti-His. También se restan las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de K_D y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

La unión a Ang-2 se evaluó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se investigó la unión de los anticuerpos indicados contra Ang-2-RBD-Fc humano mediante resonancia de plasmón de superficie usando un instrumento BIACORE® T200 (GE Healthcare). Alrededor de 8000 (UR) de anticuerpo de cabra anti-F(ab')₂ humano (10 µg/ml de anti-F(ab')₂ humano; código de pedido: 28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) se acoplaron en un chip Serie S CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de aminos suministrado por GE Healthcare. Se usó HBS-N (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, GE Healthcare) como tampón de migración durante el procedimiento de inmovilización. Para la siguiente caracterización cinética, la muestra y el tampón de migración fueron PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween20 al 0,05 %) a pH 7,4. La cubeta de lectura se fijó a 25 °C y el bloque de muestra se fijó a 12 °C y se purgó dos veces con tampón de migración antes de la caracterización cinética.

El anticuerpo biespecífico se capturó inyectando una solución 5 nM durante 25 s a un flujo de 5 µl/min. Se midió la asociación mediante inyección de Ang2-RBD-Fc humano en diversas concentraciones en solución durante 120 s a un caudal de 30 µl/min, comenzando con 100 nM en diluciones seriadas 1:3. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 180 s y se desencadenó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró mediante un lavado de 60 s con una solución de glicina a pH 2,1 a un caudal de 30 µl/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie de anticuerpo de cabra anti-F(ab')₂ humano. También se restan las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de K_D aparente y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

Los resultados se indican en las **tablas 5e y 5f**.

Tabla 5e: Afinidad por VEGF de los anticuerpos indicados

Anticuerpo	KD (nM)
Ang2VEGF-0452	0,35
Ang2VEGF-0447	0,36
Ang2VEGF-0453	0,22
Ang2VEGF-0448	0,18

Tabla 5f: Afinidad por Ang2 de los anticuerpos indicados

Anticuerpo	KD (nM)
Ang2VEGF-0452	3
Ang2VEGF-0447	3
Ang2VEGF-0453	5
Ang2VEGF-0448	4

La unión al antígeno no se vio afectada por las mutaciones introducidas en la interfase CH1/CL de los anticuerpos sin Fc.

Ejemplo 5A:

Producción y expresión de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (*CrossMab*^{Vh-VL}) en el brazo de unión de VEGF y con sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL del brazo de unión de VEGF

En otro ejemplo, se generaron anticuerpos multiespecíficos que se unen a la angiopoyetina-2 (ANG2) humana y al VEGF humano como se describe en la sección de procedimientos generales mediante técnicas clásicas de biología molecular y se expresan de forma transitoria en células HEK293 como se describe anteriormente. En estos respectivos anticuerpos multiespecíficos, la sustitución con aminoácidos cargados diferentes está presente dentro de la interfase CH1/CL del brazo de unión que comprende el intercambio/reemplazo de dominios VH/VL. Para comparación también se prepararon los anticuerpos con intercambio/reemplazo de dominios VH/VL naturales (wt) sin sustitución en la interfase CH1/CL. Los anticuerpos multiespecíficos se expresaron usando plásmidos de expresión que contenían los ácidos nucleicos que codificaban las secuencias de aminoácidos representadas en la tabla 6a.

Tabla 6a: Secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras (LC) y cadenas pesadas (HC) de anticuerpos multiespecíficos *anti-Ang2-VEGF* Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0425 y Ang2VEGF-0424 con intercambio/reemplazo de dominios VH/VL (*CrossMab*^{Vh-VL}): naturales (wt) y diferentes combinaciones de sustituciones de aminoácidos cargados

Anticuerpo	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0425	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45
Ang2VEGF-0424	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47

Para todas las construcciones, se usó la tecnología de heterodimerización de botones en ojales con una sustitución de botón típica (T366W) en el primer dominio CH3 y las correspondientes sustituciones de ojal (T366S, L368A e Y407V) en el segundo dominio CH3 (así como dos residuos adicionales de cisteína introducidos S354C/Y349C) (contenido en las respectivas secuencias de cadena pesada (HC) representadas anteriormente).

Ejemplo 5B

Purificación y caracterización de anticuerpos multiespecíficos que se unen a angiopoyetina-2 (ANG2) y VEGF con intercambio/reemplazo de dominio VH/VL (CrossMab^{Vh-VL}) en un brazo de unión y con sustituciones de aminoácidos cargados diferentes en la interfase CH1/CL

5

Los anticuerpos multiespecíficos expresados anteriormente se purificaron del sobrenadante mediante una combinación de cromatografía de afinidad de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Todos los anticuerpos multiespecíficos se pueden producir con buenos rendimientos y son estables.

10

Los productos obtenidos se caracterizaron por su identidad por espectrometría de masas y propiedades analíticas tales como pureza por SDS-PAGE, contenido de monómero y estabilidad.

Espectrometría de masas

15

Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (EM-IEN) de los CrossMab intactos desglucosilados y los CrossMab desglucosilados/digeridos con plasmina o, de forma alternativa, desglucosilados/digeridos con LysC limitada.

20

Los CrossMab VH/VL se desglucosilaron con N-glicosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las digestiones con plasmina o LysC limitada (Roche) se realizaron con 100 µg de CrossMab VH/VL desglucosilados en un tampón Tris pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras se desalaron por medio de HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó por medio de EM-IEN en un sistema de EM maXis 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

25

Los resultados se muestran en la tabla 6b.

Tabla 6b: Perfil de productos secundarios (producto secundario principal de tipo Bence-Jones) mediante sustituciones de aminoácidos cargados individuales en la interfase CH1/CL dentro del brazo de unión que comprende el intercambio/reemplazo de dominios VH/VL

30

	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	molécula deseada	Producto secundario principal (emparejamiento incorrecto de tipo Bence-Jones) % por EM
Ang2VEGF-0273	wt (kappa)	wt	wt K147 K213	wt E123 Q124	<i>n.d.</i>	~20%
Ang2VEGF-0425	wt	wt	K147E	Q124K	72%	22%
Ang2VEGF-0424	wt	wt	K147E K213E	E123K Q124K	64 %	26 %

35

Los resultados en la tabla 6b demuestran que el perfil de productos secundarios (incluido el emparejamiento incorrecto de tipo Bence-Jones) no se pudo mejorar en los anticuerpos biespecíficos Ang2VEGF con sustituciones de aminoácidos en la interfase CH1/CL localizada dentro del brazo de unión que comprende el intercambio/reemplazo de dominios VH/VL.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Anticuerpos multiespecíficos
- <130> P32061-WO
- <150> EP 14163165.5
- 10 <151> 02/04/2014
- <150> EP 14179034.5
- <151> 30/07/2014
- 15 <160> 47
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 215
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> cadena ligera (LC) <Ang-2> natural (wt)
- <400> 1

```

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
          20          25          30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
          35          40          45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50          55          60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
          85          90          95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
          115          120          125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130          135          140
    
```

ES 2 747 749 T3

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 2
<211> 457
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada (HC) <Ang-2> natural (wt)

<400> 2

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

ES 2 747 749 T3

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

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

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

- 5 <210> 3
- <211> 437
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt)

<400> 3

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
100 105 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
195 200 205

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

ES 2 747 749 T3

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365

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

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 385 390 395 400

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro
 435

- 5 <210> 4
- <211> 230
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cadena ligera (LC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt)

<400> 4

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

5 <210> 5
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución Q124K

ES 2 747 749 T3

<400> 5

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Lys Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 6
 <211> 457
 <212> PRT

ES 2 747 749 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E

5

<400> 6

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

ES 2 747 749 T3

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

<210> 7
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K213E

<400> 7

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

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

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

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución E123K

<400>8

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

ES 2 747 749 T3

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución Q124K y sustitución E123K

<400> 9

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

ES 2 747 749 T3

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 10
<211> 457
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E y sustitución K213E

<400> 10

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

ES 2 747 749 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

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

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

- 5 <210> 11
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución Q124R y sustitución E123K

<400> 11

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

ES 2 747 749 T3

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Arg Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

- <210> 12
- 5 <211> 230
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> cadena ligera (LC) <VEGF> con sustitución Q124E
- <400> 12

ES 2 747 749 T3

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

ES 2 747 749 T3

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera (LC) <Ang-2> con sustitución E124K y sustitución E123K

10 <400> 13

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110

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

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

ES 2 747 749 T3

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

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 14
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E y sustitución K213D

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

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

ES 2 747 749 T3

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

ES 2 747 749 T3

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

<210> 15
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera (LC) <IL-17> natural (wt)

<400> 15

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

ES 2 747 749 T3

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

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

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

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

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

<210> 16
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada (HC) <IL-17> natural (wt)
 <400> 16

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

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

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

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

ES 2 747 749 T3

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 17
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada (HC) <TWEAK> con intercambio de VH-VL natural (wt)
 <400> 17

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
 85 90 95

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

ES 2 747 749 T3

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335

ES 2 747 749 T3

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365

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

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

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435

- 5 <210> 18
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cadena ligera (LC) <TWEAK> con intercambio de VH-VL natural (wt)

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
 50 55 60

Asn Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ES 2 747 749 T3

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

- <210> 19
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> cadena ligera (LC) <IL-17> con sustitución Q124K y sustitución E123R
- <400> 19

ES 2 747 749 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
 115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

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

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

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

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

<210> 20
 <211> 446
 <212> PRT

ES 2 747 749 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada (HC) <IL-17> con sustitución K147E y sustitución K213E

5

<400> 20

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

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

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

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

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

<210> 21
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera (LC) <TWEAK> con sustitución Q124E

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
 50 55 60

Asn Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Glu Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

ES 2 747 749 T3

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

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

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 22
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada (HC) <IL-17> con sustitución K147E y sustitución K213D

<400> 22

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

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

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

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

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

5

10

ES 2 747 749 T3

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Asp Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 23
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> cadena ligera (LC) <IL-17> con sustitución Q124K y sustitución E123K
- <400> 23

ES 2 747 749 T3

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

- 5 <210> 24
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 747 749 T3

<220>

<223> dominio de cadena pesada variable VH <TWEAK > 305-HC4

<400> 24

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
 50 55 60

Asn Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

5 Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25

<211> 111

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio de cadena ligera variable VL <TWEAK> 305-LC2

15 <400> 25

ES 2 747 749 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
85 90 95

Pro Asp Thr Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 26
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> dominio de cadena pesada variable VH <IL-17> HC136

<400> 26

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

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

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

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

ES 2 747 749 T3

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 27
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> dominio de cadena ligera variable VL <IL-17> LC136

<400> 27

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

15 <210> 28
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cadena pesada (HC) <TWEAK> con intercambio de VH-VL natural (wt) (que comprende dipéptido GK terminal)

<400> 28

ES 2 747 749 T3

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

ES 2 747 749 T3

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365

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

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

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 29
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 747 749 T3

<220>

<223> cadena pesada (HC) <IL-17> con sustitución K147E y sustitución K213E (que comprende dipéptido GK terminal)

5 <400> 29

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

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

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

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

ES 2 747 749 T3

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

ES 2 747 749 T3

<210> 30
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada (HC) <IL-17> con sustitución K147E y sustitución K213D (que comprende dipéptido GK terminal)

<400> 30

10

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

ES 2 747 749 T3

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Asp Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

- <210> 31
- <211> 459
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> cadena pesada (HC) <Ang-2> natural (wt) (que comprende el dipéptido GK terminal)

- <400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

ES 2 747 749 T3

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

ES 2 747 749 T3

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

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

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

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

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

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

- 5 <210> 32
- <211> 439
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL natural (wt) (que comprende dipéptido GK terminal)
- <400> 32

ES 2 747 749 T3

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

ES 2 747 749 T3

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435

- 5 <210> 33
- <211> 459
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 747 749 T3

<220>

<223> cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E (que comprende dipéptido GK terminal)

5 <400> 33

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

ES 2 747 749 T3

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 34
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K213E (que comprende dipéptido GK terminal)

<400> 34

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

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

ES 2 747 749 T3

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

ES 2 747 749 T3

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

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

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 35

<211> 459

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E y sustitución K213E (que comprende dipéptido GK terminal)

<400> 35

5

10

ES 2 747 749 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240

ES 2 747 749 T3

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285

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

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

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

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

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 36
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 747 749 T3

<220>

<223> cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustitución K147E y sustitución K213D (que comprende dipéptido GK terminal)

5 <400> 36

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430

ES 2 747 749 T3

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 37
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada (HC) <IL-17> natural (wt) (que comprende dipéptido GK terminal)

<400> 37

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

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

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

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

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

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

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

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

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

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

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

- 5 <210> 38
- <211> 688
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> cadena pesada (HC) de Fab2-CrossFab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <Ang-2> naturales (wt) acopladas a una cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de dominios VH-VL natural (wt) por medio de conectores de glicina-serina

<400> 38

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

15

ES 2 747 749 T3

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
225 230 235 240

Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
245 250 255

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met
260 265 270

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
275 280 285

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
290 295 300

ES 2 747 749 T3

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 305 310 315 320
 Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 325 330 335
 Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
 340 345 350
 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360 365
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 370 375 380
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 405 410 415
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 420 425 430
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 435 440 445
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 450 455 460
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 465 470 475 480
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
 500 505 510
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser
 515 520 525

ES 2 747 749 T3

Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 530 535 540

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 545 550 555 560

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
 565 570 575

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 580 585 590

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 595 600 605

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 610 615 620

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 625 630 635 640

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 645 650 655

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 660 665 670

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 675 680 685

- 5 <210> 39
- <211> 688
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> cadena pesada (HC) de Fab2-CrossFab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <Ang-2> con sustituciones K147E y K213E acopladas a una cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de dominios VL-VH natural (wt) por medio de conectores de glicina-serina

- 15 <400> 39

ES 2 747 749 T3

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

ES 2 747 749 T3

Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 225 230 235 240
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 245 250 255
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met
 260 265 270
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
 275 280 285
 Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
 290 295 300
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 305 310 315 320
 Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 325 330 335
 Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
 340 345 350
 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360 365
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 370 375 380
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 405 410 415
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 420 425 430
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 435 440 445

ES 2 747 749 T3

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys
 450 455 460

Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 465 470 475 480

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 485 490 495

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
 500 505 510

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser
 515 520 525

Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 530 535 540

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 545 550 555 560

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
 565 570 575

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 580 585 590

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 595 600 605

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 610 615 620

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 625 630 635 640

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 645 650 655

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 660 665 670

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 675 680 685

ES 2 747 749 T3

<210> 40
 <211> 450
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada (HC) de CrossFab-Fab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <VEGF> con intercambio de dominios VL-VH natural (wt) acopladas a una cadena pesada (HC) <Ang-2> natural (wt) por medio de conectores de glicina-serina
 10

<400> 40

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140

ES 2 747 749 T3

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
 210 215 220
 Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
 225 230 235 240
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg
 245 250 255
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn
 260 265 270
 Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
 275 280 285
 Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu
 290 295 300
 Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile
 325 330 335
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 340 345 350
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 355 360 365

ES 2 747 749 T3

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 370 375 380

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 385 390 395 400

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 405 410 415

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 420 425 430 435

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 435 440 445

Ser Cys
 450

- 5 <210> 41
- <211> 450
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> cadena pesada (HC) de CrossFab-Fab que incluye una cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de dominios VL-VH natural (wt) acoplada a una cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustituciones K147E y K213E por medio de conectores de glicina-serina

<400> 41

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

15

ES 2 747 749 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
 210 215 220
 Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
 225 230 235 240
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg
 245 250 255
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn
 260 265 270
 Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
 275 280 285
 Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu
 290 295 300
 Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile
 325 330 335

ES 2 747 749 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 340 345 350

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 355 360 365

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 370 375 380

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 385 390 395 400

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 405 410 415

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 420 425 430

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys
 435 440 445

Ser Cys
 450

- 5 <210> 42
- <211> 667
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> cadena pesada (HC) de CrossFab2-Fab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <VEGF> con intercambio de dominio VL-VH natural (wt) acopladas a una cadena pesada (HC) <Ang-2> natural (wt) por medio de conectores de glicina-serina

<400> 42

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

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

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

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

15

ES 2 747 749 T3

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
100 105 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
195 200 205

Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
210 215 220

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
225 230 235 240

Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
245 250 255

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu
260 265 270

His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
275 280 285

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
290 295 300

ES 2 747 749 T3

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 305 310 315 320
 Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 325 330 335
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 340 345 350
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 355 360 365
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 370 375 380
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 385 390 395 400
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 405 410 415
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
 420 425 430
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 435 440 445
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 450 455 460
 Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
 485 490 495
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 500 505 510
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 515 520 525
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
 530 535 540

ES 2 747 749 T3

Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
545 550 555 560

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
565 570 575

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
580 585 590

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
595 600 605

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
610 615 620

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
625 630 635 640

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
645 650 655

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
660 665

- 5 <210> 43
- <211> 667
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> cadena pesada (HC) de CrossFab2-Fab que incluye dos cadenas pesadas (HC) <VEGF> con intercambio de dominios VL-VH natural (wt) acopladas a una cadena pesada (HC) <Ang-2> con sustituciones K147E y K231E por medio de conectores de glicina-serina

<400> 43

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

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

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

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

15

ES 2 747 749 T3

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
100 105 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
195 200 205

Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
210 215 220

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
225 230 235 240

Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
245 250 255

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu
260 265 270

His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
275 280 285

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
290 295 300

ES 2 747 749 T3

Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 305 310 315 320
 Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 325 330 335
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 340 345 350
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 355 360 365
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 370 375 380
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 385 390 395 400
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 405 410 415
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
 420 425 430
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 435 440 445
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 450 455 460
 Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
 485 490 495
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 500 505 510
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 515 520 525
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
 530 535 540

ES 2 747 749 T3

Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
545 550 555 560

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
565 570 575

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
580 585 590

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
595 600 605

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
610 615 620

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
625 630 635 640

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
645 650 655

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
660 665

- <210> 44
- <211> 439
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL con sustitución K147E
- <400> 44

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

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

ES 2 747 749 T3

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365

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

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 385 390 395 400

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435

- <210> 45
- <211> 230
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> cadena ligera (LC) <VEGF> con intercambio de VH-VL con sustitución Q124K

<400> 45

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

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

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

5

10

ES 2 747 749 T3

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Lys Leu Lys Ser Gly
 130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

- <210> 46
- <211> 439
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cadena pesada (HC) <VEGF> con intercambio de VH-VL con sustitución K147E y K213E
- <400> 46

ES 2 747 749 T3

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

ES 2 747 749 T3

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365

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

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 385 390 395 400

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 47
 <211> 230
 <212> PRT

ES 2 747 749 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera (LC) <VEGF> con intercambio de VH-VL con sustitución E123K y Q124K

5

<400> 47

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser Gly
 130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160

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

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

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

ES 2 747 749 T3

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo multiespecífico de subclase IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana, que comprende:
- 5 a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno; y
- 10 b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno, y en el que los dominios variables VL y VH en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo se reemplazan entre sí; y
- en el que
- 15 en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 20 2. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 1,
- en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 25 3. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 1,
- en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 30 4. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3,
- 35 en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K) o arginina (R) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
- 40 5. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4,
- 45 en el que en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat) y el aminoácido en la posición 123 se sustituye independientemente por lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat),
- 50 y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 se sustituye por ácido glutámico (E) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que
- 55 un primer dominio CH3 de la primera cadena pesada del anticuerpo en a) y un segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada del anticuerpo en b) se encuentran en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo,
- 60 en el que dicha interfase se altera para promover la formación del anticuerpo multiespecífico, en el que la alteración se caracteriza por que:
- i) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada,
- 65 de modo que dentro de la interfase original del dominio CH3 de la una cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico,

- 5 un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de la una cadena pesada que se puede situar en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada;
- y
- 10 ii) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada, de modo que dentro de la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada que se encuentra con la interfase original del dominio CH3 de la una cadena pesada dentro del anticuerpo multiespecífico,
- 15 un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V), generando de este modo una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro de la cual se puede situar una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de la una cadena pesada.
- 20 7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de modo que se puede formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.
- 25 8. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que se une específicamente a TWEAK humano y que se une específicamente a IL17 humana, en el que
- A) el anticuerpo multiespecífico comprende
- 30 un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24, y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 25; y
- B) el anticuerpo multiespecífico comprende
- 35 un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 26, y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 27.
- 40 9. Un procedimiento para la preparación de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas de
- A) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican
- 45 a) la primera cadena ligera y la primera cadena pesada del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y
- b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9;
- 50 B) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
- C) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.
- 55 10. Un ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 60 11. Un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10, que puede expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped.
12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1A

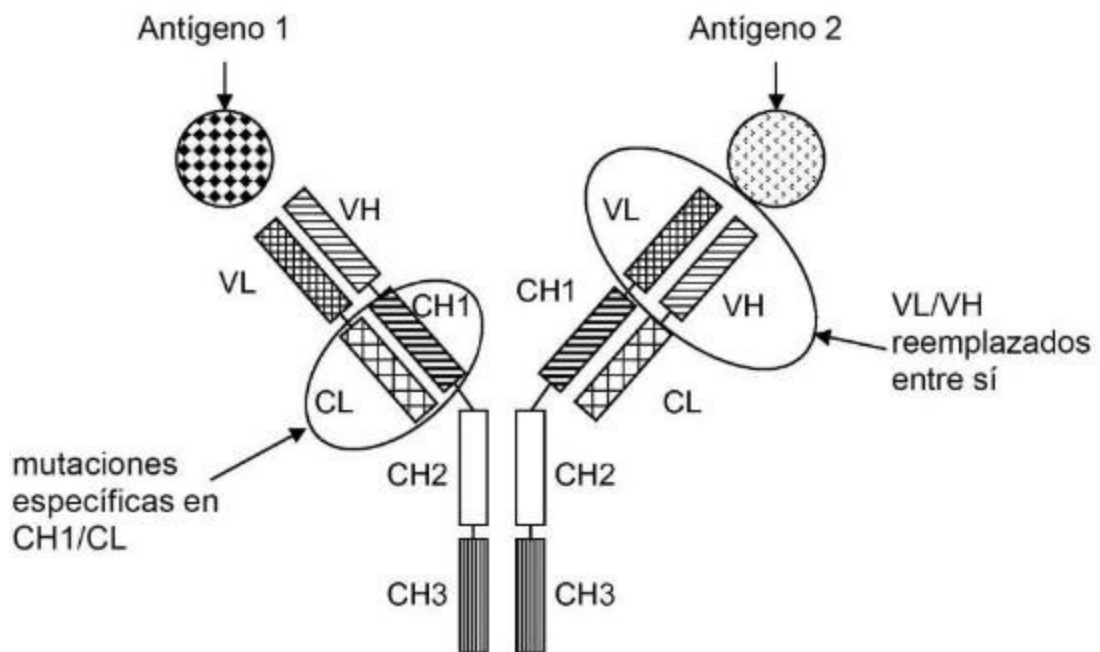


Fig. 1B

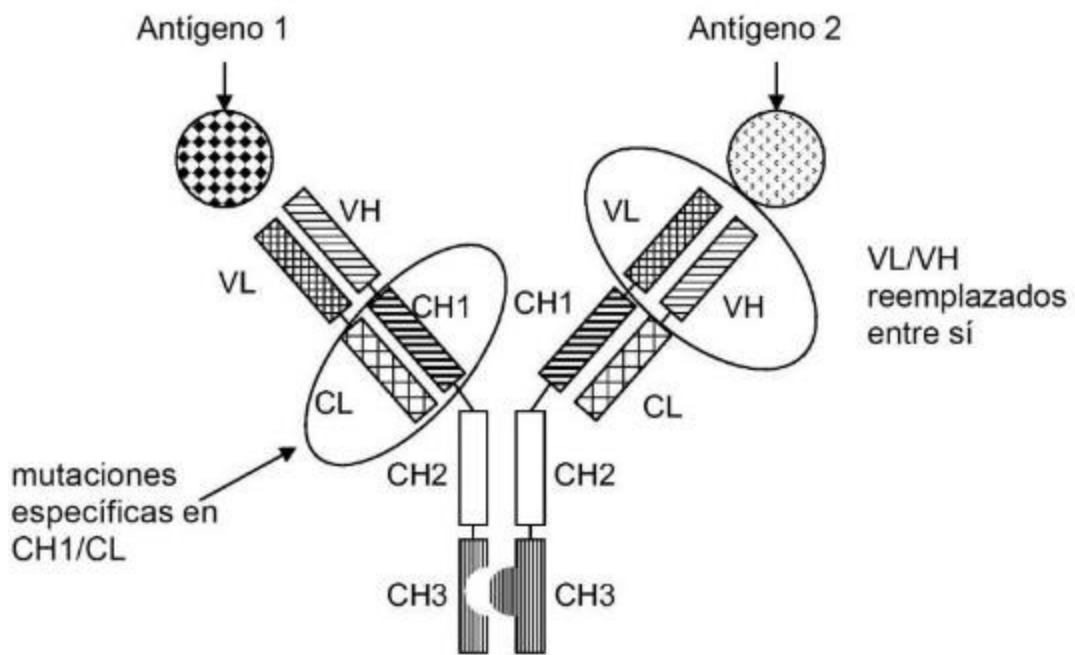
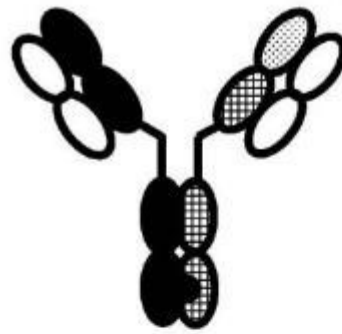


Fig. 2A



Anticuerpo biespecífico
deseado con intercambio/
reemplazo de VH-VL
en un brazo de unión



Producto secundario
principal: resultado
de la interacción de
Bence-Jones de HC
cruzado con LC sin cruzar

	antígeno 1	antígeno 2
Dominios HC		
Dominios LC		

Fig. 2B

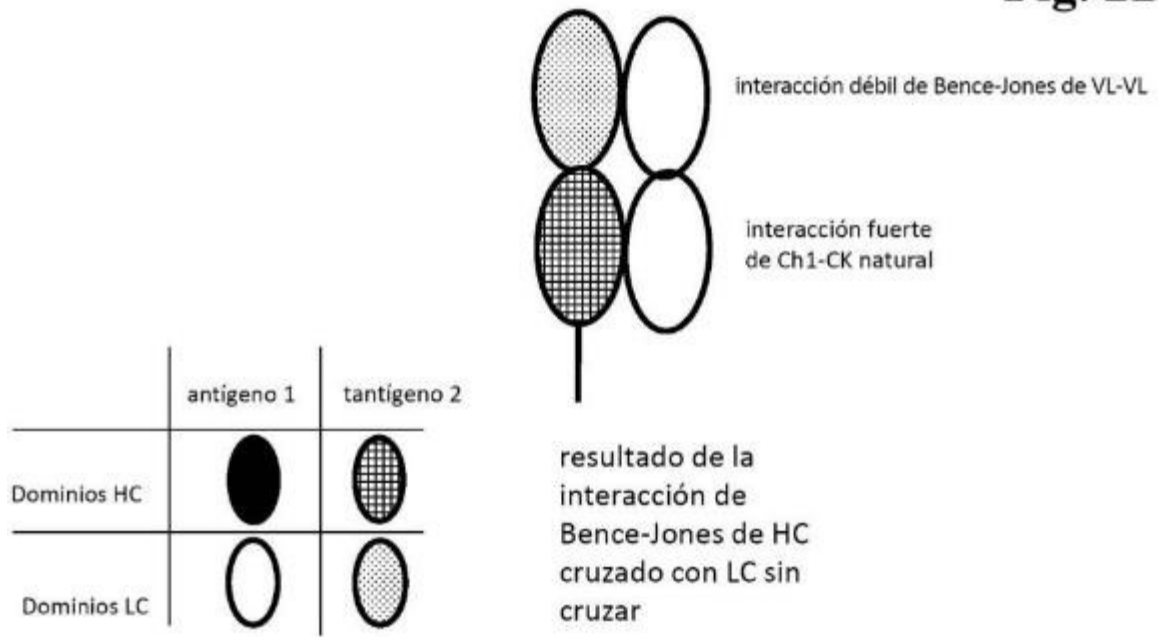


Fig. 4A

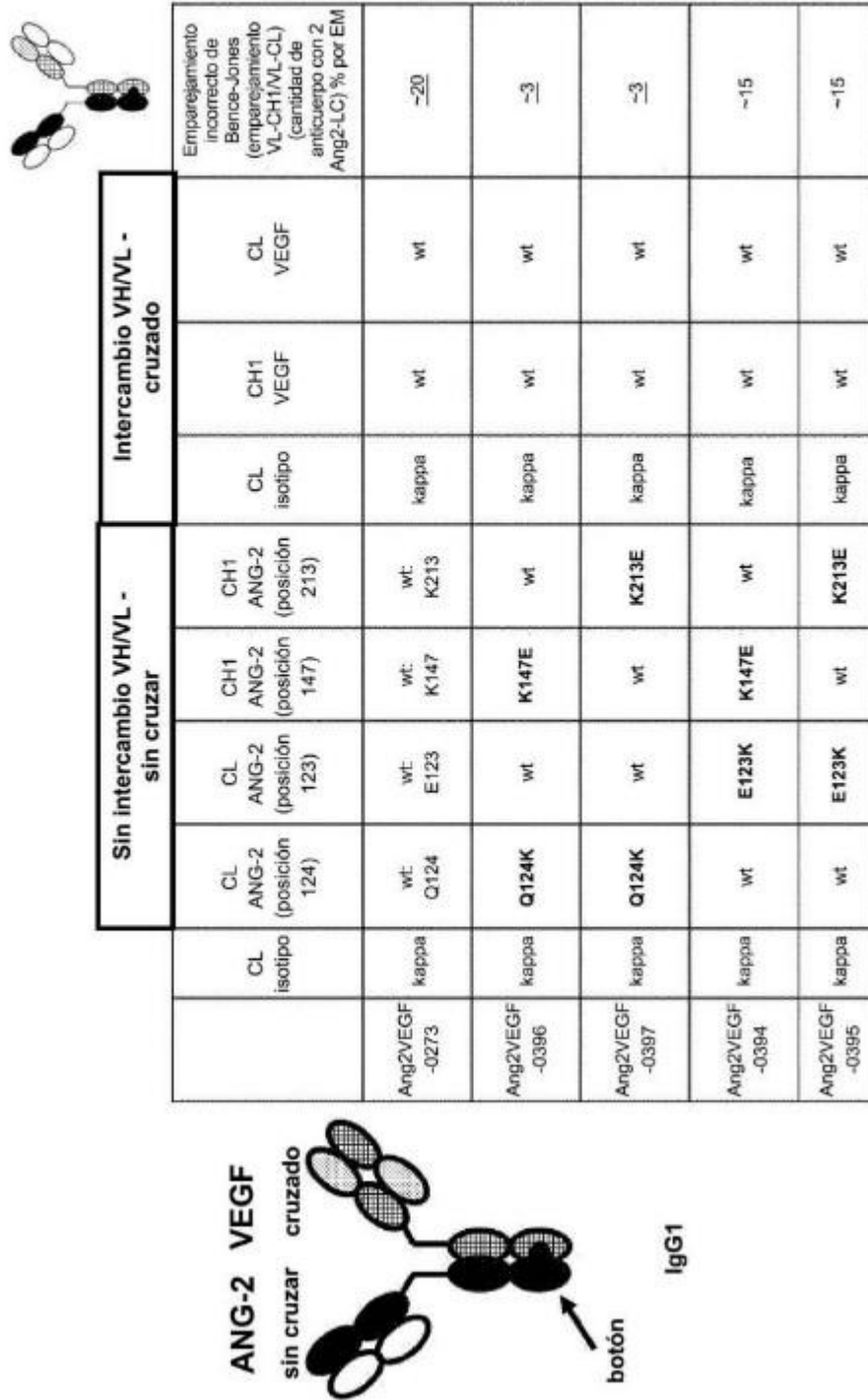


Fig. 4B

	Sin intercambio VH/VL - sin cruzar		Intercambio VH/VL - cruzado	
	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0396	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0397	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0394	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0395	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

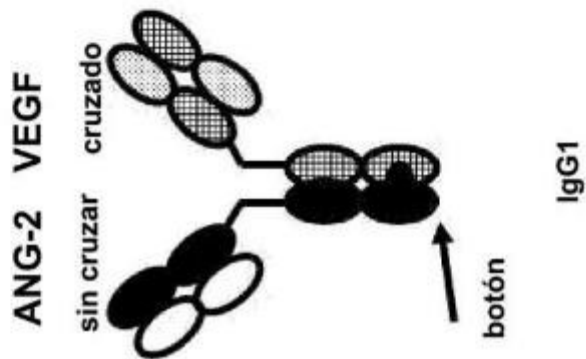



Fig. 5A



	Sin intercambio VH/VL - sin cruzar					Intercambio VH/VL - cruzado			Emparejamiento incorrecto de Blanco-Jones (emparejamiento VL-CH1/VL-CL) (capacidad de anticuerpo con 2 Ang2-LC) % por EM
	CL isotipo	CL ANG-2	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 ANG-2	CL isotipo	CH1 VEGF	CL VEGF	
Ang2VEGF-0273	kappa	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	kappa	wt	wt: Q124	-20 %
Ang2VEGF-0274	kappa	Q124K	E123K	K147E	K213E	kappa	wt	wt	0
Ang2VEGF-0282	kappa	Q124R	E123K	K147E	K213E	kappa	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0283	lambda (wt lambda: E124/ E123)	E124K	E123K	K147E	K213E	kappa	wt	wt	0
Ang2VEGF-0284	kappa	Q124R	E123K	K147E	K213D	kappa	wt	wt	0
Ang2VEGF-0285	kappa	Q124R	E123K	K147E	K213D	kappa	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0286	kappa	Q124K	E123K	K147E	K213E	kappa	wt	Q124E	0

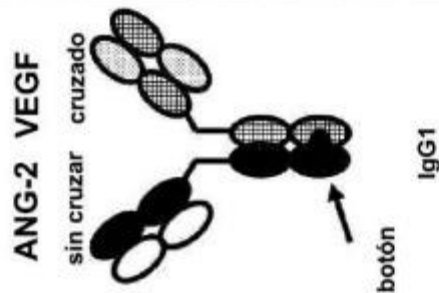
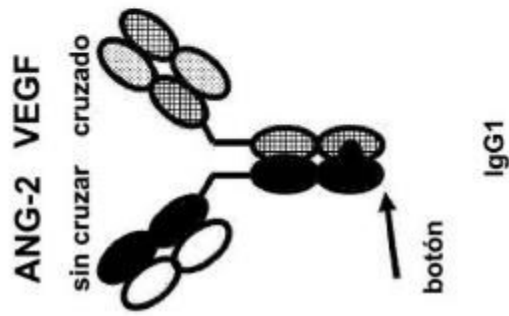
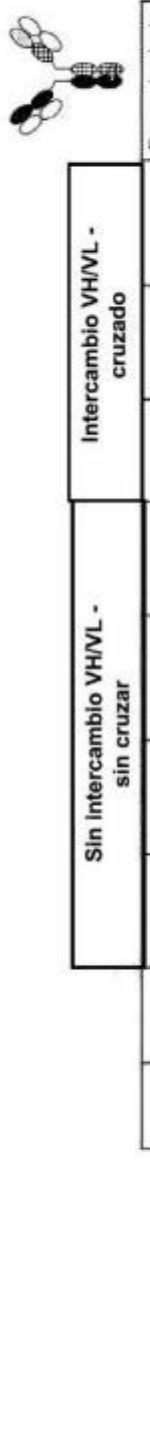


Fig. 5B



	Sin intercambio VH/VL - sin cruzar		Intercambio VH/VL - cruzado	
	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

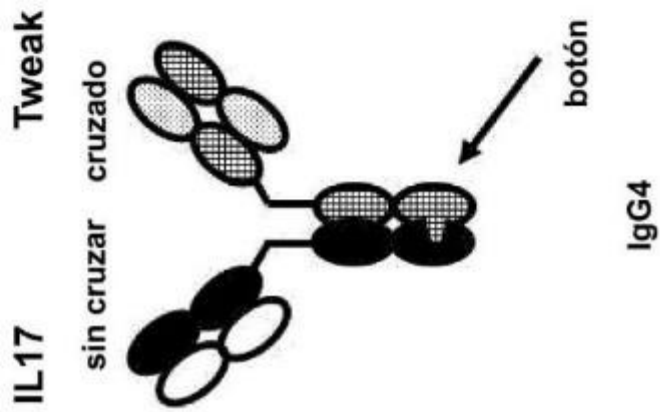
Fig. 6A



	Sin intercambio VH/VL - sin cruzar				Intercambio VH/VL - cruzado			Emparejamiento incorrecto de Bence-Jones (emparejamiento VL-CH1/VL-CL) (cantidad de anticuerpo con 2 IL17-LC) % por EM
	CL isotipo	CL IL17 (posición 124)	CH1 IL17 (posición 147)	CH1 IL17 (posición 213)	CL isotipo	CH1 TWEAK	CL TWEAK (posición 124)	
TweakIL 17-0096	kappa	wt: Q124	wt: K147	wt: K213	kappa	wt	wt: Q124	-20 %
TweakIL 17-0097	kappa	Q124K	K147E	K213E	kappa	wt	Q124E	0
TweakIL 17-0098	kappa	Q124K	K147E	K213D	kappa	wt	wt	0
TweakIL 17-0099	kappa	Q124K	K147E	K213D	kappa	wt	Q124E	0
TweakIL 17-0100	kappa	Q124K	K147E	K213E	kappa	wt	Q124E	0
TweakIL 17-0101	kappa	Q124K	K147E	K213E	kappa	wt	wt	no determ.

Fig. 6B

	Sin intercambio VH/VL - sin cruzar		Intercambio VH/VL - cruzado	
	LC IL17	HC IL17	HC Tweak	LC Tweak
TweakIL17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18



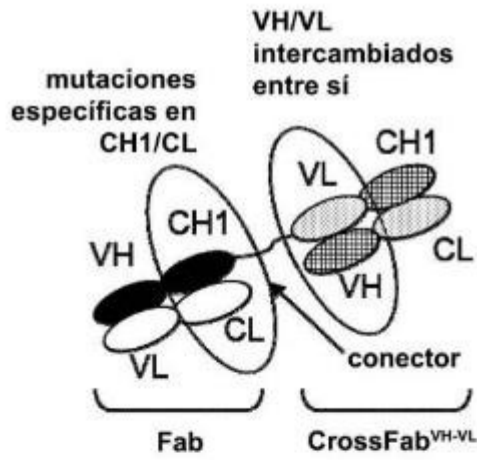


Fig. 7A

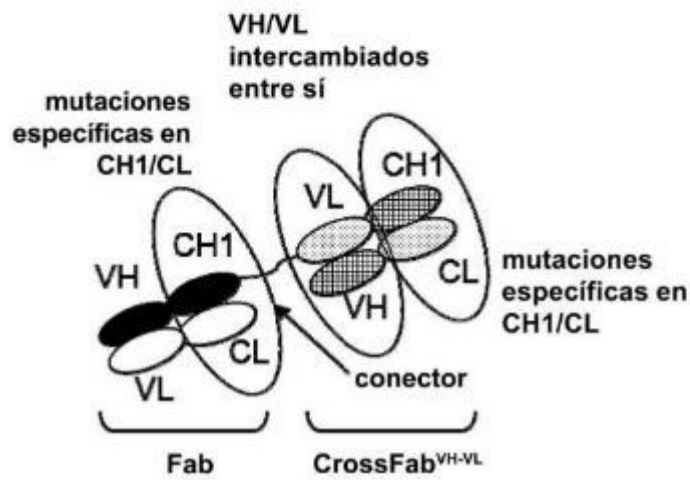


Fig. 7B

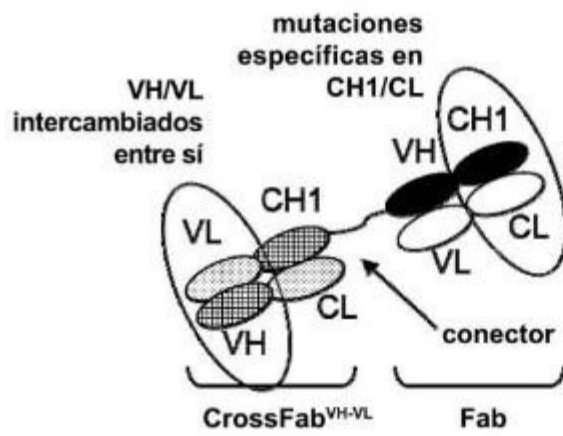


Fig. 7C

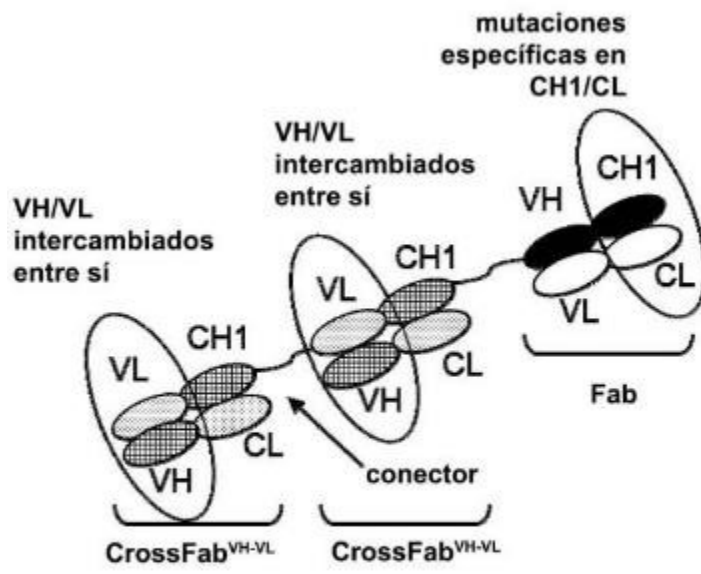


Fig. 8C

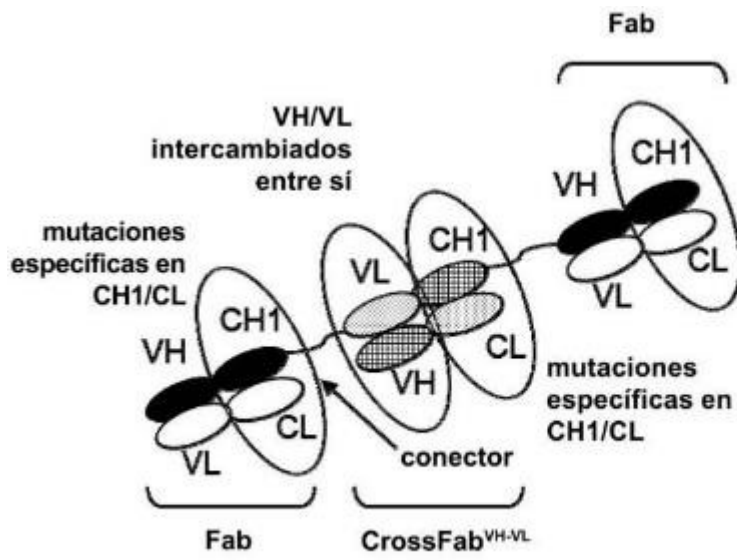


Fig. 8D

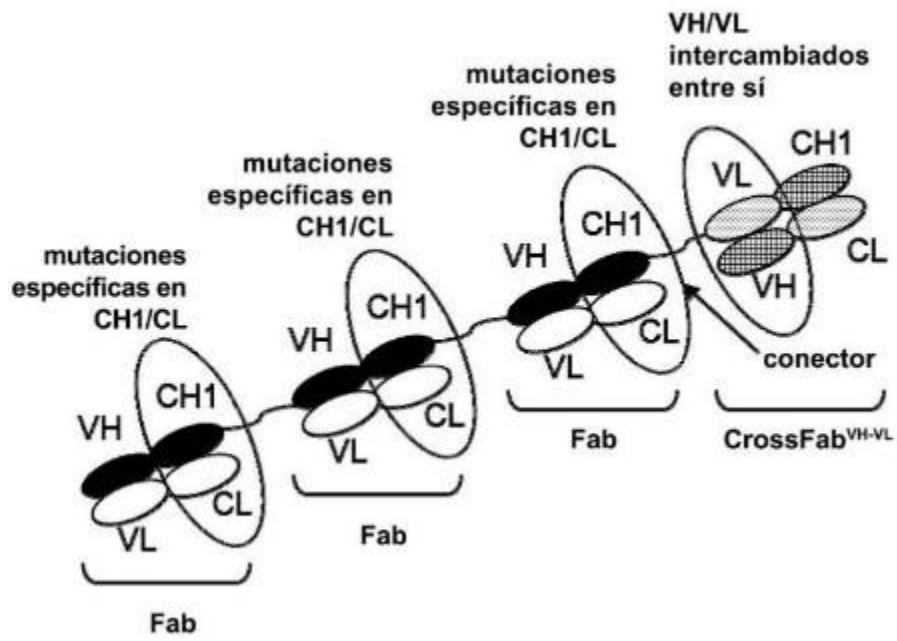


Fig. 9