

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-039189-00000-0000

Fecha: 2011-03-30 16:22:39
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 273

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

B.T. DUN.
OK

21. EXPEDIENTE No.

11-39189

54. TÍTULO: **"Anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/28**

71. SOLICITANTE: **ROCHE GLYCART AG**

DOMICILIO: **SCHLIEREN, SUIZA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C.

MAR. 2011

(FORMA P 10).

Wda. L
26-04-2011
no En

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-039189- -00000-0000

Fecha: 2011-03-30 16:22:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 273

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ROCHE GLYCART AG Dirección: Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Suiza. Nacionalidad o Domicilio: Schlieren, Suiza. Lugar de Constitución: Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com		C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: BRINKMANN, Ulrich; CROASDALE, Rebecca; LAU, Wilma; GERDES, Christian; HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian; KUENKELE, Klaus-Peter; SCHAEFER, Wolfgang; STRACKE, Jan Olaf; UMAÑA, Pablo Dirección: Feichtlstrasse 12, 82362; Weilheim; Im Seefeld 39, D-82387 Antdorf; Rotbuchenstrasse 25, D-81547 München; Sandfelsenstrasse 4, CH-8703 Erlenbach; Kienbachstrasse 1B, D-82211 Herrsching a. Ammersee; Chruetzacherweg 41, CH-8906 Bonstetten; Karwendelstrasse 9, D-83671 Benediktbeuern; Tannhaeusering 190, D-68199 Mannheim; Bruneckerstrasse 7, D-81373 Muenchen; Fuhrstrasse 24a, CH-8820 Waedenswil. Nacionalidad o Domicilio: Alemania y Suiza.		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/006782 Fecha: 21/09/09 Publicación Internacional No. WO 2010/034441 A1 Fecha: 01/04/10			
6 Título (54) "Anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R"			
7 Clasificación Internacional (51) C07K 16/28			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	EP EP	26/09/08 02/04/09	08016952.7 09004908.1
9 Comprobante de Pago No. 11-0013341		Fecha: 14 de Febrero de 2011	

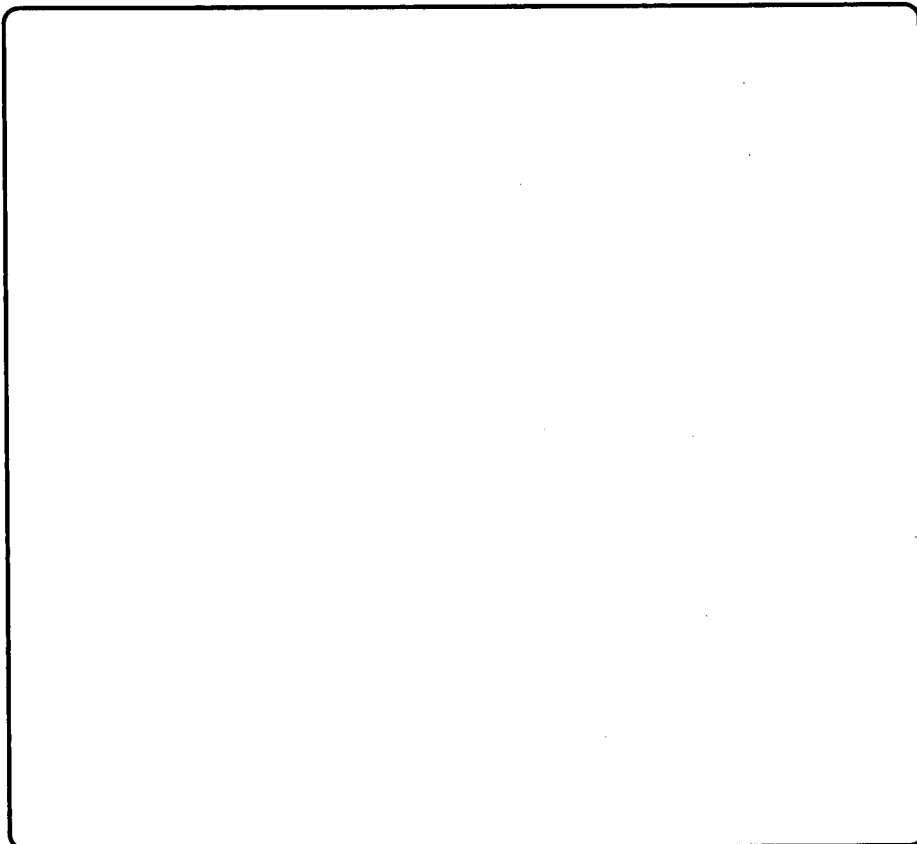
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional, publicación, documentos de notificación de registro de cambio de nombre del solicitante, del inventor LAU Wilma y de dirección de los inventores CROASDALE, Rebecca, HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian y UMAÑA, Pablo, opinión escrita de la autoridad de búsqueda Internacional y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0013341

Bogotá D.C., Febrero 14 de 2011 - 13:12:50

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	142967915	14/02/2011	22.740.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				<u>\$571.000.00</u>
			=====	

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-039189- -00000-0000

Fecha: 2011-03-30 16:22:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 273

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 14 de 2011 - 13:12:54

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 30-03-11 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 08016952.7 26-09-08 EP 09004908.1 02-04-09 EP		(51) Int Cl: C07K 16/28 (71) Solicitante(s): ROCHE GLYCART AG (72) Inventor(es): BRINKMANN, Ulrich; CROASDALE, Rebecca; LAU, Wilma; GERDES, Christian; HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian; KUENKELE, Klaus-Peter; SCHAEFER, Wolfgang; STRACKE, Jan Olaf; UMAÑA, Pablo. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 26-04-11 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 21-09-09 No. De solicitud: PCT/EP2009/006782		(87) Publicación internacional Fecha: 01-04-10 N° publicación: WO 2010/034441 A1	
(54) Título: Anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R			

Resumen.-Reivindicación(es):

Sector: Inmunoglobulinas híbridas contra receptores, antígenos de superficie celular o determinantes de la superficie celular.

Resumen.-

La presente invención está relacionada con anticuerpos biespecíficos frente a EGFR y frente a IGF-1R, métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y usos de los mismos.

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 30-03-11

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28

(71) Solicitante(s): **ROCHE GLYCART AG**

(72) Inventor(es): BRINKMANN, Ulrich; CROASDALE, Rebecca; LAU, Wilma; GERDES, Christian; HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian; KUENKELE, Klaus-Peter; SCHAEFER, Wolfgang; STRACKE, Jan Olaf; UMAÑA, Pablo.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad

(31)

No. Prioridad

(32)

Fecha

(33)

País

08016952.7

26-09-08

EP

09004908.1

02-04-09

EP

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 26-04-11

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 21-09-09

No. de solicitud: **PCT/EP2009/006782**

(87) Publicación internacional

Fecha: **01-04-10**

N° publicación: **WO 2010/034441 A1**

(54) Título: **Anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 30-03-11

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28

(71) Solicitante(s): **ROCHE GLYCART AG**

(72) Inventor(es): BRINKMANN, Ulrich; CROASDALE, Rebecca; LAU, Wilma; GERDES, Christian; HOFFMANN, Eike; KLEIN, Christian; KUENKELE, Klaus-Peter; SCHAEFER, Wolfgang; STRACKE, Jan Olaf; UMAÑA, Pablo.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	08016952.7	26-09-08	EP
	09004908.1	02-04-09	EP

FIGURA CARACTERISTICA

6 x 6 cm

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 26-04-11

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 21-09-09
No. de solicitud: **PCT/EP2009/006782**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **01-04-10**

No. Publicación : **WO 2010/034441 A1**

(54) Título:

Anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R

(57) **Resumen.-Reivindicación (es):**

Sector: Inmunoglobulinas híbridas contra receptores, antígenos de superficie celular o determinantes de la superficie celular.

Resumen.-

La presente invención está relacionada con anticuerpos biespecíficos frente a EGFR y frente a IGF-1R, métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y usos de los mismos.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 25393 WO-WJ	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2009/006782	International filing date (day/month/year) 21/09/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 26/09/2008
Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 22
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/006782

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/006782

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

Bispecific antibodies against EGFR and against IGF-1R, methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006782

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 C07K16/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LU D ET AL: "Simultaneous blockade of both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor signaling pathways in cancer cells with a fully human recombinant bispecific antibody" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 279, no. 4, 23 January 2004 (2004-01-23), pages 2856-2865, XP002316541 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document ----- -/--	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2009

Date of mailing of the international search report

08/12/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006782

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/020258 A (IMCLONE SYSTEMS INC [US]; ZHU ZHENPING [US]) 23 February 2006 (2006-02-23) cited in the application pages 26-38; figures 1-13	1-12
X	LU DAN ET AL: "A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 20 MAY 2005, vol. 280, no. 20, 20 May 2005 (2005-05-20) , pages 19665-19672, XP002516978 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-12
X	LU D ET AL: "The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 318, no. 2, 28 May 2004 (2004-05-28), pages 507-513, XP004505410 ISSN: 0006-291X cited in the application the whole document	1-12
X	US 2005/084906 A1 (GOETSCH LILIANE [FR] ET AL) 21 April 2005 (2005-04-21) paragraphs [0009], [0079] - [0087]; figures 38,39; examples 21,22	1-12
Y	WO 2006/082515 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH]; UMANA PABLO [CH]; MOSSNER EKKEHARD [CH]) 10 August 2006 (2006-08-10) cited in the application pages 46-53; figure 13; example 1; sequences 5, 15, 45	1-12
Y	WO 2005/005635 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; GRAUS YVO [NL]; KOPETZKI ERHARD [DE]; KUENKELE) 20 January 2005 (2005-01-20) cited in the application examples 1,4-16; sequences 1-4	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/006782

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006020258	A	23-02-2006	EP 1786918 A2 JP 2008512352 T	23-05-2007 24-04-2008
US 2005084906	A1	21-04-2005	US 2005249730 A1 US 2008286198 A1 US 2008063639 A1	10-11-2005 20-11-2008 13-03-2008
WO 2006082515	A	10-08-2006	AR 052285 A1 AU 2006211037 A1 BR PI0607315 A2 CA 2596835 A1 CN 101115773 A EP 1871805 A2 JP 2008529489 T KR 20070119629 A US 2006269545 A1 US 2009186019 A1	07-03-2007 10-08-2006 01-09-2009 10-08-2006 30-01-2008 02-01-2008 07-08-2008 20-12-2007 30-11-2006 23-07-2009
WO 2005005635	A	20-01-2005	AT 413454 T AU 2004256215 A1 AU 2008202949 A1 AU 2008207635 A1 BR PI0412478 A CA 2532173 A1 CN 1823163 A DK 1646720 T3 EP 1646720 A2 EP 1959014 A2 ES 2317020 T3 HK 1094713 A1 JP 4276262 B2 JP 2008538273 T JP 2009077709 A KR 20060054296 A MX PA06000270 A NZ 544455 A PT 1646720 E RU 2363706 C2 SG 129437 A1 TW 290147 B US 2009275126 A1 US 2008132686 A1 US 2005008642 A1 ZA 200600181 A	15-11-2008 20-01-2005 31-07-2008 25-09-2008 19-09-2006 20-01-2005 23-08-2006 05-01-2009 19-04-2006 20-08-2008 16-04-2009 24-07-2009 10-06-2009 23-10-2008 16-04-2009 22-05-2006 07-04-2006 24-12-2008 26-12-2008 10-08-2009 26-02-2007 21-11-2007 05-11-2009 05-06-2008 13-01-2005 25-04-2007



(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)

(74) Agents: BURGER, Alexander et al.; Roche Diagnostics GmbH, Patent Department (TR-E), Postfach 11 52, 82372 Penzberg (DE).

(21) International Application Number:
PCT/EP2009/006782

(22) International Filing Date:
21 September 2009 (21.09.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
08016952.7 26 September 2008 (26.09.2008) EP
09004908.1 2 April 2009 (02.04.2009) EP

(71) Applicants (for all designated States except US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH). ROCHE GLYCART AG [CH/CH]; Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BRINKMANN, Ulrich [DE/DE]; Feichtlstrasse 12, 82362 Weilheim (DE). CROASDALE, Rebecca [GB/DE]; Hochfeldstrasse 16, 82377 Penzberg (DE). DORMEYER, Wilma [DE/DE]; Rothbuchenstrasse 25, 81547 München (DE). GERDES, Christian [AR/CH]; Sandfelsenstrasse 4, CH-8703 Erlenbach (CH). HOFFMANN, Eike [DE/DE]; Leo-Putz-Weg 4, 82229 Seefeld (DE). KLEIN, Christian [DE/DE]; Moraenenweg 5, 82393 Iffeldorf (DE). KUENKELE, Klaus-Peter [DE/DE]; Karwendelstrasse 9, 83671 Benediktbeuern (DE). SCHAEFER, Wolfgang [DE/DE]; Tannhaeuserring 190, 68199 Mannheim (DE). STRACKE, Jan Olaf [DE/DE]; Bruneckerstrasse 7, 81373 München (DE). UMANA, Pablo [CR/CH]; Freiesstrasse 159, CH-8032 Zürich (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

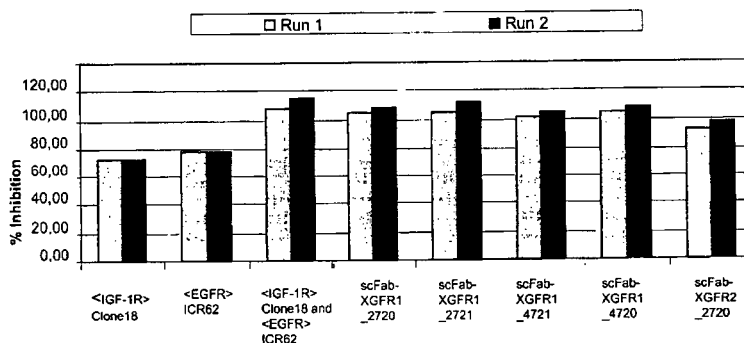
Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: BISPECIFIC ANTI-EGFR/ANTI-IGF-1R ANTIBODIES

Fig. 22



(57) Abstract: Bispecific antibodies against EGFR and against IGF-1R, methods for their production, pharmaceutical compositions containing said antibodies, and uses thereof.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BURGER, Alexander
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

24 January 2011 (24.01.2011)

Applicant's or agent's file reference

25393 WO-WJ

International application No.

PCT/EP2009/006782

International filing date (day/month/year)

21 September 2009 (21.09.2009)

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant☐ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel
Switzerland

State of Nationality

CH

State of Residence

CH

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person☐ the name☐ the address☐ the nationality☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

The person in Box 1 has been deleted from the record. ROCHE GLYCART AG has been recorded as sole applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office☐ the International Searching Authority☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority☒ the designated Offices concerned☐ the elected Offices concerned☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Crocì Christelle

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

Facsimile No. +41 22 338 89 70

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/EQPCME9U0

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2009/006782

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BURGER, Alexander
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2011 (16.03.2011)	
Applicant's or agent's file reference 25393 WO-WJ	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2009/006782	International filing date (day/month/year) 21 September 2009 (21.09.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address DORMEYER, Wilma Rothbuchenstrasse 25 81547 München Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address LAU, Wilma Rothbuchenstrasse 25 81547 München Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nyberg Henrik
Facsimile No. +41 22 338 89 70	e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BURGER, Alexander
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2011 (16.03.2011)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 25393 WO-WJ	
International application No. PCT/EP2009/006782	International filing date (day/month/year) 21 September 2009 (21.09.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address CROASDALE, Rebecca Hochfeldstrasse 16 82377 Penzberg Germany	State of Nationality GB	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address CROASDALE, Rebecca Im Seefeld 39, 82387 Anttdorf Germany	State of Nationality GB	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nyberg Henrik
Facsimile No. +41 22 338 89 70	e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06

10

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2009/006782

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BURGER, Alexander
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2011 (16.03.2011)	
Applicant's or agent's file reference 25393 WO-WJ	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2009/006782	International filing date (day/month/year) 21 September 2009 (21.09.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

HOFFMANN, Eike
Leo-Putz-Weg 4
82229 Seefeld
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

HOFFMANN, Eike
Kienbachstrasse 1B
82211 Herrsching a. Ammersee
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nyberg Henrik

Facsimile No. +41 22 338 89 70

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2009/006782

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BURGER, Alexander
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2011 (16.03.2011)	
Applicant's or agent's file reference 25393 WO-WJ	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2009/006782	International filing date (day/month/year) 21 September 2009 (21.09.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address KLEIN, Christian Moraenenweg 5 82393 Iffeldorf Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address KLEIN, Christian Chruezacherweg 41 8906 Bonstetten Switzerland	State of Nationality DE	State of Residence CH
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nyberg Henrik
Facsimile No. +41 22 338 89 70	e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06

PCT/EP2009/006782

PCT

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

BURGER, Alexander
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2011 (16.03.2011)	
Applicant's or agent's file reference 25393 WO-WJ	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2009/006782	International filing date (day/month/year) 21 September 2009 (21.09.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:			
☒ the applicant		☒ the inventor	
☐ the agent		☐ the common representative	
Name and Address UMANA, Pablo Freiestrasse 159 CH-8032 Zürich Switzerland		State of Nationality	State of Residence
		CR	CH
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:			
☐ the person		☐ the name	
☒ the address		☐ the nationality	
		☐ the residence	
Name and Address UMANA, Pablo Fuhrstrasse 24a 8820 Waedenswil Switzerland		State of Nationality	State of Residence
		CR	CH
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:			
4. A copy of this notification has been sent to:			
☒ the receiving Office		☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority		☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search		☐ the elected Offices concerned	
		☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nyberg Henrik
Facsimile No. +41 22 338 89 70	e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06

WJ

PATENT COOPERATION TREATY

Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg									
ASK	07. Dez. 2009							WA	
OK								WJ	
BUM	HH	HL	MI	SR	TF	UC			

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: **Termin**

see form PCT/ISA220
26.07.2010 not
(16.06.2010)

PCT *WJ*

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)		
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA220 <i>25393 WO-WJ</i>		
FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below		
International application No. PCT/EP2008/006782	International filing date (day/month/year) 21.09.2009	Priority date (day/month/year) 26.09.2008
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C07K16/28 C07K16/46		
Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 86.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office P.B. 5018 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016	Date of completion of this opinion: see form PCT/ISA210	Authorized Officer Luyten, Kallie Telephone No. +31 70 340-8624
---	--	---

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/006782

Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-12</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-12</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-12</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

SECTION V

1 PRIOR ART

1.1 The following documents are referred to in this communication:

- D1 LU D ET AL: "Simultaneous blockade of both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor signaling pathways in cancer cells with a fully human recombinant bispecific antibody" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 279, no. 4, 23 January 2004 (2004-01-23), pages 2856-2865, XP002316541 ISSN: 0021-9258 cited in the application
- D2 WO 2006/020258 A (IMCLONE SYSTEMS INC [US]; ZHU ZHENGPING [US]) 23 February 2006 (2006-02-23) cited in the application
- D3 LU DAN ET AL: "A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 20 MAY 2005, vol. 280, no. 20, 20 May 2005 (2005-05-20), pages 19665-19672, XP002516978 ISSN: 0021-9258 cited in the application
- D4 LU D ET AL: "The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 318, no. 2, 28 May 2004 (2004-05-28), pages 507-513, XP004505410 ISSN: 0006-291X cited in the application
- D5 US 2005/084906 A1 (GOETSCH LILIANE [FR] ET AL) 21 April 2005 (2005-04-21)
- D6 WO 2006/082515 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH]; UMANA PABLO [CH]; MOSSNER EKKEHARD [CH]) 10 August 2006 (2006-08-10) cited in the application
- D7 WO 2005/005635 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; GRAUS YVO [NL]; KOPETZKI ERHARD [DE]; KUENKELE) 20 January 2005 (2005-01-20) cited in the application

- 1.2 Documents D1, D2 and D3 disclose an IgG-like tetravalent bispecific anti-EGFR/anti-IGF-1R antibody that inhibits EGFR and IGF-1R (IGFR) signal transduction and tumor cell proliferation (D1, D3: whole document; D2: pages 26-38; Figures 1-13).
- 1.3 Document D4 discloses an IgG-like tetravalent bispecific anti-EGFR/anti-IGF-1R antibody (whole document).
- 1.4 Document D5 discloses a synergistic effect of the combination of an anti-EGFR antibody and an anti-IGF-1R antibody (Examples 21-22; Figures 38-39) and refers to a bispecific anti-EGFR/anti-IGF-1R antibody ([0009], [0079]-[0087]).
- 1.5 Document D6 discloses humanized anti-EGFR antibodies with variable domain sequences identical to the anti-EGFR variable regions of the present bispecific antibodies (SEQ ID NOs: 7, 8, 10) (D6: pages 46-53; Figure 13; Example 1; SEQ ID NOs: 5, 15, 45).
- 1.6 Document D7 discloses human anti-IGF-1R antibodies with variable domain sequences identical to the anti-IGF-1R variable regions of the present bispecific antibodies (SEQ ID NOs: 23-26) (D7: Examples 1, 4-16; SEQ ID NOs: 1-4).
- 2 The patentability of claims 11-12 can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment (claim 12), but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.
- 3 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)
 - 3.1 The bispecific anti-EGFR/anti-IGF-1R antibodies of D1-D5 do not have the sequences as defined in the present claims. D6 and D7 do not disclose bispecific anti-EGFR/anti-IGF-1R antibodies. Therefore, claims 1-12 are novel over the cited prior art, and the present application meets the requirements of Article 33(2) PCT.
- 4 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)
 - 4.1 Document D1, disclosing an IgG-like tetravalent bispecific antibody that binds EGFR and IGF-1R, inhibits EGFR and IGF-1R signal transduction (Figure 6) and tumor cell proliferation in vitro (Figure 5), is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 1-12.

- 4.2 Claim 1 differs from document D1 in that the bispecific anti-EGFR/IGF-1R antibody has different CDR sequences. There is no particular effect associated with this difference. The problem to be solved by the present application may therefore be regarded as to provide a further bispecific anti-EGFR/IGF-1R antibody.
- 4.3 Without an unexpected effect the provision of a bispecific anti-EGFR/IGF-1R antibody as in claim 1 is a mere arbitrary solution that does not involve an inventive step.
- 4.4 In claim 5 the bispecific antibody is defined by its full length heavy and light variable region sequences. Said sequences correspond to the sequences of the antibodies used in the Examples. The exemplified antibodies downregulate both EGFR and IGF-1R protein levels and inhibit EGFR and IGF-1R signalling pathways. Though, the extent of inhibition appears to be similar to the extent of inhibition by the bispecific antibody of D1. Moreover, the extent of inhibition is the same as for a combination of the monospecific antibodies of which the bispecific antibody has been derived. Hence, the exemplified antibodies do not show an unexpected effect, and lack an inventive step.
- 4.5 It is noted that, although, the combination of the two monospecific antibodies was used at a 100 nM antibody concentration, said combination contains the same amount of antigen-binding sites as the bispecific antibody at 50 nM, since the bispecific antibody contains twice the amount of antigen-binding sites compared to a monospecific antibody at the same molarity. Therefore, the difference in molarity (Table 5) cannot be used to argue that the bispecific antibody is more efficient than the combination of monospecific antibodies.
- 4.6 Claims 2-12 do not appear to contain any additional features which in combination with the features of the claim 1 involve an inventive step as the relevant subject matter is either disclosed in the cited prior art or falls within the knowledge and ability of the skilled person.
- 4.7 Thus, the present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-12 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

SECTION VII

The legend of Figure 2B does not correspond to Figure 2B. In Figure 2 the scFvs are linked to the C-terminal end of either the heavy or light chain of the full length antibody, though the legend, page 46, line 22, refers to the N-terminus.

Anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R

Resumen-Objeto y finalidad de la invención

La presente invención está relacionada con anticuerpos biespecíficos frente a EGFR y frente a IGF-1R, métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y usos de los mismos.

Sector: Inmunoglobulinas híbridas contra receptores, antígenos de superficie celular o determinantes de la superficie celular.

Anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R

La presente invención está relacionada con anticuerpos biespecíficos frente a EGFR y frente a IGF-1R, los métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que
5 contienen dichos anticuerpos, y la utilización de os mismos.

Antecedentes de la Invención

EGFR y anticuerpos anti-EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico
10 humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1, y denominado aquí "EGFR") es un receptor transmembranal de 170 kDa codificado por el proto-oncogén c-erbB, y muestra actividad tirosina quinasa intrínseca (Modjtahedi, H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235; Herbst, R.S. y Shin, D.M., Cancer
15 94 (2002) 1593-1611). La entrada de la base de datos SwissProt P00533 proporciona la secuencia de EGFR. También existen isoformas y variantes de EGFR (por ejemplo, transcritos de RNA alternativos, versiones truncadas, polimorfismos, etc.) lo que incluye pero no se limita a
20 aquellas identificadas con los números de entrada de la base de datos Swissprot P00533-1, P00533-2, P00533-3 y P00533-4. Se sabe que EGFR se une a ligandos que incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), amfiregulina, EGF de
25 unión a heparina (hb-EGF), betacelulina y epiregulina (Herbst, R.S., y Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Mendelsohn, J., y Baselga, J., Oncogene 19 (2000) 6550-6565). EGFR regula numerosos procesos celulares a través de

5 rutas de transducción de señales mediadas por la tirosina
quinasa, lo que incluye, pero no se limita a la activación
de rutas de transducción de señales que controlan la
proliferación celular, diferenciación, supervivencia
celular, apoptosis, angiogénesis, mitogénesis y metástasis
(Atalay, G., et al., Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363;
Tsao, A.S., y Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9; Herbst,
R.S., y Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Modjtahedi,
H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235).

10 La sobreexpresión de EGFR se ha descrito en numerosas
enfermedades malignas humanas, lo que incluye el cáncer de
vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmones, mama,
ovario, colon, próstata y riñones. (Atalay, G., et al.,
Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363; Herbst, R.S., y Shin,
15 D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611 Modjtahedi, H., et al.,
Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235). En muchas de estas
enfermedades, la sobreexpresión de EGFR se correlaciona o
está asociada con un mal pronóstico de los pacientes.
(Herbst R.S., y Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611;
20 Modjtahedi, H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235).
EGFR también se expresa en las células de tejidos normales,
en particular los tejidos epiteliales de la piel, hígado y
tracto gastrointestinal, aunque a niveles generalmente
menores que en las células malignas (Herbst, R.S., y Shin,
25 D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611).

Los anticuerpos monoclonales no conjugados (mAb)
pueden ser medicinas útiles para el tratamiento del cáncer,
como se ha demostrado con la aprobación por parte de la

Food and Drug Administration estadounidense del Trastuzumab (Herceptin™; Genentech Inc.) para el tratamiento del cáncer de mama avanzado (Grillo-Lopez, A.J., et al., Semin. Oncol. 26 (1999) 66-73; Goldenberg, M.M., Clin. Ther. 21 (1999) 309-18), Rituximab (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA. y Genentech Inc., San Francisco, CA), para el tratamiento del linfoma no Hodgkin folicular o de bajo grado de células B positivo para CD20, Gemtuzumab (Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst) para el tratamiento de la recidiva de la leucemia mieloide aguda, y Alemtuzumab (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de células B. El éxito de estos productos se debe no sólo a su eficacia sino también a su sobresaliente perfil de seguridad (Grillo-Lopez, A.J., et al., Semin. Oncol. 26 (1999) 66-73; Goldenberg, M.M., Clin. Ther. 21 (1999) 309-18). A pesar de los logros de estos fármacos, actualmente existe un gran interés en obtener una mayor actividad de los anticuerpos específicos que la que se alcanza normalmente mediante terapia con mAb no conjugados.

Los resultados de una serie de estudios sugieren que mecanismos dependientes del receptor Fc contribuyen sustancialmente a la acción de los anticuerpos citotóxicos frente a tumores e indican que un anticuerpo óptimo frente a tumores se debería unir preferentemente a los receptores de activación Fc y mínimamente a la pareja inhibitoria FcγRIIB. (Clynes, R.A., et al., Nature Medicine 6(4) (2000) 443-446; Kalergis, A.M., y Ravetch, J.V., J. Exp. Med.

195(12) (2002) 1653-1659. Por ejemplo, los resultados de al menos un estudio sugieren que el polimorfismo en el receptor FcγRIIIa, en particular, está fuertemente asociado con la eficacia de la terapia de anticuerpos. (Cartron, G.,
5 et al., Blood 99 (3) (2002) 754-758). Este estudio mostró que los pacientes homocigotos para FcγRIIIa tienen una mejor respuesta al Rituximab que los pacientes heterocigotos. Los autores concluyeron que esta respuesta superior era debida a una mejor unión *in vivo* del
10 anticuerpo a FcγRIIIa, lo que resulta en una mejor actividad de CCDA frente a las células de linfoma (Cartron, G., et al., Blood 99(3) (2002) 754-758).

Se han descrito varias estrategias para llegar hasta EGFR y bloquear las vías de señalización de EGFR. Las
15 pequeñas moléculas inhibidoras de la tirosina quinasa como el gefitinib, erlotinib, y CI-1033 bloquean la autofosforilación de EGFR en la región intracelular de la tirosina quinasa, inhibiendo así los eventos de señalización que se dispararían a continuación (Tsao, A.S.,
20 y Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9). Los anticuerpos monoclonales, por otro lado, alcanzan la porción extracelular de EGFR, lo que resulta en el bloqueo de la unión del ligando y de este modo se inhiben los eventos que se dispararían a continuación, como la proliferación
25 celular (Tsao, A.S., y Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9).

Se han generado varios anticuerpos monoclonales murinos que consiguen tal bloqueo *in vitro* y de los que se ha evaluado su capacidad de afectar al crecimiento tumoral

en modelos de xenoinjerto de ratón (Masui, H., et al., Cancer Res. 46 (1986) 5592-5598; Masui, H., et al., Cancer Res. 44 (1984) 1002-1007; Goldstein, N., et al., Clin. Cancer Res. 1 (1995) 1311-1318). Por ejemplo, EMD 55900
5 (EMD Pharmaceuticals) es un anticuerpo monoclonal murino anti-EGFR que ha generado frente a la línea celular de carcinoma epidermoide humana A431 y se analizó en estudios clínicos de pacientes con carcinoma avanzado de células escamosas de la laringe o hipofaringe (Bier, H., et al.,
10 Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 252 (1995) 433-9). Además, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales de rata ICR16, ICR62 e ICR80, que se unen al dominio extracelular de EGFR, son efectivos en la inhibición de la unión del receptor de EGF y TGF- α (Modjtahedi, H., et al., Int. J.
15 Cancer 75 (1998) 310-316). El anticuerpo monoclonal murino 425 es otro MAb que se generó frente a la línea celular de carcinoma humano A431 y se detectó que se unía a un epítipo polipeptídico en el dominio externo del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Murthy, U., et al., Arch.
20 Biochem. Biophys. 252(2) (1987) 549-560. Un potencial problema de la utilización de anticuerpos murinos en tratamientos terapéuticos es que los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el huésped humano como una proteína foránea, y por lo tanto,
25 inyecciones repetidas de tales anticuerpos foráneos pueden conducir a la inducción de respuestas inmunes que resulten en reacciones de hipersensibilidad nocivas. Para los anticuerpos monoclonales con base murina, a menudo esto se

denomina una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón, o respuesta "HAMA", o una respuesta de anticuerpo humano anti-rata, o respuesta "HARA". De forma adicional, estos anticuerpos "foráneos" pueden ser atacados por el sistema
5 inmune del huésped de forma que son neutralizados, de hecho antes de que alcancen su lugar diana. Además, los anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales murinos) normalmente carecen de funcionalidad efectora en humanos, es decir, son incapaces
10 de, entre otros, mediar la lisis dependiente de complemento o lisar las células humanas diana a través de toxicidad celular dependiente de anticuerpo o fagocitosis mediada por receptor Fc.

Los anticuerpos quiméricos que comprenden porciones de
15 anticuerpos de dos o más especies diferentes (por ejemplo, ratón y humano) se han desarrollado como alternativa a los anticuerpos "conjugados". Por ejemplo, en la US 5.891.996 (Mateo de Acosta del Rio, C.M., et al.) se discute un anticuerpo quimérico ratón/ humano, R3, dirigido frente a
20 EGFR, y en la US 5.558.864 se discute la generación de formas quiméricas y humanizadas del MAb anti-EGFR murino 425. También se ha descrito el IMC-C225 (Erbitux®; ImClone) es un anticuerpo monoclonal quimérico ratón/ humano anti-EGFR (basado en el anticuerpo monoclonal de ratón M225, que
25 resultó en respuestas HAMA en los ensayos clínicos en humanos), del que se ha demostrado una eficacia antitumoral en varios modelos de xenoinjerto humano (Herbst, R.S., y Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). La eficacia de

IMC-C225 se ha atribuido a varios mecanismos, lo que incluye la inhibición de eventos celulares regulados por las vías de señalización de EGFR, y posiblemente por un aumento de la actividad de toxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (Herbst, R.S., y Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). También se ha utilizado el IMC-C225 en ensayos clínicos, incluido en combinación con radioterapia y quimioterapia (Herbst, R.S., y Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). Recientemente, Abgenix, Inc. (Fremont, CA) desarrolló el ABX-EGF para la terapia del cáncer. ABX-EGF es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR totalmente humano (Yang, X.D., et al., Crit. Rev. Oncol./Hematol. 38 (2001) 17-23).

La WO 2006/082515 está relacionada con los anticuerpos monoclonales anti-EGFR humanizados derivados del anticuerpo monoclonal ICR62 de rata y de sus formas glucomodificadas para la terapia del cáncer.

IGF-1R y anticuerpos anti-IGF-1R

El receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1R, IGF-IR, antígeno CD 221) pertenece a la familia de proteínas tirosina quinasas transmembranales (LeRoith, D., et al., Endocrin. Rev. 16 (1995) 143-163 y Adams, T.E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1093). IGF-IR se une a IGF-I con elevada afinidad e inicia la respuesta fisiológica a este ligando *in vivo*. IGF-IR también se une a IGF-II, aunque con una afinidad ligeramente menor. La sobreexpresión de IGF-IR promueve la transformación neoplásica de las células y existe evidencia

de que IGF-IR está involucrado en la transformación maligna de las células y por lo tanto, es una diana útil para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer (Adams, T.E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1093).

Los anticuerpos frente a IGF-IR son bien conocidos en la materia y se han investigado sus efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* (Benini, S., et al., Clin. Cancer Res. 7 (2001) 1790-1797; Scotlandi, K., et al., Cancer Gene Ther. 9 (2002) 296-307; Scotlandi, K., et al., Int. J. Cancer 101 (2002) 11-16; Brunetti, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165 (1989) 212-218; Prigent, S.A., et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 9970-9977; Li, S.L., et al., Cancer Immunol. Immunother. 49 (2000) 243-252; Pessino, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 162 (1989) 1236-1243; Surinya, K.H., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 16718-16725; Soos, M. A., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 12955-12963; Soos, M.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 5217-5221; O'Brien, R., M., et al., EMBO J. 6 (1987) 4003-4010; Taylor, R., et al., Biochem. J. 242 (1987) 123-129; Soos, M.A., et al., Biochem. J. 235 (1986) 199-208; Li, S.L., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 196 (1993) 92-98; Delafontaine, P., et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 26 (1994) 1659-1673; Kull, F.C., Jr., et al. J. Biol. Chem. 258 (1983) 6561-6566; Morgan, D.O., y Roth, R.A., Biochemistry 25 (1986) 1364-1371; Forsayeth, J.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 3448-3451; Schaefer, E.M., et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 13248-

- 13253; Gustafson, T.A., y Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667; Hoyne, P.A., et al., FEBS Lett. 469 (2000) 57-60; Tulloch, P.A., et al., J. Struct. Biol. 125 (1999) 11-18; Rohlik, Q.T., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 149 (1987) 276-281; y Kalebic, T., et al., Cancer Res. 54 (1994) 5531-5534; Adams, T.E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1093; Dricu, A., et al., Glycobiology 9 (1999) 571-579; Kanter-Lewensohn, L., et al., Melanoma Res. 8 (1998) 389-397; Li, S.L., et al., Cancer Immunol. Immunother. 49 (2000) 243-252). Los anticuerpos frente a IGF-IR también se describen en muchas otras publicaciones, por ejemplo, Arteaga, C.L., et al., Breast Cancer Res. Treatment 22 (1992) 101-106; y Hailey, J., et al., Mol. Cancer Ther. 1 (2002) 1349-1353.
- 15 En particular, el anticuerpo monoclonal frente a IGF-IR denominado α IR3 se ha utilizado ampliamente en la investigación del estudio de los procesos mediados por IGF-IR y las enfermedades mediadas por IGF-I como el cáncer. Alfa-IR-3 fue descrito por Kull, F.C., J. Biol. Chem. 258 (1983) 6561-6566. En este tiempo, se han publicado alrededor de un centenar de publicaciones relacionadas con la investigación y la terapéutica con α IR3, en referencia a su efecto antitumoral, solo y en combinación con agentes citostáticos como la doxorubicina y vincristina. El α IR3 es un anticuerpo monoclonal murino que se sabe que inhibe la unión de IGF-I al receptor IGF pero no la unión de IGF-II a IGF-IR. α IR3 estimula a elevadas concentraciones la proliferación de células tumorales y la fosforilación de

IGF-IR (Bergmann, U., et al., Cancer Res. 55 (1995) 2007-2011; Kato, H., et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 2655-2661). Existen otros anticuerpos (por ejemplo, 1H7, Li, S., L., et al., Cancer Immunol. Immunother. 49 (2000) 243-252) que inhiben la unión de IGF-II a IGF-IR de forma más potente que la unión de IGF-I. Un resumen del estado de la materia de los anticuerpos y sus propiedades y características se describen en Adams, T.E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1093.

10 La mayoría de los anticuerpos descritos en el estado de la materia on de origen murino. Tales anticuerpos, como es conocido en la materia, no son útiles en la terapia de pacientes humanos sin alteraciones adicionales como la quimerización o humanización. Debido a estos
15 inconvenientes, los anticuerpos humanos son claramente preferibles como agentes terapéuticos en el tratamiento de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en la materia (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374). En base a
20 esta tecnología, pueden producirse anticuerpos humanos frente a una gran variedad de dianas. Ejemplos de anticuerpos humanos frente a IGF-IR se describen en la WO 02/053596.

La WO 2005/005635 se refiere a los anticuerpos humanos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) o <IGF-1R> HUMAB Clon 22 (DSM ACC 2594) y su utilización en la
25 terapia del cáncer.

Anticuerpos biespecíficos

Se han desarrollado una gran variedad de formatos de anticuerpo recombinante en los últimos tiempos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos tetravalentes, por ejemplo, mediante la fusión de un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (véase por ejemplo, Coloma, M.J., et al, Nature Biotech 15 (1997) 159-163; la WO 2001/077342; y Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234).

También se han desarrollado otros nuevos formatos en los que la estructura núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) no se conserva, como los dia-, tria- o tetra-anticuerpos, minianticuerpos o varios formatos de cadena sencilla (scFv, Bis-scFv), que son capaces de unirse a dos o más antígenos (Holliger P, et al, Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136, 2005; Fischer N., Léger O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen J, et al, Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C. et al Nature Biotech 25 (2007) 1290-1297)

Todos estos formatos utilizan enlazantes 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., Léger O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). Debe mantenerse en mente que puede ser deseable retener funciones efectoras, como por ejemplo, la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), que están mediadas por la unión del receptor Fc, al mantener un alto grado de similitud con los que aparecen en

la naturaleza.

En la WO 2007/024715 se describen inmunoglobulinas de dominio variable dual como proteínas unión diseñadas para ser multivalentes y multiespecíficas. Un proceso para la obtención de dímeros de anticuerpo biológicamente activos se describe en la US 6.897.044. Construcciones de anticuerpos F_v multivalentes con al menos cuatro dominios variables que están enlazados entre ellos a través de enlazantes peptídicos se describen en la US 7.129.330.

10 Estructuras de unión a antígeno diméricas y multiméricas se describen en la US 2005/0079170. En la US 6.511.663 se describen proteínas de unión a antígeno tri- o tetravalentes monoespecíficas que comprenden tres o cuatro fragmentos Fab unidos entre ellos de forma covalente

15 mediante una estructura de conexión, y esta proteína no es una inmunoglobulina natural. En la WO 2006/020258 se describen anticuerpos biespecíficos tetravalentes que pueden expresarse de forma eficiente en células procariotas y eucariotas y que son útiles en métodos terapéuticos y

20 diagnósticos. En la US 2005/0163782 se describe un método para separar o sintetizar preferentemente dímeros que están ligados a través de al menos un puente disulfuro entre cadenas de los dímeros que no están ligados a través de al menos un puente disulfuro entre cadenas en una mezcla que

25 comprende los dos tipos de dímeros polipeptídicos. Los receptores tetravalentes biespecíficos se describen en la US 5.959.083. Los anticuerpos diseñados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales se describen en la

WO 2001/077342.

Los polipéptidos de unión a antígeno multiespecíficos y multivalentes se describen en la WO 1997/001580. La WO 1992/004053 describe los homoconjugados, normalmente
5 preparados a partir de anticuerpos monoclonales de clase IgG que se unen al mismo determinante antigénico y que están unidos de forma covalente mediante entrecruzamiento sintético. Los anticuerpos monoclonales oligoméricos con gran avidéz por los antígenos se describen en la WO
10 1991/06305, en la que los oligómeros, normalmente de clase IgG, son secretados con dos o más monómeros de inmunoglobulina asociados entre ellos para formar moléculas de IgG tetraivalentes o hexaivalentes. En la US 6.350.860 se describen anticuerpos derivados de oveja y construcciones
15 de anticuerpos diseñados que pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades en el que la actividad del interferón gamma es patogénica. En la US 2005/0100543 se describen construcciones que pueden ser una diana y son transportadores multivalentes de anticuerpos biespecíficos,
20 es decir, cada molécula de la construcción que puede ser una diana puede utilizarse como transportador de dos o más anticuerpos biespecíficos. En la WO 1995/009917 se describen anticuerpos tetraivalentes biespecíficos obtenidos mediante ingeniería genética. En la WO 2007/109254 se
25 describen moléculas de unión estabilizadas que comprenden o consisten en un scFv estabilizado.

Los anticuerpos biespecíficos frente a EGFR e IGF-1R se conocen desde Lu, D., et al., Biochemical and

Biophysical Research Communications 318 (2004) 507-513; J. Biol. Chem., 279 (2004) 2856-2865; y J. Biol Chem. 280 (2005) 19665-72. Sin embargo, estos anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R muestran una
5 inhibición del crecimiento tumoral claramente reducida cuando se compara con una combinación de los anticuerpos monoespecíficos parentales (especialmente en células tumorales con el mismo nivel de expresión (elevado) de ambos, EGFR e IGF-1R).

10 **Resumen de la invención**

Sorprendentemente, se han descubierto nuevos anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/ anti-IGF-1R, que muestran al menos una inhibición del crecimiento tumoral similar comparado con la combinación de los anticuerpos
15 monoespecíficos parentales (utilizando sólo una cantidad reducida del anticuerpo biespecífico) (especialmente en células tumorales con el mismo nivel de expresión (elevado) de ambos, EGFR e IGF-1R).

Un primer aspecto de la invención actual es un
20 anticuerpo biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R, que se caracteriza por que

i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de
25 ellos un par de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende

en el dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de Id. de Sec. N°:1, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:2, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:3, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CDR3 de Id. de Sec. N°:4, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:5, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:6; y

iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de Id. de Sec. N°:11, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:12, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:13, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CDR3 de Id. de Sec. N°:14, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:15, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:16;

o dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de Id. de Sec. N°:17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:19, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CDR3 de Id. de Sec. N°:20, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:21, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:22.

En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que

i) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:7 o el Id. de Sec. N°:8, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:9 o el Id. de Sec. N°:10

ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec.

Nº:23 o el Id. de Sec. Nº:24, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. Nº:25 o el Id. de Sec. Nº:26.

En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que

5 i) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. Nº:8, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. Nº:10

10 ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. Nº:23, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. Nº:25.

Dichos anticuerpos biespecíficos son al menos bivalentes y pueden ser trivalentes, tetravalentes o
15 multivalentes. Preferiblemente el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es bivalente, trivalente o tetravalente.

Otro aspecto de la invención es una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena de dicho anticuerpo
20 biespecífico.

Otros aspectos de la invención son una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo biespecífico, dicha composición para el tratamiento del cáncer, la utilización de dicho anticuerpo biespecífico para la
25 elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer, un método para el tratamiento de un paciente que padece cáncer mediante la administración de dicho anticuerpo biespecífico a un paciente en necesidad de tal

tratamiento .

Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención muestran beneficios para los pacientes en necesidad de una terapia dirigida contra EGFR e IGF-1R. Los anticuerpos de acuerdo con la invención poseen nuevas e inventivas propiedades que causan un beneficio para un paciente que padece tal enfermedad, especialmente si padece cáncer.

Descripción Detallada de la Invención

10 Una realización de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R y que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R, y que se caracteriza por que

15 i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de ellos un par de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

20 ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de Id. de Sec. N°:1, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:2 y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:3, y en el dominio variable de la cadena ligera, una región CDR3 de Id. de Sec. N°:4, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:5, y una
25 región CDR1 de Id. de Sec. N°:6; y

iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de Id. de Sec. N°:11, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:12

y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:13, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CDR3 de Id. de Sec. N°:14, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:15, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:16.

5 Otra realización de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R y que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R, que se caracteriza por que

10 i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de ellos un par de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende
15 en el dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de Id. de Sec. N°:1, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:2 y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:3, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CDR3 de Id. de Sec. N°:4, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:5 y una región CDR1
20 de Id. de Sec. N°:6; y

iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de Id. de Sec. N°:17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:19, y en el dominio
25 variable de la cadena ligera una región CDR3 de Id. de Sec. N°:20, una región CDR2 de Id. de Sec. N°:21, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°:22.

Otra realización de la invención es un anticuerpo

biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R y que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R, que se caracteriza por que

5 i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de ellos un par de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

10 ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:7 o Id. de Sec. N°:8, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:9 o Id. de Sec. N°:10

15 iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:23 o Id. de Sec. N°:24 y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:25 o el Id. de Sec. N°:26.

Otra realización de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un
20 segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R, que se caracteriza por que

25 i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de ellos un par de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

 ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:7, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de

Sec. N°:10,

iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:23, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:25.

Otra realización de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R y que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R, que se caracteriza por que

i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de ellos un par de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:8, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:10,

iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:23, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:25.

Otra realización de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R y que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R, que se caracteriza por que

i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de

ellos un par de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende
5 como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:7 y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:10,

iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende
10 como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:24, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:26.

Otra realización de la invención es un anticuerpo biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R y que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un
15 segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R, que se caracteriza por que

i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno de ellos un par de un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de
20 un anticuerpo;

ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:8, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:10,

25 iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°:24, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°:26.

El término "anticuerpo" como se usa aquí se refiere a una proteína de unión que comprende sitios de unión a un antígeno. Los términos "sitio de unión" o "sitio de unión a antígeno" como se utilizan aquí indican la(s) región(es) de una molécula de anticuerpo a la que realmente se une un ligando. Los sitios de unión en un anticuerpo de acuerdo con la invención pueden estar formados cada uno de ellos por un par de dos dominios variables, es decir de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera. El determinante mínimo lugar de unión en un anticuerpo es la región CDR3 de la cadena pesada. En una realización de la presente invención cada uno de los sitios de unión comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo y/o un dominio variable de la cadena ligera (VL) de un anticuerpo, y preferiblemente está formado por un par que consiste en un dominio variable de la cadena ligera (VL) de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo.

La especificidad de un anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo por parte del anticuerpo de un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. Los "anticuerpos biespecíficos" de acuerdo con la invención son anticuerpos que poseen dos especificidades de unión a antígeno diferentes. Cuando un anticuerpo posee más de una especificidad, los epítipos reconocidos pueden estar asociados con un sólo antígeno o con más de un antígeno. Los anticuerpos de la presente invención son específicos de

dos antígenos diferentes, es decir EGFR como primer antígeno e IGF-1R como segundo antígeno.

El término anticuerpo "monoespecífico" como se utiliza aquí indica un anticuerpo que posee uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítipo del mismo antígeno.

El término "valente", como se utiliza en la presente solicitud, indica la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Como este, los términos "bivalente", "tetraivalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión, y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención son al menos "bivalentes" y pueden ser "trivalentes" o "multivalentes" (por ejemplo "tetraivalentes" o "hexaivalentes"). Preferiblemente el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es bivalente, trivalente o tetraivalente. En una realización dicho anticuerpo biespecífico es bivalente. En una realización dicho anticuerpo biespecífico es trivalente. En una realización dicho anticuerpo biespecífico es tetraivalente.

Los anticuerpos de la presente invención poseen dos o más sitios de unión y son biespecíficos. Es decir, los anticuerpos pueden ser biespecíficos incluso en los casos en los que existen más de dos sitios de unión (es decir que el anticuerpo es trivalente o multivalente). Los anticuerpos biespecíficos de la invención incluyen, por

ejemplo, anticuerpos multivalentes de cadena sencilla, diacuerpos y triacuerpos, así como anticuerpos con la estructura del dominio constante de un anticuerpo completo al que se le unen sitios de unión al antígeno adicionales
5 (por ejemplo, un Fv de cadena sencilla, un dominio VH y/o un dominio VL, Fab o (Fab)₂) a través de uno o más enlazante peptídicos. Los anticuerpos pueden ser en su totalidad de una única especie o ser quiméricos o humanizados. En un anticuerpo con más de dos sitios de unión al antígeno,
10 algunos sitios de unión pueden ser idénticos, siempre que la proteína posea sitios de unión para dos antígenos diferentes. Es decir, mientras un primer sitio de unión es específico para EGFR, un segundo sitio de unión es específico para IGF-1R.

15 Como los anticuerpos naturales, los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención normalmente contienen seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuyen en grado variable a la afinidad del sitio de unión al antígeno. Existe tres CDR del dominio
20 variable de la cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR del dominio variable de la cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las regiones CDR y marco (FR) se determina mediante una comparación con una base de datos de secuencias aminoacídicas compilada, en la que estas
25 regiones se han definido de acuerdo con la variabilidad entre secuencias. También se incluyen dentro del alcance de la invención los sitios de unión a antígeno funcionales que comprender de un número menor de CDR (es decir, en los que

la especificidad de unión está determinada por tres, cuatro o cinco CDR). Por ejemplo, puede ser suficiente menos de un juego completo de seis CDR para la unión. En algunos casos, un dominio VH o VL será suficiente.

- 5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención además 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
- 10 una realización preferible, un anticuerpo de la invención posee una estructura del dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG, pero con cuatro sitios de unión al antígeno. Esto se consigue mediante el enlace de dos sitios de unión al antígeno completos (por ejemplo, un Fv de cadena
- 15 sencilla) que se unen específicamente a EGFR, al extremo N- o C-terminal de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo completo que se une específicamente a IGF-1R. Los cuatro sitios de unión al antígeno preferiblemente comprenden dos sitios de unión para cada uno de las dos especificidades de
- 20 unión diferentes.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan aquí se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

- 25 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de un origen o especie, y al menos una porción de una región constante derivada de un origen o

especie diferente, normalmente obtenido mediante técnicas de DNA recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana son preferibles. Otras formas preferibles de "anticuerpos quiméricos" incluidas en la presente invención son aquellos en los que la región constante se ha modificado o cambiado respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente respecto a la unión a Clq y/o a la unión del receptor Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos con cambio de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de la expresión de los genes de las inmunoglobulinas que comprenden segmentos de DNA que codifican las regiones variables de las inmunoglobulinas y segmentos de DNA que codifican las regiones constantes de las inmunoglobulinas. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos involucran las técnicas convencionales de DNA recombinante y de transfección génica y son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; y las patentes US 5.202.238 y US 5.204.244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que las regiones marco o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender las CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad comparada con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferible, una CDR murina se

inserta en una 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. Las CDR

5 particularmente preferibles corresponden a aquellas que representan las secuencias que reconocen los antígenos mencionados anteriormente para los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" incluidos en la presente invención son aquellos en los que la región

10 constante se ha modificado o cambiado de forma adicional respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente respecto a la unión a Clq y/o la unión del receptor de Fc (FCR).

15 El término "anticuerpo humano", como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos con las regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en la materia (van Dijk, M.A., y van de Winkel,

20 J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras una inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción

25 de inmunoglobulinas endógenas. La transferencia del conjunto de genes de la inmunoglobulina de línea germinal humana a la línea germinal de tales ratones mutantes resultará en 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). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en bibliotecas de presentación de 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. también están disponibles para la preparación de anticuerpos humanos monoclonales (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 ya se ha mencionado para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano" como se usa aquí también comprende aquellos anticuerpos que están modificados en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente respecto a la unión de Clq y/o la unión de FcR, por ejemplo, mediante "cambio de clase", es decir, el cambio o mutación de las partes Fc (por ejemplo, mutación de IgG1 a IgG4 y/o IgG1/IgG4.)

El término "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se han preparado, expresado, creado o aislado mediante medios recombinantes, como los anticuerpos aislados a partir de una célula huésped como una célula NS0 o CHO, o a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que

es transgénico para los genes de la inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen las regiones variables y constantes reorganizadas. Los anticuerpos recombinantes humanos de acuerdo con la invención se han sometido a una hipermutación somática *in vivo*. Por lo tanto, las secuencias de aminoácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque son derivadas y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no aparecer naturalmente en un repertorio de anticuerpos de línea germinal humana *in vivo*.

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) como se usa aquí indica cada par de cadenas ligeras y pesadas que están directamente involucradas en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas humanas 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 de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional a través de las regiones marco y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de unión al

antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo juegan un papel particularmente importante en la especificidad/ afinidad de la unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por lo tanto
5 proporcionan otro objeto de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión del antígeno de un anticuerpo", como se utiliza aquí, se refiere a los residuos aminoacídicos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región
10 hipervariable comprende los residuos aminoacídicos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "marco" o "FR", como se utilizan aquí, son aquellas regiones del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable. Por lo tanto, las
15 cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden de N- a C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR de cada cadena están separadas por tales aminoácidos marco. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye la mayor parte de la
20 unión del antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat et al., Sequencies of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

25 Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención incluyen, además, aquellos anticuerpos que poseen "modificaciones de secuencia conservativas" (lo que se entiende por "variantes" de los anticuerpos biespecíficos).

57

Esto significa modificaciones de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos que no afectan o alteran las características anteriormente mencionadas del anticuerpo de acuerdo con la invención. Las modificaciones pueden

5 introducirse mediante técnicas estándar conocidas en la materia, como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis mediante PCR. Las sustituciones de aminoácido conservativas incluyen aquellas en las que el residuo aminoacídico es reemplazado por un residuo aminoacídico con una cadena

10 lateral similar. Se han definido las familias de residuos aminoacídicos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acídicas (por ejemplo ácido aspártico, ácido

15 glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con

20 ramificaciones beta (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo aminoacídico que se predice no esencial en un anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF1R> puede reemplazarse

25 preferiblemente con otro residuo aminoacídico de la misma familia de cadenas laterales. Un anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF1R>, "variante" se refiere aquí, por lo tanto, a una molécula en la que su secuencia de aminoácidos difiere

de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo
bienespecífico <EGFR-IGF1R> "parental" en hasta diez,
preferiblemente entre alrededor de dos y alrededor de cinco
adiciones, deleciones y/o sustituciones en una o más
5 regiones variables o regiones constantes del anticuerpo
parental. Las sustituciones de aminoácidos pueden
realizarse mediante mutagénesis en base a modelos
moleculares como se describe en Riechmann, L., et al.,
Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C., et al., Proc. Natl.
10 Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

La identidad u homología con respecto a la secuencia
se define aquí como el porcentaje de residuos aminoacídicos
en la secuencia candidata que son idénticos a la secuencia
parental, tras un alineamiento de las secuencias e
15 introducción de huecos, si es necesario, para alcanzar el
porcentaje máximo de identidad de secuencia. No deben
construirse anticuerpos con extensiones N-terminales, C-
terminales o internas, deleciones, o inserciones en la
secuencia que afecten la identidad u homología de
20 secuencia. La variante retiene la capacidad de unirse al
EGFR humano e IGF-1R humano.

Como se utiliza aquí, el término "unión" o "unión
específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un
epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferiblemente
25 en un ELISA basado en células con células CHO expresando el
antígeno salvaje. Unión significa una afinidad de unión (K_D)
de 10^{-8} M o inferior, preferiblemente de 10^{-13} M a 10^{-9} M. La
unión del anticuerpo al antígeno o FcγRIII puede analizarse

mediante un ensayo Biacore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de la tasa de asociación del anticuerpo en el complejo anticuerpo/ 5 antígeno), k_d (constante de disociación), y K_D (k_d/k_a).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítipo incluyen agrupamientos de superficie químicamente 10 activa de moléculas como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales específicas tridimensionales o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se 15 une mediante un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando este reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico 20 humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1, y denominado aquí "EGFR") es un receptor transmembranal de 170 kDa codificado por el protooncogén c-erbB, y muestra un actividad tirosina quinasa intrínseca (Modjtahedi, H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235; Herbst, R.S., y Shin, 25 D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611). La entrada P00533 de la base de datos SwissProt proporciona la secuencia de EGFR. También existen isoformas y variantes de EGFR (por ejemplo, transcritos alternativos de RNA, versiones truncadas,

polimorfismos, etc.) lo que incluye pero no se limita a aquellos identificados por los números de entrada de la base de datos de Swissprot P00533-1, P00533-2, P00533-3 y P00533-4. Es conocido que EGFR se une a ligandos, lo que incluye el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante- α , TGF- α , TGF- β , EGF de unión a heparina (hb-EGF), betacelulina y epiregulina (Herbst, R.S. y Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Mendelsohn, J. y Baselga, J., Oncogene 19 (2000) 6550-6565). EGFR regula numerosos procesos celulares a través de rutas de transducción de señales mediadas por tirosina quinasa, lo que incluye pero no se limita a la activación de rutas de transducción de señales que controlan la diferenciación y proliferación celular, supervivencia celular, apoptosis, angiogénesis, mitogénesis y metástasis (Atalay, G., et al., Ann. Oncology 14 (2003) 1346-1363; Tsao, A.S., y Herbst, R.S., Signal 4 (2003) 4-9; Herbst, R.S., y Shin, D.M., Cancer 94 (2002) 1593-1611; Modjtahedi, H., et al., Br. J. Cancer 73 (1996) 228-235).

El receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-IR, antígeno CD 221) pertenece a la familia de proteínas transmembranales tirosina quinasas (LeRoith, D., et al., Endocrin. Rev. 16 (1995) 143-163; y Adams, T.E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1063). La entrada de la base de datos SwissProt P08069 proporciona la secuencia del IGF-1R. IGF-IR se une a IGF-I con elevada afinidad e inicia la respuesta fisiológica a este ligando *in vivo*. IGF-IR también se une a IGF-II, aunque con una

afinidad ligeramente inferior. La sobreexpresión de IGF-IR promueve la transformación neoplásica de las células y existen evidencias de que IGF-IR está involucrado en la transformación maligna de las células y es por lo tanto una
5 diana útil para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer (Adams, T.E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1063).

En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo parental completo como
10 armazón.

El término "anticuerpo completo" indica un anticuerpo que consiste en dos "cadenas pesadas de un anticuerpo completo" y dos "cadenas ligeras de un anticuerpo completo" (véase la Figura 10 para un esquema de la estructura de un
15 "anticuerpo completo" sin dominio CH4. Véase también en la Fig. 1 y 12 la parte completa de los formatos biespecíficos tetravalentes con Fv de cadena sencilla unidos (XGFR) y con Fab de cadena sencilla unidos (scFab-XGFR)). Una "cadena pesada de anticuerpo completo" es un polipéptido que
20 consiste en dirección de N-terminal a C-terminal de un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de la cadena pesada del anticuerpo (CH1), una región bisagra del anticuerpo (HR), un dominio constante 2 de la cadena pesada del anticuerpo (CH2) y un
25 dominio constante 3 de la cadena pesada del anticuerpo (CH3), abreviado como VH-CH1-HR-CH2-CH3; y opcionalmente un dominio constante 4 de la cadena pesada del anticuerpo (CH4) en el caso de un anticuerpo de subclase IgE.

Preferiblemente la "cadena pesada de un anticuerpo completo" es un polipéptido que consiste en dirección de N-terminal a C-terminal en VH, CH1, HR, CH2 y CH3. Una "cadena ligera de un anticuerpo completo" es un polipéptido
5 que consiste en dirección de N-terminal a C-terminal en un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo (VL), y un dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo (CL), abreviado como VL-CL. El dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo (CL) puede ser κ (kappa) o λ
10 (λ). Las dos cadenas de anticuerpo completo están unidas entre ellas a través de puentes disulfuro entre polipéptidos, entre el dominio CL y el dominio CH1 y entre las regiones bisagra de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de anticuerpo completos
15 típicos son los anticuerpos naturales como IgG (por ejemplo IgG1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos completos de acuerdo con la invención pueden ser de una única especie, por ejemplo humano, o pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados. Los anticuerpos completos de
20 acuerdo con la invención comprenden dos sitios de unión al antígeno, cada uno de ellos formado por un par de VH y VL, que se unen específicamente al mismo antígeno. Por lo tanto, un anticuerpo monoespecífico bivalente (= completo) que comprende un primer sitio de unión a antígeno y que
25 consiste en dos cadenas ligeras del anticuerpo y dos cadenas pesadas del anticuerpo es un anticuerpo completo. El extremo C-terminal de la cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo completo indica el último aminoácido del extremo

C-terminal de dicha cadena ligera o pesada. El extremo N-terminal de la cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo completo indica el último aminoácido del extremo N-terminal de dicha cadena ligera o pesada.

- 5 En una realización, dicho anticuerpo biespecífico es bivalente y utiliza formatos como los se describen por ejemplo a) en las patentes WO 2009/080251, WO 2009/080252 o WO 2009/080253 (anticuerpos con intercambio de dominios - véase el Ejemplo 14) o b) basados en un anticuerpo de
- 10 fusión scFab-Fc, en el que un fragmento Fab de cadena sencilla es específico para EGFR y el otro para IGF-1R (véase el Ejemplo 17) o c) en la solicitud de patente PE 07024867.9 (WO 2009/080251), Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; la WO 96/027011; Merchant A.M, et al.,
- 15 Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35 y la PE 1870459A1. En una realización, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que comprende como secuencias aminoacídicas los Id. de Sec. N°:30, Id. de Sec. N°:31, Id.
- 20 de Sec. N°:32 e Id. de Sec. N°:33 o variantes de las mismas. En una realización el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que comprende como secuencias aminoacídicas los Id. de Sec. N°:34, Id. de Sec. N°:35, Id. de Sec. N°:36 e Id. de Sec. N°:37 o
- 25 variantes. En una realización el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza por que comprende como secuencias aminoacídicas los Id. de Sec. N°:38 e Id. de Sec. N°:39 o variantes de las mismas. Estas secuencias

aminoacídicas se basan en los dominios variables de la
cadena pesada de Id. de Sec. N°:8, y los dominios variables
de la cadena ligera de Id. de Sec. N°:10 (derivados de
<EGFR>ICR62 humanizado) como primer sitio de unión a
5 antígeno que se une a EGFR, y en los dominios variables de
la cadena pesada de Id. de Sec. N°:23, y los dominios
variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°:25
(derivados del anticuerpo humano anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB
Clon 18 (DSM ACC 2587)) como segundo sitio de unión a
10 antígeno que se une a IGF-1R.

En una realización, dicho anticuerpo biespecífico es
trivalente y utilizan, por ejemplo, formatos basados en un
anticuerpo de longitud completa que se une específicamente
a uno de los dos receptores EGFR o IGF-1R, al que se
15 fusiona sólo en un extremo C-terminal de una cadena pesada
un fragmento scFab que específicamente se une al otro de
los dos receptores EGFR o IGF-1R, lo que incluye la
tecnología de "botón en ojal", como se describe por ejemplo
en la solicitud de patente PE 09004909.9, o por ejemplo,
20 formatos basados en un anticuerpo de longitud completa que
se une específicamente a uno de los dos receptores EGFR o
IGF-1R, en el que se fusiona en un extremo C-terminal de
una de las cadenas pesadas un fragmento VH o VH-CH1 y en el
otro extremo C-terminal de la segunda cadena pesada un
25 fragmento VL o VL-CL que se une específicamente al otro de
los dos receptores EGFR o IGF-1R, lo que incluye la
tecnología "botón en ojal", como se describe por ejemplo en
la solicitud de patente PE 09005108.7.

En una realización, dicho anticuerpo biespecífico es tetravalente y utiliza formatos como los que se describen por ejemplo en la WO 2007/024715, WO 2007/109254 o solicitud de patente PE 09004909.9 (anticuerpo completo que
5 se une a un primer antígeno al que se fusionan dos fragmentos scFab que se unen al otro antígeno) (véanse por ejemplo, los Ejemplos 1 o 9).

En una realización, dicho anticuerpo biespecífico es tetravalente, y consiste en

- 10 a) un anticuerpo bivalente monoespecífico que comprende dicho primer sitio de unión al antígeno y que consiste en dos cadenas ligeras de anticuerpo y dos cadenas pesadas de anticuerpo, y cada cadena comprende sólo un dominio variable,
- 15 b) dos enlaces peptídicos, y
- c) dos anticuerpos de cadena sencilla monovalentes monoespecíficos (Fv de cadena sencilla monoespecífico monovalente) que comprenden dicho segundo sitio de unión al antígeno, y cada uno de ellos consiste en un dominio
20 variable de la cadena ligera, un dominio variable de la cadena pesada, y un enlace de cadena sencilla entre dicho dominio variable de la cadena ligera y dicho dominio variable de la cadena pesada; en el que dichos anticuerpos de cadena sencilla (dicho Fv de cadena sencilla) están
25 ligados al mismo extremo de las cadenas ligeras del anticuerpo o las cadenas pesadas del anticuerpo monoespecífico bivalente.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico es

tetravalente, y consiste en

a) un anticuerpo bivalente monoespecífico que comprende dicho segundo sitio de unión al antígeno y que consiste en dos cadenas ligeras de anticuerpo y dos cadenas pesadas de anticuerpo, y cada una de las cadenas comprende sólo un dominio variable,

b) dos enlazantes peptídicos, y

c) dos anticuerpos de cadena sencilla monovalentes monoespecíficos (Fv de cadena sencilla monoespecífico monovalente) que comprenden dicho segundo sitio de unión al antígeno, y cada uno de ellos consiste en un dominio variable de la cadena ligera, un dominio variable de la cadena pesada, y un enlazante de cadena sencilla entre dicho dominio variable de la cadena ligera y dicho dominio variable de la cadena pesada; en el que dichos anticuerpos de cadena sencilla (dicho Fv de cadena sencilla) están ligados al mismo extremo de las cadenas ligeras del anticuerpo o las cadenas pesadas del anticuerpo monoespecífico bivalente.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico es tetravalente, y consiste en

a) un anticuerpo de longitud completa que comprende dicho sitio de unión al antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo; y

b) dos fragmentos Fab de cadena sencilla idénticos, que comprenden dicho segundo sitio de unión al antígeno,

en los que dichos fragmentos Fab de cadena sencilla de

b) están fusionados al anticuerpo completo mencionado en a) mediante un conector peptídico en el extremo C- o N-terminal de la cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo completo.

5 En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico es tetravalente, y consiste en

 a) un anticuerpo de longitud completa que comprende dicho segundo sitio de unión a antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de
10 anticuerpo; y

 b) dos fragmentos Fab de cadena sencilla idénticos que comprenden dicho primer sitio de unión a antígeno,

 en los que dichos fragmentos Fab de cadena sencilla de b) están fusionados al anticuerpo completo mencionado en a) mediante un conector peptídico en el extremo C- o N-
15 terminal de la cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo completo.

 Preferiblemente, dichos fragmentos Fab de cadena sencilla de b) están fusionados al anticuerpo completo
20 mencionado en a) a través de un conector peptídico en el extremo C-terminal de la cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo completo.

 En una realización, dos fragmentos Fab de cadena sencilla idénticos que se unen a un segundo antígeno están
25 fusionados a dicho anticuerpo completo a través de un conector peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo completo.

 En una realización, dos fragmentos Fab de cadena

sencilla idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo completo a través de un conector peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de dicho anticuerpo completo.

5 En una realización, dos fragmentos Fab de cadena sencilla idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo completo a través de un conector peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena ligera de dicho anticuerpo completo.

10 En otra realización, dicho anticuerpo tetravalente biespecífico con las siguientes características:

- consiste en:

a) un anticuerpo parental bivalente monoespecífico (completo) que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo completo y dos cadenas ligeras de anticuerpo completo, en el que cada cadena comprende sólo un dominio variable,

b) dos enlazante peptídicos,

c) dos anticuerpos de cadena sencilla monovalentes monoespecíficos (Fv de cadena sencilla monovalente monoespecífico) y cada uno de ellos consiste en un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo, un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo, y un enlazante de cadena sencilla entre dicho dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y dicho dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

y preferiblemente dichos anticuerpos de cadena sencilla (dichos Fv de cadena sencilla) están ligados al

mismo extremo (C- y N-terminal) de las cadenas pesadas del anticuerpo bivalente monoespecífico o, alternativamente al mismo extremo (preferiblemente el C-terminal) de las cadenas ligeras del anticuerpo bivalente monoespecífico, y
5 más preferiblemente al mismo extremo (C- y N-terminal) de las cadenas pesadas del anticuerpo bivalente monoespecífico.

El término "enlazante peptídico" como se utiliza en la invención indica un péptido con secuencias aminoacídicas,
10 que preferiblemente es de origen sintético. Estos enlazantes peptídicos de acuerdo con la invención se utilizan para ligar los diferentes sitios de unión al antígeno y/o fragmentos de anticuerpo que finalmente comprenden los diferentes sitios de unión a antígeno (por
15 ejemplo Fv de cadena sencilla, anticuerpos completos, un dominio VH y/o un dominio VL, parte Fab, (Fab)₂, Fc) para formar todos juntos un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención. Los enlazantes peptídicos pueden comprender una o más de las siguientes secuencias de
20 aminoácido listadas en la Tabla 1, así como otros aminoácidos seleccionados de forma arbitraria. Dichos enlazantes peptídicos son péptidos con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 5 aminoácidos, preferiblemente de al menos 10 aminoácidos, más
25 preferiblemente con una longitud de entre 10 y 50 aminoácidos. Preferiblemente, dichos enlazantes peptídicos de b) son péptidos con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 10 aminoácidos. En una realización,

dicho enlazante peptídico es $(G_xS)_n$ con G = glicina, S = serina, ($x = 3$ y $n = 3, 4, 5$ o 6) o ($x = 4$ y $n = 2, 3, 4$ o 5), preferiblemente $x = 4$ y $n = 2$ o 3 , más preferiblemente con $x = 4$, $n = 2$ ($(G_4S)_2$). A dicho enlazante peptídico $(G_xS)_n$ también pueden añadirse G = glicinas adicionales, por ejemplo GG o GGG.

El término "enlazante de cadena sencilla" como se utiliza en la invención indica un péptido con secuencias aminoacídicas que preferiblemente son de origen sintético.

10 Estos enlazantes de cadena sencilla de acuerdo con la invención se utilizan para ligar un dominio VH y un VL para formar un Fv de cadena sencilla. Preferiblemente, dicho enlazante de cadena sencilla de c) es un péptido con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 15 aminoácidos, más preferiblemente con una longitud de al menos 20 aminoácidos. En una realización dicho enlazante de cadena sencilla es $(G_xS)_n$ con G = glicina, S = serina, ($x = 3$ y $n = 4, 5$ o 6) o ($x = 4$ y $n = 3, 4$ o 5), preferiblemente con $x = 4$, $n = 4$ o 5 , más preferiblemente con $x = 4$, $n = 4$.

20 Además dichos anticuerpos de cadena sencilla (Fv de cadena sencilla) preferiblemente están estabilizados mediante disulfuros. Esta estabilización adicional con disulfuros de los anticuerpos de cadena sencilla se consigue mediante la introducción de un puente disulfuro entre los dominios variables de los anticuerpos de cadena sencilla y se describe, por ejemplo, en la WO 94/029350, Rajagopal, V., et al., Prot. Engin. 10 (12) (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology 25 (1998)

387-393; o Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711 - 1721.

En una realización de los anticuerpos de cadena sencilla estabilizados mediante disulfuros (Fv de cadena sencilla), el puente disulfuro entre los dominios variables de los anticuerpos de cadena sencilla que está comprendido en el anticuerpo de acuerdo con la invención se selecciona independientemente para cada anticuerpo de cadena sencilla de entre:

10 i) de la posición 44 del dominio variable de la cadena pesada a la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera,

ii) posición 105 del dominio variable de la cadena pesada a la posición 43 del dominio variable de la cadena ligera, o

15 iii) posición 101 del dominio variable de la cadena pesada a la posición 100 el dominio variable de la cadena ligera.

En una realización, el puente disulfuro entre los dominios variables de los anticuerpos de cadena sencilla que está comprendido en el anticuerpo de acuerdo con la invención, está entre la posición 44 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera. En una realización, el puente disulfuro entre los dominios variables de los anticuerpos de cadena sencilla que está comprendido en el anticuerpo de acuerdo con la invención, está entre la posición 105 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 43 del

dominio variable de la cadena ligera.

En una realización, dichos anticuerpos de cadena sencilla (Fv de cadena sencilla) sin dicha estabilización de disulfuro opcional entre los dominios variables VH y VL
5 de anticuerpo de cadena sencilla (Fv de cadena sencilla) son preferibles.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico se caracteriza por que

- dos sitios de unión al antígeno están formados cada
10 uno de ellos por los dos pares de dominios variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo parental bivalente monoespecífico y ambos se unen al mismo epítopo,

- los dos sitios de unión al antígeno adicionales están formados cada uno de ellos por el dominio variable de
15 la cadena pesada y ligera de un anticuerpo de cadena sencilla,

- los anticuerpos de cadena sencilla están ligados cada uno de ellos a una cadena pesada o a una cadena ligera a través de un enlazante peptídico, mientras cada cadena
20 terminal de anticuerpo está ligada sólo a un anticuerpo de cadena sencilla.

En otra realización dicho anticuerpo biespecífico tetravalente se caracteriza por que dicha parte de anticuerpo (completo) bivalente monoespecífico en a) se une
25 a EGFR y dichos dos anticuerpos de cadena sencilla monoespecíficos monovalentes de c) se unen a IGF-1R.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico tetravalente se caracteriza por que dicha parte de

anticuerpo (completo) bivalente monoespecífico de a) se une a IGF-1R y dichos dos anticuerpos de cadena sencilla monoespecíficos monovalentes de c) se unen a EGFR.

La estructura de esta primera realización tetravalente de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se une a EGFR e IGF-1R, en el que uno de los antígenos A o B es EGFR, mientras que el otro es IGF-1R. La estructura basada en un anticuerpo de longitud completa que se une a un antígeno A, al que se ligan dos Fv de cadena sencilla (opcionalmente estabilizados con disulfuros) que se unen al antígeno B, a través de un enlazante peptídico se ejemplifica en los esquemas de las Figuras 1 y 2.

En una segunda realización tetravalente, el anticuerpo biespecífico tetravalente, comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a dicho primer antígeno (uno de los dos antígenos EGFR o IGF-1R) y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadena ligeras de anticuerpo; y

b) dos fragmentos Fab de cadena sencilla idénticos que se unen específicamente a dicho segundo antígeno (el otro de los dos antígenos EGFR o IGF-1R),

en el que dichos fragmentos Fab de cadena sencilla de b) están fusionados a dicho anticuerpo completo de a) a través de un conector peptídico en el extremo C- o N-terminal de la cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo completo.

En una realización, dos fragmentos Fab de cadena sencilla idénticos que se unen a un segundo antígeno están

fusionados a dicho anticuerpo completo a través de un conector peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena ligera o pesada de dicho anticuerpo completo.

En una realización, dos fragmentos Fab de cadena
5 sencilla idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo completo a través de un conector peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena pesada de dicho anticuerpo completo.

En una realización, dos fragmentos Fab de cadena
10 sencilla idénticos que se unen a un segundo antígeno están fusionados a dicho anticuerpo completo a través de un conector peptídico en el extremo C-terminal de cada cadena ligera de dicho anticuerpo completo.

Un "fragmento Fab de cadena sencilla" (véase la Figura
15 11) es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo (VL), un dominio constante de la cadena ligera de un anticuerpo (CL) y un enlazante,
20 en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazante tienen uno de los siguientes órdenes en dirección de N-terminal a C-terminal: a) VH-CH1-enlazante-VL-CL, b) VL-CL-enlazante-VH-CH1, c) VH-CL-enlazante-VL-CH1 o d) VL-CH1-enlazante-VH-CL; y en el que dicho enlazante es un
25 polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferiblemente de entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab de cadena sencilla a) VH-CH1-enlazante-VL-CL, b) VL-CL-enlazante-VH-CH1, c) VH-CL-enlazante-VL-CH1 y d) VL-CH1-enlazante-VH-CL,

están estabilizados a través de un puente disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. El término "N-terminal" indica el último aminoácido en posición N-terminal. El término "C-terminal" indica el último aminoácido en posición C-terminal.

En una realización preferible, dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazante en dicho fragmento Fab de cadena sencilla tienen uno de los siguientes órdenes en dirección de N-terminal a C-terminal: a) VH-CH1-enlazante-VL-CL, b) VL-CL-enlazante-VH-CH1, o más preferiblemente VL-CL-enlazante-VH-CH1.

En otra realización preferible, dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazante de dicho fragmento Fab de cadena sencilla tienen uno de los siguientes órdenes en dirección de N-terminal a C-terminal: a) VH-CL-enlazante-VL-CH1 o b) VL-CH1-enlazante-VH-CL.

El término "conector peptídico" como se utiliza a lo largo de la invención indica un péptido con secuencias de aminoácido que preferiblemente son de origen sintético. Estos conectores peptídicos de acuerdo con la invención se utilizan para fusionar los fragmentos Fab de cadena sencilla al extremo C- o N-terminal del anticuerpo completo para formar los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dichos conectores peptídicos de b) son péptidos con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 5 aminoácidos, preferiblemente con una longitud de entre 5 y 100, más preferiblemente de entre 10 y 50 aminoácidos. En una realización, dicho conector

peptídico es $(G_xS)_n$ o $(G_xS)_nG_m$, con G = glicina, S = serina, y $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ o } 6, y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$ o $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ o } 5 y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, preferiblemente $x = 4$ y $n = 2$ o 3, más preferiblemente con $x = 4, n = 2$. En una
5 realización, dicho conector peptídico es $(G_4S)_2$.

El término "enlazante" como se utiliza a lo largo de la invención indica un péptido con una secuencia de aminoácido que preferiblemente es de origen sintético. Estos péptidos de acuerdo con la invención se utilizan para
10 ligar a) VH-CH1 a VL-CL, b) VL-CL a VH-CH1, c) VH-CL a VL-CH1 o d) VL-CH1 a VH-CL, para formar los siguientes fragmentos Fab de cadena sencilla de acuerdo con la invención a) VH-CH1-enlazante-VL-CL, b) VL-CL-enlazante-VH-CH1, c) VH-CL-enlazante-VL-CH1 o d) VL-CH1-enlazante-VH-CL.
15 Dicho enlazante del fragmento Fab de cadena sencilla es un péptido con una secuencia de aminoácido con una longitud de al menos 30 aminoácidos, preferiblemente con una longitud de entre 32 y 50 aminoácidos. En una realización, dicho enlazante es $(G_xS)_n$ con G = glicina, S = serina, $(x = 3, n =$
20 $8, 9 \text{ o } 10 y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$ o $(x = 4 y n = 6, 7 \text{ o } 8 y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, preferiblemente con $x = 4, n = 6 \text{ o } 7 y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3$, más preferiblemente con $x = 4, n = 7 y m = 2$. En una realización dicho enlazante es $(G_4S)_6G_2$.

Opcionalmente en dicho fragmento Fab de cadena
25 sencilla, de forma adicional al puente disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1, también se estabilizan mediante disulfuros el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH) y el dominio variable de

70

la cadena ligera del anticuerpo (VL), pudiéndose introducir el puente disulfuro entre las siguientes posiciones: i) entre la posición 44 del dominio variable de la cadena pesada a la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera, ii) entre la posición 105 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 43 del dominio variable de la cadena ligera, o iii) entre la posición 101 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera (numeración siempre de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Tal estabilización adicional con disulfuros de los fragmentos Fab de cadena sencilla se consigue mediante la introducción de un puente disulfuro entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab de cadena sencilla.

Las técnicas para introducir puentes disulfuro no naturales para la estabilización de un Fv de cadena sencilla se describen por ejemplo en la WO 94/029350, Rajagopal, V., et al, Prot. Engin. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al; Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; o Schmidt, M., et al , Oncogene (1999) 18, 1711 -1721. En una realización, el puente disulfuro opcional entre los dominios variables de los fragmentos Fab de cadena sencilla que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención están entre la posición 44 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera. En una realización, el puente disulfuro opcional entre los dominios variables de los fragmentos Fab de cadena sencilla que comprende el anticuerpo de acuerdo

con la invención está entre la posición 105 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 43 del dominio variable de la cadena ligera (numeración siempre de acuerdo con el índice EU de Kabat).

5 En una realización, son preferibles los fragmentos Fab de cadena sencilla sin dicha estabilización disulfuro opcional entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab de cadena sencilla.

10 Preferiblemente, dicha segunda realización de un anticuerpo biespecífico tetravalente de acuerdo con la invención comprende dos fragmentos Fab de cadena sencilla idénticos (preferiblemente VL-CL-enlazante-VH-CH1) que están fusionados a los dos extremos C-terminal de las dos cadenas pesadas o a los dos extremos C-terminal de las dos
15 cadenas ligeras de dicho anticuerpo completo de a). Tal fusión resulta en dos péptidos de fusión idénticos (i) cadena pesada y fragmento Fab de cadena sencilla o ii) cadena ligera y fragmento Fab de cadena sencilla) que se coexpresan con i) la cadena ligera o la cadena pesada del
20 anticuerpo completo para proporcionar el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención (véase la Fig. 12, 13 y 14).

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico tetravalente se caracteriza por dicha parte de anticuerpo
25 completo de a) que se une a EGFR y dichos dos fragmentos Fab de cadena sencilla de b) que se unen a IGF-1R.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico tetravalente se caracteriza por dicha parte de anticuerpo

completo de a) que se une a IGF-1R y dichos dos fragmentos Fab de cadena sencilla de b) que se unen a EGFR.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante se deriva de origen humano.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es de subclase IgG1 humana, o de subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante del anticuerpo biespecífico de acuerdo con el anticuerpo de la invención es de subclase IgG2 humana.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante del anticuerpo biespecífico de acuerdo con el anticuerpo de la invención es de subclase IgG3 humano.

En otra realización, dicho anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la región constante del anticuerpo biespecífico de acuerdo con el anticuerpo de la invención es de subclase IgG4 humana o de subclase IgG4 con la mutación adicional S228P.

Se ha descubierto que los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la actual invención poseen características mejoradas. Muestran al menos la misma o mayor actividad/eficacia antitumoral *in vitro* e *in vivo* comparado con la utilización de sólo uno o de los dos anticuerpos

individuales en combinación, o con los anticuerpos
bienespecíficos de Lu, D., et al., Biochemical and
Biophysical Research Communications 318 (2004) 507-513; J.
Biol. Chem., 279 (2004) 2856-2865; y J. Biol Chem. 280
5 (2005) 19665-72. Estos muestran una estabilidad
farmacocinética mejorada *in vivo* comparada con la de los
anticuerpos bienespecíficos de Lu, D., et al., Biochemical
and Biophysical Research Communications 318 (2004) 507-513;
J. Biol. Chem., 279 (2004) 2856-2865; y J. Biol Chem. 280
10 (2005) 19665-72. Además, los anticuerpos bienespecíficos de
acuerdo con la actual invención muestran una regulación
negativa/ internalización del receptor modulada comparado
con la administración de sólo uno o de los dos anticuerpos
individuales en combinación. Además, los anticuerpos
15 bienespecíficos de acuerdo con la actual invención pueden
proporcionar beneficios como una reducción de la dosis y/o
de la frecuencia de la administración, y de forma
concomitante un ahorro de los costes.

El término "región constante" como se utiliza a lo
20 largo de la actual solicitud indica el sumatorio de los
dominios de un anticuerpo que son diferentes de la región
variable. La región constante no está involucrada
directamente en la unión del antígeno, pero muestra varias
funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia
25 aminoacídica de la región constante de sus cadenas pesadas,
los anticuerpos se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE,
IgG e IgM, y algunas de estas pueden dividirse
adicionalmente en subclases, como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4,

IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , ψ y μ respectivamente. Las regiones constantes de la cadena ligera que pueden encontrarse en las cinco clases de anticuerpo se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

El término "derivados de la región constante de origen humano" como se utiliza en la actual solicitud indica una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo humano de subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región constante de la cadena ligera kappa o lambda. Tales regiones constantes son bien conocidas en la materia y se describen por ejemplo en Kabat, E.A., (véase por ejemplo Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788). Mientras los anticuerpos de subclase IgG4 muestran una unión reducida al receptor Fc (Fc γ RIIIa), los anticuerpos de otras subclases IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, los residuos Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435 son residuos que si se alteran también proporcionan una unión reducida al receptor 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; PE 0 307 434). En una realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención posee una unión reducida a FcR comparado con un anticuerpo

IgG1 y el anticuerpo parental (completo) monoespecífico bivalente es respecto a su unión a FcR de subclase IgG4 o de subclase IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una
5 realización, las mutaciones en el anticuerpo parental (completo) bivalente monoespecífico son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236. En otra realización, las mutaciones en el anticuerpo parental (completo) bivalente monoespecífico se sitúan en S228P de IgG4, y en L234A y
10 L235A de IgG1. Las regiones constantes de la cadena pesada se muestran en el Id. de Sec. N°:27 y 28. En una realización, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo parental (completo) bivalente monoespecífico es el Id. de Sec. N°:27, con las mutaciones L234A y L235A. En
15 otra realización, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo parental (completo) bivalente monoespecífico es el Id. de Sec. N°:28, con la mutación S228P. En otra realización, la región constante de la cadena ligera del anticuerpo parental (completo) bivalente monoespecífico es
20 el Id. de Sec. N°:29.

La región constante de un anticuerpo está directamente involucrada en la CCDA (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento
25 (CDC) es iniciada mediante la unión del factor del complemento Clq a la región constante de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. La unión de Clq a un anticuerpo se origina mediante interacciones proteína-

proteína definidas en el llamado sitio de unión. Tales sitios de unión de la región constante son conocidos en la materia y se describen por ejemplo en Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; y en la PE 0 307 434. Tales sitios de unión de 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).

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA)" se refiere a la lisis de las células diana humanas por un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras. La CCDA se analiza preferiblemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan CCR5 con un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras, como las CMSP recién aisladas o células efectoras purificadas de la capa leocoplaquetar, como los monocitos o las células "natural killer" (NK), o una línea celular de NK en crecimiento permanente.

El término "citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)" indica un proceso iniciado mediante la unión del factor del complemento Clq a la parte Fc de la mayoría de

subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo es originada por interacciones proteína-proteína definidas en el llamado sitio de unión. Tales sitios de unión de la parte Fc son conocidos en la materia (véase
5 anteriormente). Tales sitios de unión de 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 subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran una
10 activación del complemento, lo que incluye la unión a C1q y C3, mientras que los IgG4 no activan el sistema de complemento y no se unen a C1q y/o C3.

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales pueden aumentarse mediante las
15 modificaciones de su componente oligosacárido, como se describen en Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180, y en la US 6.602.684. Los anticuerpos tipo IgG1, los anticuerpos que se utilizan como terapéuticos más frecuentemente, son glucoproteínas con un sitio de
20 glucosilación conservado N-ligado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a Asn297 están ocultos entre los dominios CH2, en contacto extensivo con el armazón polipeptídico, y su presencia es esencial para que el anticuerpo pueda mediar las funciones
25 efectoras como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) (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 WO 99/54342 muestran que la
sobreexpresión en células ováricas de hámster chino (CHO)
de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnT
5 III"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de
oligosacáridos bisectados, aumenta significativamente la
actividad de CCDA de los anticuerpos *in vitro*. Las
alteraciones en la composición del carbohidrato en Asn297 o
su eliminación afectan también a la unión a Fc γ R y Clq
10 (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;
15 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 métodos para aumentar las funciones efectoras
mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se
20 describen por ejemplo en la WO 2005/044859, WO 2004/065540,
WO 2007/031875, Umana, P., et al., Nature Biotechnol.
17:176-180 (1999), WO 99/ 154342, 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
25 2005/ 0054048, US 2005/ 0152894, WO 2003/ 035835 y WO 2000/
061739 o por ejemplo en Niwa, R., et al., J. Immunol.
Methods 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T., et al, J Biol
Chem, 278 (2003) 3466-3473; WO 03/ 055993 y US 2005/

0249722.

Por lo tanto, en una realización de la invención, el anticuerpo biespecífico está glucosilado (si comprende una parte Fc de subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, 5 preferiblemente de subclase IgG1 o IgG3) con una cadena de azúcar en Asn297, siendo la cantidad de fucosa en dicha cadena de azúcar del 65% o inferior (numeración de acuerdo con Kabat). En otra realización, la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena de azúcar está entre el 5% y el 65%, 10 preferiblemente entre el 20% y el 40%. "Asn297" de acuerdo con la invención significa el aminoácido asparagina localizado alrededor de la posición 297 en la región Fc. En base a variaciones menores de la secuencia de los anticuerpos, Asn297 también puede estar localizada algunos 15 aminoácidos más arriba o más abajo (normalmente no más de ± 3 aminoácidos) de la posición 297, es decir entre la posición 294 y 300. En una realización, en el anticuerpo glucosilado de acuerdo con la invención, la subclase IgG es de subclase IgG1 humana, de subclase IgG1 humana con las 20 mutaciones L234A y L235A o de subclase IgG3. En otra realización, la cantidad de ácido N-glucolilneuramínico (ANGN) es del 1% o inferior y/o la cantidad de alfa-1,3-galactosa N-terminal es del 1 % o inferior en dicha cadena de azúcar. Las cadenas de azúcar muestran preferiblemente 25 las características de los glucanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado de forma recombinante en una célula CHO.

El término "las cadenas de azúcar muestran

preferiblemente las características de los glucanos N-
ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado de forma
recombinante en una célula CHO" indica que la cadena de
azúcar en Asn297 de la región constante del anticuerpo
5 biespecífico de acuerdo con la invención posee la misma
estructura y secuencia de residuos de azúcar, excepto por
el residuo de fucosa, que la del mismo anticuerpo expresado
en células CHO no modificadas, por ejemplo las descritas en
la WO 2006/ 103100.

10 El término "ANGN" como se utiliza a lo largo de esta
solicitud indica el residuo de azúcar ácido N-
glucolilneuramínico.

La glucosilación de las IgG1 o IgG3 humanas ocurre en
Asn297 como una glucosilación de oligosacárido complejo
15 biantenarico de núcleo fucosilado terminada con hasta dos
residuos de Gal. Las regiones constantes de las cadenas
pesadas humana de subclase IgG1 o IgG3 se describen en
detalle en Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of
Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service,
20 National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y en
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 denominan residuos de glucano G0, G1
(α -1,6- o α -1,3-) o G2, dependiendo de la cantidad de
25 residuos de Gal terminales (Raju, T.S., Bioprocess Int. 1
(2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de las partes
Fc del anticuerpo se describe por ejemplo en Routier, F.H.,
Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207. Los anticuerpos que se

expresan de forma recombinante en células huésped CHO no glucomodificada normalmente están fucosilados en Asn297 en una cantidad de al menos el 85%. Los oligosacáridos modificados de la región constante del anticuerpo
5 biespecífico de acuerdo con la invención pueden ser híbridos o complejos. Preferiblemente, los oligosacáridos reducidos/ no fucosilados, bisectados, son híbridos. En otra realización los oligosacáridos reducidos/ no fucosilados, bisectados, son complejos.

10 De acuerdo con la invención, "cantidad de fucosa" significa la cantidad de dicho azúcar en la cadena de azúcar en Asn297, en relación con el sumatorio de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo estructuras de alta manosa híbridas y complejas) medido mediante
15 espectrometría de masas MALDI-TOF y calculado como un valor promedio. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa en relación a todas las glucoestructuras identificadas en una muestra tratada con N-Glucosidasa F (por ejemplo, estructuras de oligo y alta
20 manosa, respectivamente, híbridas y complejas) mediante MALDI-TOF.

En todos los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención, "GM" significa glucomodificado.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo
25 biespecífico de acuerdo con la invención es un anticuerpo con CCDA y/o CDC, y con una región constante de subclase IgG1 o IgG3 (preferiblemente IgG1) de origen humano, que se une al receptor Fcγ y/o al factor del complemento Clq. Tal

anticuerpo que se une al receptor Fc y/o al factor del complemento Clq permite la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

- 5 El anticuerpo de acuerdo con la invención se produce mediante métodos recombinantes. Por lo 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
- 10 un anticuerpo de acuerdo con la invención. Los métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos en la materia y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el subsiguiente aislamiento del anticuerpo y normalmente la purificación hasta una
- 15 pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos anteriormente mencionados en una célula huésped, se insertan los ácidos nucleicos que codifican las correspondientes cadenas ligera y pesada modificadas en vectores de expresión mediante métodos estándar. La
- 20 expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas apropiadas como las células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células E. coli, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o de las células tras la
- 25 lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos en la materia 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) 151-160;
Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos biespecíficos se separan adecuadamente
5 del medio de cultivo mediante procedimientos de
purificación de inmunoglobulinas convencionales como por
ejemplo, la proteína A-Sepharose, cromatografía en
hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o
cromatografía de afinidad. El DNA y RNA que codifican los
10 anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente
utilizando procedimientos convencionales. Las células de
hibridoma pueden servir como fuente de tales DNA y RNA. Una
ve aislado, el DNA puede insertarse en vectores de
expresión, que entonces se transfectan en células huésped
15 como las células HEK 293, células CHO, o células de mieloma
que de otro modo no producen las proteínas de las
inmunoglobulinas, para conseguir la síntesis de anticuerpos
monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos (o
20 mutantes) del anticuerpo biespecífico se preparan
introduciendo los cambios de nucleótidos apropiados en el
DNA del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos.
Tales modificaciones pueden realizarse, sin embargo, sólo
en un rango muy limitado, por ejemplo como se ha descrito
25 anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no deben
alterar las características del anticuerpo anteriormente
mencionadas, como el isotipo IgG y la unión al antígeno,
pero pueden mejorar el rendimiento de la producción

recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

Los anticuerpos biespecíficos que se unen a EGFR e IGF-1R de acuerdo con la invención regulan negativamente el
5 EGFR. En una realización, la regulación negativa de EGFR es al menos de alrededor del 30%, en otra realización al menos de alrededor del 35%, y en otra realización al menos de alrededor del 40% en células A549.

Los anticuerpos biespecíficos que se unen a EGFR e
10 IGF-1R de acuerdo con la invención regulan negativamente el IGF-1R. En una realización, la regulación negativa de IGF-1R mediante los Mab mixto (VH/VL) o Mab mixto (CH/CL) biespecíficos es mayormente de alrededor del 15%, en otra realización es mayormente de alrededor del 20%, y en otra
15 realización es al menos de alrededor del 40% en células H322M (a 75 µg de proteína/ mL).

El término "célula huésped" como se utiliza en la presente solicitud indica cualquier tipo de sistema celular que pueda modificarse para generar los anticuerpos de
20 acuerdo con la presente invención. En una realización, las células HEK293 y células CHO se utilizan como células huésped. Como se utiliza aquí, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan de forma intercambiable y todas estas designaciones incluyen la
25 progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de éstos sin importar el número de pases. También se entenderá que toda la progenie puede no

ser precisamente idéntica en su contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que posee la misma función o actividad biológica para la que se ha seleccionado la célula transformada originalmente.

La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, 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 en, por ejemplo, Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 E9 (2002). El clonaje de dominios variables se describe en 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 preferible (HEK 293) se describe en Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83 y en Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

Las secuencias control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operador, y un sitio de unión al ribosoma. Es conocido que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico está "ligado de forma operativa" cuando se sitúa en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una pre-secuencia o

líder de secreción está ligado de forma operativa al DNA de un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado de forma operativa a una secuencia
5 codificante si esta afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está ligado de forma operativa a una secuencia codificante si éste está posicionado de forma que facilita su traducción. Generalmente, "ligado de forma operativa" significa que las
10 secuencias de DNA que están ligadas están contiguas, y en el caso de un líder de secreción, contiguo y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen porque estar contiguos. La unión se consigue mediante la ligación de dianas de restricción adecuadas. Si no existen estas
15 dianas, se utilizan adaptadores o enlazantes oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención con una cantidad reducida de fucosa puede expresarse en una célula
20 huésped glucomodificada diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII y un polipéptido con actividad ManII en una cantidad suficiente para fucosilar de acuerdo con la invención los oligosacáridos de la región Fc. En una realización, el
25 polipéptido con actividad GnTIII es un polipéptido de fusión. Alternativamente, la actividad α 1,6-fucosiltransferasa de la célula huésped puede reducirse o eliminarse de acuerdo con la US 6.946.292 para generar

células huésped glucomodificadas. La cantidad de fucosilación del anticuerpo puede determinarse por ejemplo mediante las condiciones de fermentación o mediante una combinación de al menos dos anticuerpos con diferente
5 grado de fucosilación.

El anticuerpo de acuerdo con la invención con una cantidad reducida de fucosa puede obtenerse en una célula huésped mediante un método que comprende: (a) el cultivo de una célula huésped diseñada para expresar al menos un
10 polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión con actividad GnTIII y/o actividad ManII bajo condiciones que permiten la producción de dicho anticuerpo y que permiten la fucosilación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicho anticuerpo en una cantidad de acuerdo
15 con la invención; y (b) el aislamiento de dicho anticuerpo. En una realización, el polipéptido con actividad GnTIII es un polipéptido de fusión, que preferiblemente comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido heterólogo residente en el
20 Golgi seleccionado de entre el grupo que consiste en el dominio de localización de la manosidasa II, el dominio de localización de la $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI"), el dominio de localización de la mannosidasa I, el dominio de localización de la $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII"), y el dominio de localización
25 de la α -1,6 fucosiltransferasa del núcleo. Preferiblemente, el dominio de localización en el Golgi es el de la mannosidasa II o GnTI.

Como se utiliza aquí, un "polipéptido con actividad GnTIII" se refiere a los polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligado en β -1,4 al manósido β -ligado del núcleo trimanosilo de los oligosacáridos N-ligados. Esto incluye los polipéptidos de fusión que muestran una actividad enzimática similar, pero no necesariamente idéntica a la actividad de la β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosil-glucoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminil-transferasa (EC 2,4,1,144), de acuerdo con el comité de nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), según se mide en un ensayo biológico concreto, con o sin dependencia de la dosis. En el caso de que exista dependencia de la dosis, no debe ser necesariamente idéntica a la de la GnTIII, pero si sustancialmente similar a la dependencia de dosis en una actividad dada comparado con la GnTIII (es decir, el polipéptido candidato debe mostrar una actividad superior o no inferior a alrededor de 25 veces inferior y, preferiblemente, no inferior a alrededor de 10 veces menos actividad, y más preferiblemente, no inferior a alrededor de 3 veces menos actividad en relación a la de GnTIII). Como se utiliza aquí, el término "dominio de localización en el Golgi" se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido residente en el Golgi que es responsable del anclaje del polipéptido en su localización dentro del complejo de Golgi. Generalmente, los dominios de localización comprenden las "colas" aminoterminales de un

enzima.

Para la producción de anticuerpos de acuerdo con la invención con una cantidad reducida de fucosa, de forma similar puede utilizarse una célula huésped que es capaz y
5 está diseñada para permitir la producción de un anticuerpo con glucoformas modificadas. Dicha célula huésped se ha manipulado además para que exprese niveles aumentados de uno o más polipéptidos que poseen actividad GnTIII. Las células CHO son preferibles como tales células huésped. De
10 forma similar, las células que producen composiciones de anticuerpo con tienen CCDA aumentada como se describe en US 6,946,292.

La purificación de anticuerpos se realiza para poder eliminar componentes celulares u otros contaminantes, por
15 ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, lo que incluye tratamiento alcalino/SDS, bandas CsCl, cromatográfica en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otras bien conocidas en la técnica. Véase Ausubel, F., et al., ed. Current
20 Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wilee interscience, New York (1987). Los diferentes métodos están bien establecidos y ampliamente utilizados para la purificación de proteínas, como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo
25 cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio de iones (por ejemplo intercambio de cationes (resinas carboximetilo), intercambio de aniones (resinas aminoetilo) e intercambio

de modo mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-
mercaptoetanol y otros ligandos SH), interacción
hidrofóbica o cromatografía de absorción aromática (por
ejemplo con fenil-sepharose, resinas aza-arenofílica, o
5 ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con
quelantes de metales (por ejemplo con material de afinidad
para Ni(II)- y Cu(II)-), cromatografía de exclusión por
tamaño, y métodos electroforéticos (como la electroforesis
en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M., A.,
10 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. Otro aspecto de la invención es la utilización
de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la
15 fabricación de una composición farmacéutica. Otro aspecto
de la invención es un método para la fabricación de una
composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de
acuerdo con la invención. En otro aspecto, la presente
invención proporciona una composición, por ejemplo una
20 composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo de
acuerdo con la presente invención, formulada junto con un
transportador farmacéutico.

Se ha encontrado de forma sorprendente que los
anticuerpos biespecíficos frente a EGFR y frente a IGF-1R
25 de acuerdo con la invención poseen propiedades anti-
proliferativas mejoradas frente a células cancerígenas
cuando se comparan con los anticuerpos anti-EGFR y
anticuerpos anti-IGF-1R monoespecíficos parentales o cuando

se comparan con los anticuerpos biespecíficos frente a EGFR y frente a IGF-1R conocidos en Lu, D., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 318 (2004) 507-513; J. Biol. Chem., 279 (2004) 2856-2865; y J. Biol Chem. 280
5 (2005) 19665-72 (como estos anticuerpos biespecíficos sólo muestran una eficacia reducida en las células tumorales que expresan EGFR/IGF-1R en comparación con la combinación de los anticuerpos correspondientes parentales).

Otro aspecto de la invención es dicha composición
10 farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es la utilización de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es un método de
15 tratamiento a pacientes que padecen cáncer mediante la administración de un anticuerpo de acuerdo con la invención a un paciente en necesidad de dicho tratamiento.

Tal como se usa aquí, "transportador farmacéutico" incluye cualquier solvente, medio de dispersión,
20 recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el transportador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea,
25 parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo por inyección o infusión).

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una serie de métodos conocidos en la

técnica. Como podrá apreciarse por el experto en la materia, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante ciertas rutas de administración, será necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un transportador apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones tamponadas salinas y acuosas. Los transportadores farmacéuticos incluyen soluciones estériles acuosas o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida en la técnica.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se utiliza aquí, indica los modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

El término cáncer como se utiliza aquí se refiere a enfermedades proliferativas, como los linfomas, leucemias

- linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células grandes (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioloalveolares, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, melanoma cutáneo
- 5 o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, carcinoma de las trompas de falopio, carcinoma endometrial, carcinoma cervical, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva,
- 10 Enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de tiroides, cáncer paratiroidal, cáncer de glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de penes, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de
- 15 riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas,
- 20 ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewing, lo que incluye versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.
- 25 Estas composiciones pueden también contener adyuvantes como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse mediante

procedimientos de esterilización, supra, y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Será también deseable incluir agentes
5 isotónicos, como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede hacerse con la inclusión de agentes que retrasan la absorción como el monoestearato de aluminio y gelatina.

10 Independientemente de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente
15 aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los niveles de dosificación actuales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una
20 cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, la composición, y el modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de la variedad de factores
25 farmacocinéticos lo que incluye la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, la ruta de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto

particular a ser empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial
5 médico previo del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en el campo de la medicina.

La composición debe ser estéril y fluida hasta el punto en que la composición pueda liberarse mediante una jeringa. Además de agua, el transportador preferible es una
10 solución salina tamponada isotónica.

Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de recubridores como la lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos
15 casos, es preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como el manitol o el sorbitol, y cloruro sódico.

Tal como se usa aquí, las expresiones "célula," "línea celular," y "cultivo celular" se utilizan de forma
20 intercambiable y todas estas designaciones incluyen su progenie. Así, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de ella sin tener en cuenta el número de transferencias. Se entiende también que toda la progenie no
25 tiene por qué ser idéntica en su contenido de DNA, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie variable que posee la misma función o actividad biológica que la que se busca en la célula originalmente transformada

queda incluida. Cuando se pretenden designaciones distintas, quedará claro por el contexto.

El término "transformación" como se utiliza aquí se refiere al proceso de transferir vectores/ácidos nucleicos en una célula huésped. Si se utilizan células sin barreras de pared celular formidables como células huésped, la transfección se llevará a cabo por ejemplo mediante el método de precipitación con fosfato como se describe en Graham, F.L., y Van der Eb, A.J., Virology 52 (1973) 456-467. No obstante, también se pueden usar otros métodos para introducir DNA en las células como la inyección nuclear o fusión de protoplastos. Si se utilizan células procariotas o células que contiene construcciones de pared celular sustanciales, se usará por ejemplo un método de transfección con tratamiento por calcio utilizando cloruro cálcico como se describe en Cohen, S.N., et al, PNAS. 69 (1972) 2110-2114.

Tal como se usa aquí, "expresión" se refiere al proceso mediante el que un ácido nucleico se transcribe en mRNA y/o al proceso mediante el que un mRNA transcrito (también referido como transcrito) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan en general como producto génico. Si el polinucleótido deriva de DNA genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el corte y empalme de mRNA (splicing de mRNA).

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular auto-replicativa, que transfiere una molécula de

ácido nucleico insertada en una y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de DNA o RNA en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), replicación de vectores que
5 funcionan principalmente para la replicación de DNA o RNA, y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción de DNA o RNA. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

Un "vector de expresión" es un polinucleótido que,
10 cuando se introduce en una célula huésped adecuada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión " se refiere normalmente a una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para proporcionar un producto de expresión
15 deseado.

Descripción de las secuencias aminoacídicas

Id. de Sec. N°:1, CDR3 de la cadena pesada,
<EGFR>ICR62 humanizado

Id. de Sec. N°:2, CDR2 de la cadena pesada,
20 <EGFR>ICR62 humanizado

Id. de Sec. N°:3, CDR1 de la cadena pesada,
<EGFR>ICR62 humanizado

Id. de Sec. N°:4, CDR3 de la cadena ligera,
<EGFR>ICR62 humanizado

25 Id. de Sec. N°:5, CDR2 de la cadena ligera,
<EGFR>ICR62 humanizado

Id. de Sec. N°:6, CDR1 de la cadena ligera,
<EGFR>ICR62 humanizado

Id. de Sec. N°:7, dominio variable de la cadena pesada, <EGFR>ICR62-I-HHB humanizado

Id. de Sec. N°:8, dominio variable de la cadena pesada, <EGFR>ICR62-I-HHD humanizado

5 Id. de Sec. N°:9, dominio variable de la cadena ligera, <EGFR>ICR62 -I-KA humanizado

Id. de Sec. N°:10, dominio variable de la cadena ligera, <EGFR>ICR62 -I-KC humanizado

Id. de Sec. N°:11, CDR3 de la cadena pesada, HUMAB
10 Clon 18 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:12, CDR2 de la cadena pesada, HUMAB
Clon 18 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:13, CDR1 de la cadena pesada, HUMAB
Clon 18 <IGF-1R>

15 Id. de Sec. N°:14, CDR3 de la cadena ligera, HUMAB
Clon 18 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:15, CDR2 de la cadena ligera, HUMAB
Clon 18 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:16, CDR1 de la cadena ligera, HUMAB
20 Clon 18 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:17, CDR3 de la cadena pesada, HUMAB
Clon 22 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:18, CDR2 de la cadena pesada, HUMAB
Clon 22 <IGF-1R>

25 Id. de Sec. N°:19, CDR1 de la cadena pesada, HUMAB
Clon 22 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:20, CDR3 de la cadena ligera, HUMAB
Clon 22 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:21, CDR2 de la cadena ligera, HUMAB
Clon 22 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:22, CDR1 de la cadena ligera, HUMAB
Clon 22 <IGF-1R>

5 Id. de Sec. N°:23, dominio variable de la cadena
pesada, HUMAB Clon 18 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:24, dominio variable de la cadena
pesada, HUMAB Clon 22 <IGF-1R>

10 Id. de Sec. N°:25, dominio variable de la cadena
ligera, HUMAB Clon 18 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:26, dominio variable de la cadena
ligera, HUMAB Clon 22 <IGF-1R>

Id. de Sec. N°:27, región constante de la cadena
pesada humana derivada de IgG1

15 Id. de Sec. N°:28, región constante de la cadena
pesada humana derivada de IgG4

Id. de Sec. N°:29 región constante de la cadena
ligera kappa

20 Id. de Sec. N°:30 Cadena pesada 1 de la molécula de
anticuerpo con intercambio de dominios bivalente
bienespecífica, <EGFR-IGF1R>: Mab mixto (VH/VL)

Id. de Sec. N°:31 Cadena pesada 2 de la molécula de
anticuerpo con intercambio de dominios bivalente
bienespecífica, <EGFR-IGF1R>: Mab mixto (VH/VL)

25 Id. de Sec. N°:32 Cadena ligera 1 de la molécula de
anticuerpo con intercambio de dominios bivalente
bienespecífica, <EGFR-IGF1R>: Mab mixto (VH/VL)

Id. de Sec. N°:33 Cadena ligera 2 de la molécula de

anticuerpo con intercambio de dominios bivalente
bienespecífica, <EGFR-IGF1R>: Mab mixto (VH/VL)

Id. de Sec. N°:34 Cadena pesada 1 de la molécula de
anticuerpo con intercambio de dominios bivalente
5 bienespecífica, <EGFR-IGF1R>: Mab mixto (CH/CL)

Id. de Sec. N°:35 Cadena pesada 2 de la molécula de
anticuerpo con intercambio de dominios bivalente
bienespecífica, <EGFR-IGF1R>: Mab mixto (CH/CL)

Id. de Sec. N°:36 Cadena ligera 1 de la molécula de
10 anticuerpo con intercambio de dominios bivalente
bienespecífica, <EGFR-IGF1R>: Mab mixto (CH/CL)

Id. de Sec. N°:37 Cadena ligera 2 de la molécula de
anticuerpo con intercambio de dominios bivalente
bienespecífica, <EGFR-IGF1R>: Mab mixto (CH/CL)

15 Id. de Sec. N°:38 Cadena pesada 1 de la molécula de
anticuerpo con fusión de scFab-Fc, bivalente, bienespecífico
<EGFR-IGF1R>: scFab-Fc

Id. de Sec. N°:39 Cadena pesada 2 de la molécula de
anticuerpo con fusión de scFab-Fc, bivalente, bienespecífico
20 <EGFR-IGF1R>: scFab-Fc

Id. de Sec. N°:40 Cadena pesada 1 de molécula de
anticuerpo de fusión scFab-Fc bivalente, bienespecífica
<EGFR-IGF1R>: N-scFabSS-Salt-bridge-s3

Id. de Sec. N°:41 Cadena pesada 2 de molécula de
25 anticuerpo de fusión scFab-Fc bivalente, bienespecífica
<EGFR-IGF1R>: N-scFabSS-Salt-bridge-s3

Id. de Sec. N°:42 Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-Fc bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: N-scFabSS-Salt-bridge-w3C

5 Id. de Sec. N°:43 Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-Fc bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: N-scFabSS-Salt-bridge-w3C

Id. de Sec. N°:44 Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-1

10 Id. de Sec. N°:45 Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-1

Id. de Sec. N°:46 Cadena ligera de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-1

Id. de Sec. N°:47 Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-2

20 Id. de Sec. N°:48 Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-2

Id. de Sec. N°:49 Cadena ligera de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-2

25

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan como apoyo para un mejor entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero

127

alcance se fija en las reivindicaciones anexas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos indicados sin alejarse del espíritu de la invención.

Descripción de las Figuras

5 **Figura 1** Estructura esquemática de una realización tetraivalente de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que se une a EGFR e IGF-1R, en el que uno de los Antígenos A o B es EGFR, mientras que el otro es IGF-1R. La estructura está basada en un anticuerpo de longitud
10 completa que se une al Antígeno A, al que están unidas dos (opcionalmente estabilizadas con disulfuros) cadenas sencillas de Fv que se unen al Antígeno B, mediante el enlazante de péptido.

Figura 2 Estructura esquemática de cuatro
15 posibles realizaciones tetraivalentes A a D de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que se une a EGFR e IGF-1R, en el que uno de los Antígenos A o B es EGFR, mientras que el otro es IGF-1R. Las estructuras están basadas en un anticuerpo de longitud completa que se une al
20 Antígeno A, al que están unidas dos (opcionalmente estabilizadas con disulfuros) cadenas sencillas de Fv que se unen al Antígeno B, mediante el enlazante de péptido en el

 A: C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de
25 longitud completa

 B: N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa

 C: C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo de

longitud completa

D: C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa

Figura 3 **3a:** SDS-PAGE de anticuerpo biespecífico
5 purificado XGFR1-2421

3b: Análisis por Cromatografía HP de exclusión por tamaño (SEC) de anticuerpo biespecífico purificado XGFR1-2421 (3mg/ml)

3c: Análisis por Cromatografía HP de exclusión por
10 tamaño (SEC) de anticuerpo biespecífico purificado XGFR1-2421 (1mg/ml)

Figura 4 **4a:** Purificación por Cromatografía HP de exclusión por tamaño (SEC) de anticuerpo biespecífico XGFR1-2320 (sin estabilización por disulfuros) (agrega el
15 8,7 %)

4b: Cromatografía HP de exclusión por tamaño (SEC) purificación de anticuerpo biespecífico XGFR1-2321 (estabilizado por disulfuros) (agrega el 0 %)

Figura 5 Unión simultánea de un anticuerpo
20 biespecífico anti-EGFR/anti-IGF-1R (XGFR1-2320) a EGFR e IGF1R en un Ensayo Biacore con XGFR1-2320 inmovilizado

Figura 6 Regulación negativa de IGFR (**6a**) y EGFR (**6b**) en una línea celular tumoral A549 NSCLC mediante anticuerpo biespecífico

Figura 7 Inhibición de la fosforilación de IGF-1R (**7a**) y de la fosforilación de EGFR (**7b**) en una línea celular tumoral H322M NSCLC mediante moléculas de anticuerpo biespecífico anti-EGFR/anti-IGF-1R (XGFR)

7a: ELISA Fosfo-IGF-1R tras la inhibición con varias moléculas de anticuerpo biespecífico XGFR y sus anticuerpos parentales en células tumorales H322M NSCLC, las concentraciones de anticuerpo se refieren a la incubación, en el caso de la estimulación con IGF1/EGF, las concentraciones de anticuerpo se diluyen a la mitad de la concentración original

7b: ELISA Fosfo-EGF-R tras la inhibición con varias moléculas de anticuerpo biespecífico XGFR y sus anticuerpos parentales en células tumorales H322M NSCLC, las concentraciones de anticuerpo se refieren a la incubación, en el caso de la estimulación con IGF1/EGF, las concentraciones de anticuerpo se diluyen a la mitad de la concentración original

Figura 8 Inhibición del crecimiento anti-tumoral de células tumorales H322M NSCLC que expresan EGFR e IGF-1R mediante moléculas de anticuerpo biespecífico anti-EGFR/anti-IGF-1R (XGFR) y sus anticuerpos parentales

Figura 9 Actividad CCDA in-vitro de moléculas de anticuerpo biespecífico anti-EGFR/anti-IGF-1R (XGFR)

Figura 10 Estructura esquemática de un anticuerpo de longitud completa sin dominio CH4 que se une específicamente a un EGFR o IGF1-R con dos pares de cadena pesada y ligera que comprende dominios variables y constantes en un orden típico.

Figura 11 Estructura esquemática de las cuatro posibles fragmentos Fab de cadena sencilla que se une específicamente por ejemplo a EGFR o IGF1-R

Figura 12 Estructura esquemática de un anticuerpo biespecífico tetravalente, de acuerdo con la invención que comprende un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a uno de los dos Antígenos EGFR o IGF1-R y dos cadenas ligeras Fab que se unen específicamente al otro de los dos antígenos EGFR o IGF1-R (moléculas scFab-XGFR)

Figura 13 Anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención que comprende un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a IGF-1R y dos cadenas ligeras Fab idénticas que se unen específicamente a moléculas EGFR -**ScFab-XGFR1** A, B, C, y D y niveles de expresión tras la purificación

A: scFab (VH-CH1-enlazante-VL-CL) fusionado al C-Terminal de la cadena pesada

15 B: scFab (VH-CH1-enlazante-VL-CL con puente disulfuro adicional VH44-VL100 fusionado) al C-Terminal de la cadena pesada

C: scFab (VH-CH1-enlazante-VL-CL) fusionado al C-Terminal de la cadena ligera

20 D: scFab (VH-CH1-enlazante-VL-CL con puente disulfuro adicional VH44-VL100 fusionado) al C-Terminal de la cadena ligera

Figura 14 Anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención que comprende un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a EGFR y dos cadenas ligeras Fab idénticas que se unen específicamente a moléculas IGF-1R - **ScFab-XGFR2** A, B, C, y D

A: scFab (VH-CH1-enlazante-VL-CL) fusionado al C-

Terminal de la cadena pesada

B: scFab (VH-CH1-enlazante-VL-CL con puente disulfuro adicional VH44-VL100 fusionado) al C-Terminal de la cadena pesada

5 C: scFab (VH-CH1-enlazante-VL-CL) fusionado al C-Terminal de la cadena ligera

D: scFab (VH-CH1-enlazante-VL-CL con puente disulfuro adicional VH44-VL100 fusionado) al C-Terminal de la cadena ligera

10 **Figura 15** Análisis SDS-PAGE de cadena ligera Fab que contienen derivados de anticuerpo biespecífico scFab-XGFR1

1: scFab-XGFR1_4720 (No reducido)

2: scFab-XGFR1_4721 (No reducido)

3: scFab-XGFR1_4720 (reducido)

15 4: scFab-XGFR1_4721 (reducido)

Figura 16 Análisis HP-SEC de scFab que contienen derivados de anticuerpo biespecífico scFab-XGFR1

Fig. 16a: scFab-XGFR1-4720; 7,7 %, Agregados (marcado dentro de una caja)

20 Fig. 16b: scFab-XGFR1-4721; 3,5 %, Agregados (marcado dentro de una caja)

Figura 17 Unión de scFab-XGFR1 y scFab-XGFR2 a EGFR e IGF1R

Fig 17a: Diagrama de unión a Biacore de scFab-XGFR1_2720 a EGFR, KD = 2 nM

Fig 17b: Diagrama de unión a Biacore de scFab-XGFR1_2720 a IGF-1R, KD = 2 nM

Fig 17c: Diagrama de unión a Biacore de scFab-

XGFR2_2720 a EGFR, KD = 0,5 nM

Fig 17d: Diagrama de unión a Biacore de scFab-XGFR2_2720 a IGF-1R, KD = 11 nM

Figura 18 Esquema de unión de scFab-XGFR a células
5 analizadas mediante ensayos de competición FACS siguiendo el procedimiento general:

-añadir en paralelo <IGF1R> Mab marcado con Alexa647
(1 µg/mL) + scFab-XGFR sin marcar (100 µg/mL - 0,001 µg/mL
)

10 - -45 min de incubación en hielo, lavar y eliminar los anticuerpos no unidos

- -fijar con HCHO1%, después FACS

Figura 19 Unión de scFab-XGFR_2721 y Clon 18 parental
<IGF1R> a células analizadas mediante ensayos de
15 competición FACS

Fig 19a: Comparación de valores de CI50 de <IGF-1R> Clon 18 (0,18 µg/ml) y scFab-XGFR_2721 (0,15 µg/ml)

Fig 19b: Curva de unión de <IGF-1R> Clon 18 (punto de giro 0,11 µg/ml) - eje y = RLU ; eje x concentración de
20 anticuerpo (µg/ml)

Fig 19c: Curva de unión de scFab-XGFR_2721 (punto de giro 0,10 µg/ml) - eje y = RLU ; eje x concentración de anticuerpo (µg/ml)

Figura 20 Regulación negativa de IGF1-R en Células
25 H322M tras 24 h de incubación con diferentes moléculas de anticuerpo biespecífico anti-EGFR/anti-IGF-1R (scFab-XGFR; 100nM)

Figura 21 Regulación negativa de EGFR en Células H322M

tras 24 h de incubación con diferentes moléculas de anticuerpo biespecífico anti-EGFR/anti-IGF-1R (scFab-XGFR; 100nM)

Figura 22 Inhibición de la proliferación de células H322M- con diferentes moléculas de anticuerpo biespecífico anti-EGFR/anti-IGF-1R (scFab-XGFR; 100nM)

Procedimiento Experimental

Ejemplos

Diseño de anticuerpos biespecíficos <EGFR - IGF-1R>

10 Los anticuerpos biespecíficos que se unen a EGFR e IGF-1R de acuerdo con la invención comprenden un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R. Como primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR pueden usarse
15 los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 7 o Id. de Sec. N°: 8, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 9 o Id. de Sec. N°: 10, que derivan ambos de los anticuerpos de rata anti-EGFR humanizados ICR62 que se describen en detalle en WO
20 2006/082515.

Como Segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R pueden usarse los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 23 o Id. de Sec. N°: 24, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec.
25 N°: 25 o Id. de Sec. N°: 26, que derivan ambos de los anticuerpos humanos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) o <IGF-1R> HUMAB Clon 22 (DSM ACC 2594) que se describen en detalle en WO 2005/005635.

En los siguientes Ejemplos 1 a 20 los anticuerpos biespecíficos <EGFR - IGF-1R> se basan en los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 8, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 10 (derivados de <EGFR>ICR62 humanizados) como primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR, y en los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 23, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 25 (derivados de los anticuerpos humanos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587)) como segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R.

A) Diseño de anticuerpos biespecíficos <EGFR - IGF-1R> con unión de scFv (la nomenclatura XGFR1 y XGFR2 se refiere a las moléculas scFv -XGFR)

Para generar agentes que combinan características de ambos anticuerpos, se construyeron varias proteínas nuevas derivadas de anticuerpos biespecíficos tetravalentes. En estas moléculas, se conectan moléculas recombinantes de unión a cadenas sencillas de un anticuerpo a través de tecnologías de fusión de proteínas recombinantes al otro anticuerpo que se retiene en el formato de un IgG1 de longitud completa. Este segundo anticuerpo lleva la segunda especificidad de unión deseada.

Se muestra un resumen de los formatos diseñados en base a los anticuerpos humanos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) y la cadena sencilla Fv (scFv) que se une a derivados de EGFR del dominio variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N°: 8, y del dominio

variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N°: 10 en la Figura 1 y se listan en las Tablas 1 y 2.

Mediante la síntesis génica y las técnicas de biología molecular recombinante, el dominio variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N°: 8, y el dominio variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N°: 10 se unen mediante un enlazante de cadena sencilla glicina serina (G₄S)_n para proporcionar una cadena sencilla Fv (scFv) que se une a EGFR, que está unido a posiciones variables a los extremos N- o C- terminal de la cadena ligera o pesada del anticuerpo anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587). Además, los residuos de cisteína se introducen en varias posiciones en el dominio VH (lo que incluye la posición Kabat 44,) y VL (lo que incluye la posición Kabat 100,) del scFv que se une a EGFR como se ha descrito antes (por ejemplo WO 94/029350; Reiter, Y., et al., Nature biotechnology 14 (1996) 1239-1245; Young, N., M., et al., FEBS Letters Vol. 377 (1995) 135-139; o Rajagopal, V., et al, Protein Engineering Vol. 10 1453-59 (1997). Posteriormente, se analiza la expresión de proteína, estabilidad y actividad biológica. Además, la longitud del enlazante de péptido que contiene (glicina₄-serina)_n entre el C-terminal de las cadenas ligera o pesada del anticuerpo <IGF1R> y del scFv que se une a EGFR fue variable. También, la longitud del enlazante de cadena sencilla glicina₄-serina (G₄S) que es una parte integral del modulo de cadena sencilla Fv que se une a EGFR fue variable. Todas estas moléculas se produjeron de forma recombinante, se

purificaron y se caracterizaron. Un resumen de todos los diseños de anticuerpos biespecíficos que se aplicaron para generar anticuerpos biespecíficos tetravalentes <EGFR-IGF1R> se proporciona en las Tablas 1 y 2. Para este estudio, se utiliza el término "XGFR" para describir las diferentes entidades de proteína que reconocen de forma simultánea a EGFR así como a IGF1R y comprende un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a uno de EGFR o IGF1R; y dos fragmentos scFv que se unen específicamente al otro EGFR o IGF1R.

Tabla 1 - Los diferentes formatos de anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF1R> con uniones N- y C- terminal de scFv y la correspondiente nomenclatura XGFR1- y XGFR2-.

Los formatos XGFR1 están basados en a) los anticuerpos humanos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) y b) dos cadenas sencillas de Fv (scFv) que se unen a EGFR derivado del dominio variable de la cadena pesada (VH) de Id. de Sec. N°: 8, y del dominio variable de la cadena ligera (VL) de Id. de Sec. N°: 10, que están unidos al mismo extremo terminal (C- o N-terminal) de la cadena pesada (HC) o de la cadena ligera (LC) de anticuerpos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18.

Los formatos XGFR2 están basados en a) las regiones variables VH (Id. de Sec. N°: 8) y VL (Id. de Sec. N°: 10) de anticuerpos humanizados de rata anti-EGFR ICR62 y b) dos cadenas sencillas de Fv (scFv) que se unen a anticuerpos humanos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) VH (Id. de Sec. N°: 23) y VL (Id. de Sec. N°: 25) de

anticuerpos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18.

Un "-" en la tabla indica "no presente"

Nombre de Molécula nomenclatura	Posición de unión de scFv al anticuerpo de longitud completa	Enlazante de cadena sencilla (G4S)n n=	Enlazante de péptido (G4S)n n=	Posiciones Cys- en scFv estabilizado por disulfuros
XGFR-anticuerpo anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18	-	-	-	-
anticuerpo humanizado de rata anti-EGFR ICR62 con VH de Id. de Sec. N°: 8, y VL de Id. de Sec. N°: 10	-	-	-	-
XGFR1-2320	C-terminal HC	3	2	-
XGFR1-3320	N-terminal HC	3	2	-

MB

XGFR1-4320	C-terminal LC	3	2	-
XGFR1-5320	N-terminal LC	3	2	-
XGFR1-2321	C-terminal HC	3	2	VH44/VL100
XGFR1-3321	N-terminal HC	3	2	VH44/VL100
XGFR1-4321	C-terminal LC	3	2	VH44/VL100
XGFR1-5321	N-terminal LC	3	2	VH44/VL100
XGFR2-2420	C-terminal HC	4	2	-
XGFR2-2421	C-terminal HC	4	2	VH44/VL100
XGFR2-3421	N-terminal HC	4	2	VH44/VL100
XGFR2-4421	C-terminal LC	4	2	VH44/VL100
XGFR2-5421	N-terminal LC	4	2	VH44/VL100

Tabla 2 - anticuerpos biespecíficos XGFR1 con enlazante de cadena sencilla variable y longitud de enlazante de péptido. Un "-" en la tabla indica "no presente".

Nombre de Molécula nomenclatura XGFR-	Posición de unión de scFv al anticuerpo de longitud completa	Enlazante de cadena sencilla (G4S)n n=	Enlazante de cadena sencilla (G3S)n n=	Enlazante de péptido (G4S)n n=	Enlazante de péptido (G3S)n n=	Posiciones Cys- en scFv estabiliza do por disulfuros
XGFR1-2421	C-terminal HC	4	-	2	-	VH44/VL1 00
XGFR1-3421	N-terminal HC	4	-	2	-	VH44/VL1 00
XGFR1-4421	C-terminal LC	4	-	2	-	VH44/VL1 00
XGFR1-5421	N-terminal LC	4	-	2	-	VH44/VL1 00
XGFR1-2451	C-terminal HC	4	-	5	-	VH44/VL1 00
XGFR1-4451	C-terminal HC	4	-	5	-	VH44/VL1 00
XGFR1-2421C	C-terminal HC	-	5	-	3	VH44/VL1 00

Ejemplos 1 a 8 se refieren a las moléculas XGFR1 y XGFR2 tetravalentes con unión de scFv

B) Diseño de anticuerpos biespecíficos tetravalentes <EGFR - IGF-1R> con unión de Fab de cadena sencilla (scFab)

5 **(nomenclatura scFab-XGFR1 y scFab-XGFR2)**

El término scFab-XGFR se utiliza para describir las diferentes entidades de proteína que reconocen de forma

119

simultánea EGFR así como IGF1R y comprende un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a uno de EGFR o IGF1R; y dos fragmentos scFab que se unen específicamente al otro EGFR o IGF1R.

5 A continuación como una realización de la invención se ejemplifican anticuerpos biespecíficos tetravalentes que comprenden un anticuerpo de longitud completa que se une a un primer antígeno (IGF-1R o EGFR) con dos fragmentos Fab de cadena sencilla que se unen a un segundo antígeno
10 diferente (el otro de IGF-1R o EGFR) conectado a través de un péptido conector al anticuerpo de longitud completa (cualquiera de ambos fragmentos Fab de cadena sencilla en los dos extremos C-terminal de la cadena pesada o en los dos extremos C-terminal de la cadena ligera). Los dominios
15 de anticuerpo y el enlazante en dicho fragmento Fab de cadena sencilla presentan el siguiente orden en la dirección N-terminal a C-terminal: VL-CL-enlazante-VH-CH1.

 Como dominio variable de la cadena pesada VH para el sitio de unión a antígeno <IGF-1R> se utilizó el Id. de
20 Sec. N°: 23. Como dominio variable de la cadena ligera VL para el sitio de unión a antígeno <IGF-1R> se utilizó el Id. de Sec. N°: 25.

 Como dominio variable de la cadena pesada VH para el sitio de unión a antígeno <EGFR> se utilizó el Id. de Sec.
25 N°: 8. Como dominio variable de la cadena ligera VL para el sitio de unión a antígeno <EGFR> se utilizó el Id. de Sec. N°: 10.

 Mediante síntesis génica y técnicas de biología

molecular recombinante, VL-CL y VH-CH1, que comprende las VH y VL del correspondiente sitio de unión a antígeno se unieron mediante un enlazante glicina serina (G4S)_nGm para proporcionar un fragmento Fab de cadena sencilla VL-CL-
5 enlazante-VH-CH1, que se unió al extremo C- terminal de la cadena ligera o pesada del anticuerpo utilizando el conector peptídico (G4S)_n.

Opcionalmente, los residuos de cisteína se introdujeron en el dominio VH (lo que incluye la posición
10 44 Kabat) y VL (lo que incluye la posición 100 Kabat) del fragmento Fab de cadena sencilla de acuerdo con las técnicas como se ha descrito antes (por ejemplo WO 94/029350; Reiter, Y., et al., Nature biotechnology (1996) 1239-1245; Young, N.M., et al, FEBS Letters (1995)
15 135-139; o Rajagopal, V., et al, Proteine Engineering (1997) 1453-59).

Todas estas moléculas se produjeron de forma recombinante, se purificaron y se caracterizaron y se analizó la expresión de proteína, la estabilidad y la
20 actividad biológica.

Se proporciona un resumen del diseño del anticuerpo que se aplicó para generar anticuerpos biespecífico tetraivalentes scFab <EGFR-IGF-1R>, <IGF-1R-EGFR > en la Tabla 3. Para este estudio, utilizamos el término 'scFab-
25 Ab' para describir las diferentes entidades de proteína tetraivalentes. Una representación de los formatos diseñados se muestra en la Figura 13 y 14 y se listan en la Tabla 3.

Tabla 3 - Los diferentes formatos de anticuerpo

biespecífico anti-IGF1R y anti-EGFR scFab-tetravalentes con uniones de fragmento Fab de cadena sencilla en C- terminal y la correspondiente nomenclatura scFab-Ab.

Nombre de la Molécula (nomenclatura)	Estructura de Anticuerpo de cadena sencilla longitud completa derivado de	Fragmento Fab de cadena sencilla derivada de	Dominios de Variables de VH y VL: Id. Sec. N°:	Posición de Fab de cadena sencilla unido a anti-cuerpo	Enlaza dente	Conector peptídico	scFab VH44/VL100 estabilizado por disulfuro
scFab-XGFR1_2720	<IGF1R>	<EGFR>	8, 10, 23, 25	C-terminal cadena H	(G ₄ S) ₆ G G	(G ₄ S) ₂	NO
scFab-XGFR1_2721	<IGF1R>	<EGFR>	8, 10, 23, 25	C-terminal cadena H	(G ₄ S) ₆ G G	(G ₄ S) ₂	SI
scFab-XGFR1_4720	<IGF1R>	<EGFR>	8, 10, 23, 25	C-terminal cadena L	(G ₄ S) ₆ G G	(G ₄ S) ₂	NO
scFab-XGFR1_4721	<IGF1R>	<EGFR>	8, 10, 23, 25	C-terminal cadena L	(G ₄ S) ₆ G G	(G ₄ S) ₂	SI
scFab-XGFR2_2720	<EGFR>	<IGF1R>	8, 10, 23, 25	C-terminal cadena H	(G ₄ S) ₆ G G	(G ₄ S) ₂	NO

scFab- XGFR2_2721	<EGFR>	<IGF1R>	8, 10, 23, 25	C- terminal cadena H	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	SI
scFab- XGFR2_4720	<EGFR>	<IGF1R>	8, 10, 23, 25	C- terminal cadena L	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	NO
scFab- XGFR2_4721	<EGFR>	<IGF1R>	8, 10, 23, 25	C- terminal cadena L	(G ₄ S) ₆ GG	(G ₄ S) ₂	SI

Ejemplos 9 a 13 se refieren a las moléculas scFab-XGFR1 y scFab-XGFR2 tetravalentes con uniones de Fab de cadena sencilla)

Materiales y métodos generales

5 La información general respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se proporcionan en: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteines of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se numeran y refieren de acuerdo con la numeración EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteines of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 15 (1991).

Técnicas de DNA recombinante

Se utilizan los métodos estándar para manipular DNA como se describe en Sambrook, J., et al., Molecular

cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 **Síntesis génica**

Los segmentos génicos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos fabricados mediante síntesis química. Los segmentos génicos de 600 - 1800 pb de longitud, que están flanqueados por sitios únicos de escisión por
10 restricción mediante endonucleasas, se ensamblaron mediante hibridación y ligación de oligonucleótidos lo que incluye amplificación por PCR y se clonaron posteriormente mediante los sitios de restricción indicados por ejemplo BamHI/BstEII, BamHI/BsiWI, BstEII/NotI o BsiWI/NotI en un
15 pcDNA 3,1/Zeo(+) (Invitrogen) basado en un vector de clonaje pUC. Las secuencias de DNA de los fragmentos génicos subclonados se confirmaron mediante secuenciación de DNA. Los fragmentos por síntesis génica se ordenaron de acuerdo con las especificaciones dadas por Geneart
20 (Regensburg, Alemania).

Determinación de la secuencia de DNA

Las secuencias de DNA se determinaron mediante secuenciación de doble cadena realizada en Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Alemania).

25 **Análisis de las secuencias de DNA y proteína y gestión de datos de secuencia**

Se utilizó el paquete de programas del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versión 10,2 y Vector

124

NT1 Advance suite version 9.1 de invitrogen para la creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

Técnicas de cultivo celular

5 Las técnicas de cultivo celular estándar se utilizaron 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 Expresión transitoria de variantes de inmunoglobulina en células HEK293F

Los anticuerpos biespecíficos se expresaron mediante transfección transitoria de células de riñón embrionario humano 293-F utilizando el sistema de Expresión FreeStyle™
15 293 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA). Brevemente, las células FreeStyle™ 293-F en suspensión se cultivaron en medio de expresión FreeStyle™ 293 a 37°C/ CO₂ 8 % y las células se sembraron en medio fresco a una densidad de 1-2x10⁶ células viables/ml el
20 día de la transfección. Los complejos DNA-293fectin™ se prepararon en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) utilizando 333 µl de 293fectin™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de DNA de plásmido de cadena pesada y ligera en una proporción molar 1:1 para un volumen de transfección final
25 de 250 ml. Los sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpos biespecíficos se clarificaron 7 días tras la transfección mediante centrifugación a 14000 g durante 30 minutos y se filtraron a través de un filtro

estéril (0,22 µm). Los sobrenadantes se almacenaron a -20° C hasta su purificación.

Determinación de proteína

La concentración de proteína de anticuerpos
5 purificados y derivados se determinó determinando la
densidad óptica (DO) a 280 nm con la DO a 320nm como
corrección de ruido de fondo, utilizando el coeficiente de
extinción molar calculado en base de la secuencia de
aminoácidos de acuerdo con Pace, C.N., et. al., Proteine
10 Science, 4 (1995) 2411-1423.

Determinación de la concentración de anticuerpo en los sobrenadantes

La concentración de anticuerpos y derivados en los
sobrenadantes de cultivo celular se midió mediante
15 cromatografía de afinidad HPLC. Brevemente, los
sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpos
y derivados que se unen a la Proteína A se aplicaron a una
columna Applied Biosystems Poros A/20 en KH₂PO₄ 200 mM,
citrato sódico 100 mM, pH 7,4 y se eluyeron de la matriz
20 con NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM, pH 2,5 en un sistema
UltiMate 3000 HPLC (Dionex). La proteína eluída se
cuantificó mediante absorbancia UV e integración de las
áreas de los picos. Un anticuerpo IgG1 purificado estándar
sirvió como estándar.

25 Purificación de Proteínas

Los anticuerpos secretados se purificaron a partir del
sobrenadante en dos pasos mediante cromatografía de
afinidad utilizando Proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare,

Suecia) y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200. Brevemente, los sobrenadantes del cultivo clarificado que contiene anticuerpo biespecífico y triespecífico se aplicaron en una columna HiTrap Proteína A HP (5 ml) equilibrada con tampón PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no unidas se eliminaron por lavados con tampón de equilibrado. Los anticuerpos biespecíficos se eluyeron con tampón citrato 0,1 M, pH 2,8, y las fracciones que contienen proteína se neutralizaron con 0,1 ml de Tris 1M, pH 8,5. Después, las fracciones de proteína eluída se juntaron, se concentraron con un dispositivo de filtro centrífugo Amicon Ultra (MWCO: 30 K, Millipore) en un volumen de 3 ml y se cargaron en una columna de filtración en gel Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60 (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con Histidina 20mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Las fracciones de anticuerpo monomérico se juntaron, se congelaron muy rápido y se almacenaron a -80°C . Se proporcionaron partes de las muestras para un posterior análisis de proteína y caracterización.

Análisis de proteínas purificadas

La concentración de proteína de muestras de proteína purificada se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado en base de la secuencia de aminoácidos. La pureza de los anticuerpos biespecíficos se analizó mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y se tiñó con azul brillante de

Coomassie. El sistema de geles preparados NuPAGE® (Invitrogen, USA) se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (geles de Tris-Glicina al 4-20%). El contenido agregado de las muestras de anticuerpo
5 biespecífico se analizó mediante SEC de alto rendimiento en un sistema UltiMate 3000 HPLC (Dionex) utilizando una columna analítica Superdex 200 de exclusión por tamaño (GE Healthcare, Suecia) en KH_2PO_4 200 mM, KCl 250 mM, pH 7,0 tampón de reacción a 25°C. Se inyectó 25 µg de proteína en
10 la columna en una tasa de flujo de 0,5 ml/min y se eluyó de forma isocrática durante 50 minutos. Para el análisis de estabilidad, se prepararon concentraciones de 0,1 mg/ml, 1 mg/ml y 3 mg/ml de proteínas purificadas y se incubaron a 4°C, 37°C durante 7 días y después se analizaron mediante
15 SEC de alto rendimiento. La integridad de la estructura de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada reducidas del anticuerpo biespecífico se verificó mediante espectrometría de masas por NanoElectropulverización Q-TOF tras eliminar los N-glicanos mediante tratamiento enzimático con Péptido-
20 N-Glucosidasa F (Roche Molecular Biochemicals).

Ejemplo 1

Expresión y Purificación de moléculas de anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF1R> XGFR1

Se construyeron las cadenas ligera y pesada de los
25 correspondientes anticuerpos biespecíficos en vectores de expresión portadores de marcadores de selección procariotas y eucariotas. Estos plásmidos se amplificaron en E.coli, se purificaron, y posteriormente se transfectaron para una

expresión transitoria de proteínas recombinantes en células HEK293F (utilizando el sistema Freestyle de Invitrogen). Tras 7 días, los sobrenadantes de las células HEK 293 se recogieron y se purificaron mediante proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. La homogeneidad de todas las construcciones de anticuerpo biespecífico se confirmó mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras. Bajo condiciones reductoras (Fig. 2a), las cadenas de polipéptido portadoras de fusiones scFv en C- y N-terminal mostró tras el SDS-PAGE unos tamaños moleculares aparentes análogos a los pesos moleculares calculados. Los niveles de expresión de todas las construcciones se analizaron mediante HPLC proteína A y fue similar a los rendimientos de expresión de IgG "estándar", o en algunos casos algo inferior. El rendimiento medio de proteína estuvo entre 1 y 36 mg de proteína purificada por litro de sobrenadante de cultivo celular en los experimentos de expresión transitoria no optimizada (Figura 3). Las construcciones no estabilizadas por disulfuros con scFv fusionados en C-terminal en la cadena ligera (XGFR-4320) o cadena pesada (XGFR-2320) mostraron mayores cantidades de proteína recuperada del tamaño deseado tras la purificación de proteína A que los que tienen los scFv fusionados en N-terminal (XGFR1-3320 y XGFR1-5320).

El análisis por cromatografía HP de exclusión por tamaño de las proteínas purificadas mostró (en comparación con IgG "normales") cierta tendencia a agregar en moléculas que contienen scFv no estabilizados por disulfuros

intercadena entre VH y VL. Para enfrentarse a los problemas de agregación de dichos anticuerpos biespecíficos, se aplicó estabilización de las porciones scFv con disulfuros. Por eso se introdujeron sustituciones únicas de cisteína en las VH y VL de los scFv en determinadas posiciones (posiciones VH44/VL100 de acuerdo con el esquema de numeración Kabat). Estas mutaciones permiten la formación de disulfuros intercadena estables entre VH y VL, que a su vez estabilizan el módulo resultante de scFv estabilizado con disulfuros. La introducción de los VH44/VL100 disulfuros en scFv en los extremos N- y C-terminal del Fv conducen a una mejora en los niveles de expresión de proteína para todas las construcciones (véase Figura 4).

Los anticuerpos biespecíficos se expresaron mediante transfección transitoria de células de riñón embrionario humano 293-F utilizando el sistema de Expresión FreeStyle™ 293 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA). Brevemente, se cultivaron las células 293-F en suspensión FreeStyle™ en medio de expresión FreeStyle™ 293 a 37°C/CO₂ 8 % y las células se sembraron en medio fresco a una densidad de 1-2x10⁶ células viables/ml el día de la transfección. Los complejos de DNA-293fectin™ se prepararon en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) utilizando 333 µl de 293fectin™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de DNA de plásmido de cadena pesada y ligera en una proporción molar 1:1 para un volumen de transfección final de 250 µl. Los sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpos biespecíficos se clarificaron 7 días

tras la transfección mediante centrifugación a 14000 g durante 30 minutos y se filtraron a través de un filtro estéril (0,22 µm). Los sobrenadantes se almacenaron a -20° C hasta su purificación.

5 Los anticuerpos secretados se purificaron del sobrenadante en dos pasos mediante cromatografía de afinidad utilizando Proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de exclusión Superdex200 por tamaño. Brevemente, los sobrenadantes de los cultivos
10 clarificados que contienen anticuerpos biespecíficos y triespecíficos se aplicaron en una columna HiTrap Proteína A HP (5 ml) equilibrada con tampón PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no unidas se eliminaron mediante lavados con tampón de
15 equilibrado. Los anticuerpos biespecíficos se eluyeron con tampón citrato 0,1 M, pH 2,8, y las fracciones que contienen proteína se neutralizaron con 0,1 ml Tris 1 M, pH 8,5. Después, las fracciones de proteína eluída se juntaron, se concentraron con un Dispositivo de filtro por
20 centrifugación Amicon Ultra (MWCO: 30 K, Millipore) en un volumen de 3 ml y se cargaron en una columna de filtración en gel Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60 (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con Histidina 20mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Las fracciones de anticuerpo monomérico se juntaron,
25 se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80°C. Parte de las muestras se proporcionaron para un posterior análisis de las proteínas y caracterización.

XGFR1-2320 posee un rendimiento final tras la

purificación de 0,27 mg mientras que XGFR1-2321 posee un rendimiento final de 13,8 mg.

Un ejemplo de purificación y análisis de anticuerpos biespecíficos por **SDS-PAGE** y cromatografía HP de exclusión por tamaño (SEC) se muestra en las **Figuras 3 y 4**.

Ejemplo 2

Estabilidad de moléculas de anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF1R> XGFR1 in vitro

Se realizó un análisis por cromatografía HP de exclusión por tamaño

El contenido agregado de las muestras de anticuerpo biespecífico se analizaron mediante SEC de alto rendimiento en un Sistema UltiMate 3000 HPLC (Dionex) utilizando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE Healthcare, Suecia) en KH_2PO_4 200 mM, KCl 250 mM, pH 7,0 tampón de reacción a 25°C. Se inyectaron 25 µg de proteína en la columna en una tasa de flujo de 0,5 ml/min y se eluyeron de forma isocrática durante 50 minutos. Para el análisis de estabilidad, se prepararon concentraciones de 0,1 mg/ml, 1 mg/ml y 5 mg/ml de proteínas purificadas y se incubaron a 4°C, 37°C y 40°C durante 7 o 28 días y después se analizaron mediante SEC de alto rendimiento. la integridad de la estructura de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada reducidas del anticuerpo biespecífico se verificaron mediante Espectrometría de masas por NanoElectropulverización Q-TOF tras eliminar los N-glicanos mediante tratamiento enzimático con Péptido-N-Glicosidasa F (Roche Molecular Biochemicals).

El análisis por cromatografía HP de exclusión por tamaño de las proteínas purificadas bajo diferentes condiciones (variando la concentración y el tiempo) mostró - en comparación con IgG normal - un gran aumento de la
5 tendencia a agregar las moléculas que contienen scFv.

Para este trabajo, se definió moléculas "monoméricas" deseadas las compuestas por 2 heterodímeros de cadenas ligera y pesada con scFv conectado a ambas.

Por contra a la fuerte tendencia de agregación de las
10 entidades que contienen scFv no modificadas, el análisis HP de exclusión por tamaño de las construcciones VH44/VL100 estabilizados por disulfuros mostró mucha menos tendencia a agregar.

Un ejemplo de purificación y análisis de anticuerpos
15 biespecíficos por cromatografía HP de exclusión por tamaño (SEC) se muestra en la **Figura 4**.

Ejemplo 3

Unión simultánea de moléculas de anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF1R> XGFR1 a los RTK de EGFR e IGF1R

20 Se comparó la unión de los módulos de scFv y de los Fv retenidos en el módulo IgG de los diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos en la unión de las IgG "salvajes" de los módulos de unión y anticuerpos biespecíficos de los que derivan. Estos análisis se llevaron a cabo aplicando
25 Resonancia de plasmón en superficie (Biacore), así como un ELISA celular.

Las propiedades de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-IGF-1R/anti-EGFR se analizaron mediante

tecnología de resonancia de plasmón en superficie (SPR) utilizando un instrumento Biacore T100 (Biacore AB, Uppsala). Este sistema está bien establecido para el estudio de interacciones moleculares. Permite una
5 monitorización continua en tiempo real de unión de ligando/analito y así la determinación de las constantes de tasa de asociación (k_a), constantes de tasa de disociación (k_d), y constantes de equilibrio (K_D) en varios ajustes de ensayo. La tecnología SPR está basada en la medición del
10 índice de refracción cerca de la superficie de un chip biosensor cubierto de oro. Los cambios en el índice de refracción indican cambios en la masa en la superficie provocados por la interacción de ligando inmovilizado con analito inyectado en la solución. Si las moléculas se unen
15 al ligando inmovilizado en la superficie la masa aumenta, en el caso de disociación la masa disminuye.

Se inmovilizó anticuerpo de captura anti-IgG humana en la superficie de un chip biosensor CM5 utilizando química de acoplamiento a amina. El flujo de células se activó con
20 una mezcla 1:1 de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida 0,1 M en una tasa de flujo de 5 μ l/min. El anticuerpo anti-IgG humano se inyectó en acetato sódico, pH 5,0 a 10 μ g/ml, que resultó en una densidad de superficie de aproximadamente 12000 RU. Un
25 flujo de células de referencia control se trató de la misma manera pero solamente con tampones vehículo en lugar del anticuerpo de captura. Las superficies se bloquearon con una inyección de etanolamina 1M /HCl pH 8,5. Los

anticuerpos biespecíficos se diluyeron en HBS-P y se inyectaron a una tasa de flujo de 5 µl/min. El tiempo de contacto (fase de asociación) fue de 1 min para los anticuerpos a una concentración entre 1 y 5 nM para la unión de EGFR-ECD y 20 nM para la interacción IGF-1R. Se inyectó EGFR-ECD a concentraciones incrementales de 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 nM, IGF-1R a concentraciones de 0,21, 0,62, 1,85, 5,6, 16,7 y 50 nM. El tiempo de contacto (fase de asociación) fue de 3 min, el tiempo de disociación (lavados con tampón de reacción) 5 min para ambas moléculas en una tasa de flujo de 30 µl/min. Todas las interacciones se realizaron a 25°C (temperatura estándar). La solución de regeneración de Cloruro magnésico 3 M se inyectó durante 60 s a un flujo de 5 µl/min para eliminar cualquier proteína no unida de forma covalente tras cada ciclo de unión. Las señales se detectaron a una tasa de una señal por segundo. Las muestras se inyectaron a concentraciones incrementales.

Un ejemplo de unión simultánea de un anticuerpo biespecífico a EGFR e IGF1R se muestra en la Figura 5.

Tabla 4 - Afinidades (KD) de anticuerpos biespecíficos (nomenclatura XGFR -) a EGFR e IGF-1R

Molécula	valor KD (Afinidad a EGFR)	valor KD (Afinidad a IGF-1R)
XGFR1-2321	4 nM	n.d
XGFR1-2421	6 nM	6nM
XGFR1-3321	6 nM	4nM
XGFR1-3421	3 nM	2nM
XGFR1-4321	5 nM	n.d.

XGFR1-4421	3 nM	5nM
XGFR1-5321	4 nM	n.d.
XGFR1-5421	3 nM	2nM
<EGFR> ICR62	3 nM	n.d
<IGF-1R> HUMAB-Clon 18	n.d.	5nM

Ejemplo 4

Regulación negativa de EGFR así como IGF1R- mediante moléculas de anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF1R> XGFR1

Los anticuerpos anti-IGF-1R humanos <IGF-1R> HUMAB
5 Clon 18 (DSM ACC 2587) inhiben la señalización de IGF1R y los anticuerpos anti-EGFR de rata humanizados <EGFR>ICR62 inhiben la señalización mediante EGFR. Para evaluar la actividad inhibidora potencial de las diferentes variantes de XGFR1, se analizó el grado de regulación negativa del
10 receptor de ambos.

Para poder detectar los efectos del anticuerpo de la invención en la cantidad de receptor de IGF-I (IGF-IR) en células tumorales, se realizaron experimentos de seguimiento a lo largo del tiempo y posterior análisis
15 ELISA con anticuerpos específicos de IGF-IR y EGFR.

Las células tumorales humanas (A549, 2 x 10⁵ células/ml) en medio RPMI-VM (PAA, N° de Cat. E15-039) suplementado con PenStrep al 1% en una placa de 6 pocillos y se inoculó con 4 ml de células en el medio
20 correspondiente para cada experimento y se cultivó durante

24 horas a 37°C y CO₂ al 5%.

El medio se retiró con cuidado y se sustituyó por 2ml de anticuerpos XGFR 0,01 mg/ml diluidos en Medio RPMI-VM. En los pocillos control, el medio se sustituyó por el medio sin anticuerpo, el medio con anticuerpos control (<IGF-1R> HUMAB Clon 18 y <EGFR>ICR62 concentración final 0,01 mg/ml) y un pocillo que contiene solamente tampón. Las células se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% y las placas individuales se retiraron para un posterior procesamiento a las 24 horas.

El medio se retiró con cuidado por aspiración y las células se lavaron con 1ml de PBS. Se añadió 300 µl/pocillo de tampón de lisis MES frío (MES, Na₃VO₄ 10 mM, e inhibidor de proteasa Complete®). Las células se despegaron utilizando un rascador de células (Corning, N° de Cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se eliminaron los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C.

Detección de EGFR

Las placas microtituladas de 96 pocillos con estreptavidina (PMT) se prepararon de acuerdo con el protocolo (DuoSet ELISA para EGFR Humano, RnD systems N° de Cat. DY231). El anticuerpo de cabra anti-EGFR Humano 144 µg/ml en PBS se diluyó 1:180 en PBS y se añadió 100 µl/pocillo a la PMT. La PMT se incubó durante la noche a 4°C con agitación. Las placas se lavaron 3 veces con PBS suplementado con Tween®20 al 0,1% y se bloquearon con 300 µl/pocillo de PBS, solución de BSA al 3% y Tween®20 al 0,1%

durante 1 hora (h) a temperatura ambiente (TA) con agitación. Las placas se lavaron 3 veces con PBS suplementado con Tween®20 al 0,1%.

La cantidad de proteína en los lisados celulares se
5 determinó utilizando el equipo BCA Protein Assay de (Pierce), los lisados celulares se ajustaron entonces a la concentración de proteína de 0,1 mg/ml con tampón de lisis MES suplementado con Na₃VO₄ 100 mM 1:100 e inhibidor de proteasa Complete® 1:20 y 100 µl por pocillo del lisado se
10 añadió a la PMT previamente preparada.

Se utilizó una segunda concentración de lisado celular a 0,05 mg/ml el lisado se diluyó 1:2 y se añadieron 100 µl por pocillo a la PMT previamente preparada. La PMT se incubó durante otras 2 horas a TA con agitación y después
15 se lavaron 3 veces con PBS con una solución de Tween®20 al 0,1%.

El anticuerpo de detección para EGFR era un anticuerpo biotinilado de cabra anti-EGFR humano a una concentración de 36 µg/ml diluido 1:180 en PBS, BSA al 3% y Tween®20 al
20 0,2%. Se añadió 100 µl por pocillo y se incubó a TA durante 2 horas con agitación. La PMT se lavó después tres veces con 200 µl por pocillo de PBS con solución de Tween®20 al 0,1%. Se añadió entonces 100 µl por pocillo del anticuerpo secundario Estreptavidina-HRP 1:200 en PBS, BSA al 3% y
25 Tween®20 al 0,2% y se incubó con agitación durante 20 minutos a TA. La placa se lavó después seis veces con PBS con solución de Tween®20 al 0,1%. Se añadió 100 µl por pocillo de 3,3'-5,5'-Tetrametilbencidina (Roche, BM-Blue

ID-Nº: 11484581) y se incubó durante 20 minutos a TA con agitación. Se paró la reacción de color al añadir 25 µl por pocillo de H₂SO₄ 1M y se incubó durante otros 5 minutos a TA. La absorbancia se midió a 450nm.

5 Detección de IGF-1R

La PMT de estreptavidina (Roche ID. Nº: 11965891001) se preparó añadiendo 100 µl por pocillo del anticuerpo AK1a-Biotinilado (Genmab, Dinamarca) que se diluyó 1:200 en PBS, BSA 3% y Tween®20 0,2%. La PMT de estreptavidina se
10 incubó durante 1 hora a TA con agitación y después se lavó tres veces con 200 µl por pocillo de PBS con una solución de Tween®20 al 0,1%.

La cantidad de proteína en los lisados celulares se determinó utilizando el equipo BCA Protein Assay (Pierce),
15 los lisados celulares se ajustaron entonces a la concentración de proteína de 0,04 mg/ml con Tris 50mM pH 7,4, Na₃VO₄ 100 mM 1:100 e inhibidor de proteasa Complete® 1:20 y se añadió 100 µl por pocillo del lisado a la PMT de estreptavidina previamente preparada.

20 Se utilizó una segunda concentración de lisado celular a 0,02 mg/ml el lisado se diluyó y se añadió 100 µl por pocillo a la PMT de estreptavidina previamente preparada. El control positivo que contiene las células no estimuladas se diluyó a 1:4000 en tampón de lisis suplementado con Tris
25 50mM pH 7,4, Na₃VO₄ 100 mM 1:100 e inhibidor de proteasa Complete® 1:20 y se añadió 100 µl por pocillo del lisado a la PMT de estreptavidina previamente preparada. Para el control negativo se añadió 100 µl de tampón de lisis al

pocillo en la PMT de estreptavidina.

La PMT se incubó durante otra hora a TA con agitación y después se lavó 3 veces con PBS con una solución de Tween®20 al 0,1%.

- 5 El anticuerpo de detección para IGF-1R fue un anticuerpo de conejo anti IGF-1R β humano (Santa Cruz Biotechnology, N° de Cat. sc-713) diluido 1:750 en PBS, BSA al 3% y Tween®20 al 0,2%. Se añadió 100 μ l por pocillo y se incubó a TA durante 1 hora con agitación. La PMT se lavó
- 10 después tres veces con 200 μ l por pocillo de PBS con una solución de Tween®20 al 0,1%. Se añadió después el anticuerpo secundario de conejo IgG-POD (Cell signaling N° de Cat. 7074) 1:4000 en PBS, BSA al 3% y Tween®20 al 0,2%, se añadió 100 μ l por pocillo y se incubó con agitación
- 15 durante 1 hora a TA. La placa se lavó después seis veces con PBS con una solución de Tween®20 al 0,1%. Se añadió 100 μ l por pocillo de 3,3'-5,5'-Tetrametilbencidina (Roche, BM-Blue ID-N°: 11484581) y se incubó durante 20 minutos a TA con agitación. Se paró la reacción de color al añadir 25 μ l
- 20 por pocillo de H₂SO₄ 1M y se incubó durante otros 5 minutos a TA. La absorbancia se midió a 450nm.

- Los resultados de la detección de la regulación negativa del receptor por los anticuerpos biespecíficos XGFR en comparación con los anticuerpos monoespecíficos
- 25 parentales <EGFR>ICR62 y <IGF-1R> HUMAB-Clon 18 en células A549 se muestran en la Figura 12. Los anticuerpos biespecíficos XGFR regulan negativamente ambos EGFR e IGF1R. De forma sorprendente los anticuerpos biespecíficos

XGFR, mostraron una regulación negativa de EGFR mejorada en comparación con el anticuerpo parental <EGFR>ICR62.

Ejemplo 5

**Inhibición de las rutas de señalización de EGFR así
5 como de IGF1R mediante moléculas de anticuerpo biespecífico
<EGFR-IGF1R> XGFR1**

Los anticuerpos anti-IGF-1R humano <IGF-1R> HUMAB Clon
18 (DSM ACC 2587) inhiben la señalización de IGF1R y los
anticuerpos humanizados de rata anti-EGFR ICR62 inhiben la
10 señalización de EGFR. Para evaluar la actividad inhibitoria
potencial de las diferentes variantes de XGFR1, se analizó
el grado de inhibición de la señalización hacia ambas
rutas.

Las células tumorales humanas (H322M, 2×10^5
15 células/ml) en medio RPMI (PAA, N° de Cat. E15-039) se
suplementaron con PenStrep 1% en una placa de 6 pocillos y
se inocularon con 4 ml de células en el medio
correspondiente para cada experimento y se cultivaron
durante 24 horas a 37°C y CO₂ 5%.

20 El medio se retiró con cuidado y se sustituyó por 2ml
0,01 mg/ml de anticuerpos XGFR diluidos en Medio RPMI-VM.
En los pocillos control, el medio se sustituyó por el medio
sin anticuerpo, el medio con anticuerpos control (<IGF-1R>
HUMAB Clon 18 y <EGFR>ICR62 concentración final 0,01 mg/ml)
25 y un pocillo que contienen solamente tampón. Las células se
incubaron a 37°C y CO₂ 5% y las placas individuales se
retiraron para un posterior procesado a las 24 horas.

Detección de la fosforilación de EGFR

Se utilizó el sistema DuoSet® IC fosfo-EGFR humano, RnD systems N° de Cat. DYC1095-5. Las placas se prepararon diluyendo el anticuerpo de captura Fosfo EGFR (N° de Cat. 841402) a una concentración de 0,8 µg/ml. Se añadió 100 µl por pocillo de la PMT. La placa se selló e incubó durante la noche a TA.

El anticuerpo de captura se aspiró entonces y cada pocillo se lavó con 400 µl de tampón de lavado (Tween®20 0,05% en PBS pH 7,2-7,4 N° Cat. WA126) cinco veces tras el lavado final secando la placa sobre servilletas de papel limpias.

Las placas se bloquearon añadiendo 300 µl de tampón de bloqueo (BSA al 1%, NaN₃ al 0,05% en PBS pH 7,2-7,4) y se incubaron a TA durante 2 horas. La solución se aspiró entonces y cada pocillo se lavó con 400 µl de tampón de lavado (Tween®20 al 0,05% en PBS pH 7,2-7,4 N° de Cat WA126) cinco veces tras el lavado final secando la placa sobre servilletas de papel limpias.

Las células se enjuagaron en PBS y se lisaron utilizando tampón de lisis 9 (NP-401%, Tris 20mM pH 8,0, NaCl 137mM, Glicerol 10%, EDTA 2mM, ortovanadato sódico activado 1mM, Aprotinina 10 µg/ml y Leupeptina 10 µg/ml) a una densidad celular de 1×10^7 células/ml y se incubaron a 4°C durante 30 minutos con agitación suave. Las muestras se centrifugaron a 14,000g durante 5 minutos. Las muestras se transfirieron entonces a un tubo de ensayo limpio.

La cantidad de proteína en los lisados celulares se determinó utilizando el equipo BCA Protein Assay (Pierce),

los lisados celulares se ajustaron entonces a concentraciones de proteína de 0,1 mg/ml y 0,05 mg/ml con Diluyente IC 12 (NP-40 1%, Tris 20mM pH 8,0, NaCl 137mM, Glicerol 10%, EDTA 2mM, ortovanadato sódico activado 1mM).

5 Se añadió 100 µl por pocillo del lisado a la PMT previamente preparada. La placa se selló y se incubó durante 2 horas a TA.

Inmediatamente antes de su uso, el anticuerpo de detección se diluyó a la concentración de trabajo
10 especificada en el vial en Diluyente IC 14 (Tris 20mM, NaCl 137mM, Tween®20 0,05%, BSA 0,1%, pH 7,2-7,4). Se añadió 100 µl del anticuerpo de detección por pocillo, la placa se selló y se incubó a TA durante 2 horas en la oscuridad. El anticuerpo de detección se aspiró entonces y cada pocillo
15 se lavó con 400 µl de tampón de lavado (Tween®20 0,05% en PBS pH 7,2-7,4 N° Cat. WA126) cinco veces tras el lavado final secando la placa sobre servilletas de papel limpias.

Se añadió 100 µl de solución de sustrato (N° de Cat. DY999) por pocillo y la placa se incubó en la oscuridad
20 durante otros 20 minutos. La reacción se paró al añadir 50 µl de solución de parada H2SO4 2N (N1 de Cat. DY994) y se mezcló vigorosamente.

La absorbancia se midió a 450nm.

Detección de la fosforilación de IGF-1R

25 La PMT de estreptavidina (Roche ID. No.: 11965891001) se preparó añadiendo 100 µl por pocillo del anticuerpo AK1a-Biotinilado (Genmab, Dinamarca) que se diluyó 1:200 en PBS, BSA 3% y Tween®20 0,2%. La PMT de estreptavidina se

incubó durante 1 hora a TA con agitación y después se lavó tres veces con 200 µl por pocillo de PBS con solución Tween®20 0,1%.

La cantidad de proteína en los lisados celulares se determinó utilizando el equipo BCA Protein Assay (Pierce), los lisados celulares se ajustaron entonces a la concentración de proteína de 1 µM con Tris 50mM pH 7,4, Na₃VO₄ 100 mM 1:100 e inhibidor de proteasa Complete® 1:20 y se añadió 100 µl por pocillo del lisado a la PMT de estreptavidina previamente preparada.

El control positivo que contiene las células no estimuladas se diluyó a 1:4000 en tampón de lisis suplementado con Tris 50mM pH 7,4, Na₃VO₄ 100 mM 1:100 e inhibidor de proteasa Complete® 1:20 y se añadió 100 µl por pocillo del lisado a la PMT de estreptavidina previamente preparada. Para el control negativo se añadió 100 µl de tampón de lisis al pocillo en la PMT de estreptavidina.

La PMT se incubó durante otra hora a TA con agitación y después se lavó 3 veces con PBS con solución Tween®20 al 0,1%.

El anticuerpo de detección para IGF-1R fue el anticuerpo anti IGF-1R humano (Tyr1135/1136)/ receptor beta de Insulina (Tyr1150/1151) (19H7) (Cell signalling, N° de Cat. 3024L) diluido 1:500 en PBS, BSA 3% y Tween®20 0,2%. Se añadió 100 µl por pocillo y se incubó a TA durante 1 hora con agitación. La PMT se lavó después tres veces con 200 µl por pocillo de PBS con solución Tween®20 al 0,1%. Se añadió entonces el anticuerpo secundario de conejo IgG-POD

(Cell signalling N° de Cat. 7074) 1:4000 en PBS, BSA 3% y Tween®20 0,2%, se añadió 100 µl por pocillo y se incubó con agitación durante 1 hora a TA. La placa se lavó después seis veces con PBS con solución Tween®20 al 0,1%. Se añadió
5 100 µl por pocillo de 3,3'-5,5'-Tetrametilbencidina (Roche, BM-Blue ID-No.: 11484581) y se incubó durante 20 minutos a TA con agitación. La reacción de color se paró al añadir 25 µl por pocillo de H₂SO₄ 1M y se incubó durante otros 5 minutos a TA. La absorbancia se midió a 450nm.

10 Las Figuras 7a y 7b muestran que la aplicación de <IGF-1R> HUMAB-Clon 18 reduce fuertemente la señal de fosforilación específica en un ensayo de señalización de IGFR1 pero no tiene efecto en el correspondiente ensayo que midió la señalización de EGFR. Viceversa, la aplicación de
15 <EGFR>ICR62 redujo la señal de fosforilación específica en un ensayo de señalización de EGFR -pero no tuvo ningún efecto en el correspondiente ensayo que midió la señalización de IGF1R. Las variantes de XGFR1 N° 2421, 3421, y 4421, cuando se aplicaron a los mismos ensayos en
20 molaridades idénticas, mostraron la misma o mejor actividad que los anticuerpos salvajes en ambos ensayos. Así, las moléculas XGFR1 son capaces de interferir con ambas vías de señalización.

Ejemplo 6

25 **Inhibición del crecimiento mediado por XGFR1 en líneas celulares tumorales in vitro**

El anticuerpo anti-IGF-1R humano <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) inhibe el crecimiento en líneas celulares

tumorales que expresan el IGF1R (WO 2005/005635). De forma similar, los anticuerpos de rata humanizados anti-EGFR <EGFR>ICR62 han mostrado inhibir el crecimiento en líneas celulares tumorales que expresan EGFR (WO 2006/082515).

- 5 Para evaluar la actividad inhibidora potencial de las diferentes variantes de XGFR1 en los ensayos de crecimiento de líneas celulares tumorales, se analizó el grado de inhibición en células H322M que expresan EGFR así como IGF1R.
- 10 Las células H322M se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con medio FCS 0,5% en placas cubiertas de poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) para prevenir la adherencia a la superficie de plástico. Bajo estas condiciones las células H322M forman esferoides densos que
- 15 crecen tridimensionalmente (una propiedad que se denomina independencia de anclaje). Estos esferoides se parecen mucho a la histoarquitectura tridimensional y organización de los tumores sólidos in-situ. Los cultivos esferoides se incubaron durante 5 días en presencia de cantidades
- 20 incrementales de anticuerpos de 50 o 100 nM. El ensayo de conversión WST se utilizó para medir la inhibición del crecimiento. Cuando los cultivos de esferoides H322M se trataron con <IGF-1R> HUMAB-Clon 18, pudo observarse una inhibición en el crecimiento.
- 25 La Figura 8 muestra que la aplicación de <IGF-1R> HUMAB-Clon 18 50 nM redujo el crecimiento celular en un 53%, y que la aplicación de <EGFR>ICR62 50 nM redujo el crecimiento celular en un 53% de la misma forma.

La aplicación simultánea de ambos anticuerpos (en las mismas concentraciones) resultó en un mayor descenso de la viabilidad celular hasta un 26% (inhibición del 74%). Esto indica que la interferencia simultánea con ambas rutas de RTK tiene un efecto más profundo en las líneas celulares tumorales que la interferencia con tan solo una ruta.

La aplicación de varias variantes de XGFR1 a una concentración molar de 50 nM resultó en una mayor inhibición del crecimiento que fue más pronunciada que la observada con sólo moléculas únicas a concentraciones 50 nM.

De hecho, a una concentración de anticuerpo de 50 nM, varias variantes de XGFR1 mostraron una actividad antiproliferativa mejorada en comparación con la combinación de los anticuerpos anti <EGFR> y <IGF1R> originales a la doble concentración de anticuerpo de 100 nM (50 nM <IGF-1R> HUMAB-Clon 18 y 50 nM <EGFR>ICR62).

Se concluye que las moléculas de XGFR1 poseen un profundo aumento de la actividad inhibidora del crecimiento en comparación con las IgG que interfieren con la señalización de EGFR o la señalización de IGF1R. Además, si se compara la actividad de las moléculas de XGFR1 con la actividad de la mezcla de anticuerpos <IGF-1R> HUMAB-Clon 18 y <EGFR>ICR62, puede lograrse una actividad igual o mayor a concentraciones (molar y masa) que están claramente por debajo que la de la mezcla.

Tabla 5 - Actividades antiproliferativas (supervivencia e inhibición) de anticuerpos biespecíficos

(nomenclatura XGFR) frente a células tumorales H322M.

Anticuerpo (concentración)	RLU	% supervivencia	% inhibición
Medio	32177	100	0
Tampón	32995	103	-3
IgG	32847	102	-2
<IGF-1R> HUMAB-Clon 18 (50nM)	15015	47	53
<EGFR> ICR62 (50nM)	15163	47	53
<IGF-1R> HUMAB-Clon 18 (50nM) + <EGFR> ICR62 (50nM) (=100 nM concen- tración de anticuerpo)	8381	26	74
XGFR1-2321 (50nM)	8283	26	74
XGFR1-2421 (50nM)	7356	23	77
XGFR1-3321 (50nM)	8268	26	74
XGFR1-3421 (50nM)	7989	25	75
XGFR1-4321 (50nM)	16158	50	50
XGFR1-4421 (50nM)	10668	33	67
XGFR1-5321 (50nM)	14213	44	56
XGFR1-5421 (50nM)	9506	30	70

Ejemplo 7

Preparación de derivados glicodiseñados de XGFR1-2421, XGFR1-3421, XGFR1-4421 y XGFR1-5421 (XGFR1-2421-GE, XGFR1-3421-GE, XGFR1-4421-GE y XGFR1-5421-GE)

Las secuencias de DNA resultantes de las cadenas

MB

ligera y pesada del anticuerpo completo se subclonaron en vectores de expresión de mamíferos (uno para la cadena ligera y uno para la cadena pesada) bajo el control del promotor MPSV y corriente arriba de un sitio políA
5 sintético, llevando cada vector una secuencia EBV OriP.

Los anticuerpos se produjeron mediante la cotransfección de células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamíferos de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo utilizando una aproximación de transfección con
10 fosfato cálcico. Las células HEK293-EBNA en crecimiento exponencial se transfectaron mediante el método de fosfato cálcico. Para la producción de anticuerpos no modificados, las células se transfectaron sólo con vectores de expresión de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo en una
15 proporción 1:1. Para la producción del anticuerpo glicodiseñado, las células se co-transfectaron con cuatro plásmidos, dos para la expresión de anticuerpo, uno para la expresión de la fusión del polipéptido GnTIII, y uno para la expresión de manosidasa II en una proporción de 4:4:1:1,
20 respectivamente. Las células se hicieron crecer como cultivos adherentes monocapa en frascos T utilizando medio de cultivo DMEM suplementado con FCS 10%, y se transfectaron cuando estuvieron en una confluencia entre el 50 y el 80%. Para la transfección en frascos T75, 8
25 millones de células se sembraron 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (al 10% V/V final), neomicina 250 µg/ml, y las células se colocaron a 37°C en un incubador con una

atmósfera de CO₂ al 5% durante la noche. Para cada frasco T75 a transfectar, se preparó una solución de DNA, CaCl₂ y agua mezclando 47 µg de DNA total de vector plasmídico dividido a partes iguales entre los vectores de expresión
5 de la cadena pesada y ligera, 235 µl de una solución CaCl₂ 1M, y añadiendo agua a un volumen final de 469 µl. A esta solución, se le añadió 469 µl de una solución HEPES 50mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM a pH 7,05, se mezcló inmediatamente durante 10 seg y se dejó reposar a
10 temperatura ambiente durante 20 seg. La suspensión se diluyó con 12 ml de DMEM suplementado con FCS al 2%, y se añadió al T75 en lugar del medio existente. Las células se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante alrededor de 17 a 20 horas, después el medio se sustituyó con 12 ml de DMEM, FCS
15 al 10%. El medio de cultivo condicionado se recogió de 5 a 7 días tras la transfección, se centrífugo durante 5 min a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 min a 4000 rpm y se mantuvo a 4°C.

Los anticuerpos secretados se purificaron mediante
20 cromatografía de afinidad Proteína A, seguido de cromatografía de intercambio de cationes y un paso final de cromatografía por exclusión de tamaño en una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) cambiando el tampón a tampón fosfato salino y recogiendo los anticuerpos IgG1
25 monoméricos puros. La concentración de anticuerpo se estimó utilizando un espectrofotómetro a partir de la absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos se formularon en una solución de fosfato potásico 25 mM, cloruro sódico 125 mM, glicina 100

mM a pH 6,7.

Las variantes glicodiseñadas de los anticuerpos humanizados se produjeron mediante cotransfección de los vectores de expresión de anticuerpos junto con un vector de expresión GnT-III glicosiltransferasa, o junto con un vector de expresión de GnT-III más un vector de expresión de Golgi manosidasa II. Los anticuerpos glicodiseñados se purificaron y formularon como se describe antes para los anticuerpos no glicodiseñados. Los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos se analizaron mediante EM MALDI/TOF como se describe más adelante.

Los oligosacáridos se liberaron enzimáticamente de los anticuerpos mediante digestión con PNGasaF, con los anticuerpos inmovilizados en una membrana PVDF o en solución.

La solución de digestión resultante que contienen los oligosacáridos liberados preparados directamente para el análisis EM MALDI/TOF o se digirió después con EndoH glicosidasa antes de la preparación de muestras para el análisis EM MALDI/TOF.

Para todos los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención, GE significa glicodiseñado.

Ejemplo 8

Unión a FcgRIIIa y competencia CCDA de moléculas XGFR1

Los anticuerpos humanizados de rata anti-EGFR no glucomodificados ICR62 (de WO 2006/082515) median su actividad anti-tumoral no sólo interfiriendo con las señales estimuladoras del crecimiento mediadas por RTK,

sino también en un grado significativo induciendo CCDA en las células tumorales. De forma similar, otros anticuerpos, como los anticuerpos anti-IGF-1R <IGF-1R> HUMAB Clon 18 son también capaces de inducir CCDA. El grado de mediación de
5 CCDA por un anticuerpo determinado depende no sólo del antígeno al que se une, sino también depende de las afinidades de las regiones constantes al FcgRIIIa, que se conoce como el receptor de Fc que dispara la reacción CCDA. Ya que CCDA es un mecanismo deseado para las moléculas
10 XGFR1, es importante que estas moléculas puedan unirse a FcgRIIIa de la misma manera que los anticuerpos "normales", y que estas moléculas posean una buena competencia CCDA. Para el análisis de unión de las diferentes moléculas de XGFR1 al bFcgRIIIa, se aplicó la tecnología Biacore que se
15 había establecido previamente (Referencias). Mediante esta tecnología, se analizó la unión de las moléculas XGFR1 a los dominios producidos de forma recombinante de FcgRIIIa.

Todas las medidas de resonancia de plasmón en superficie se realizaron en un instrumento BIAcore 3000 (GE
20 Healthcare Biosciences AB, Suecia) a 25°C. Los tampones de reacción y dilución fueron PBS (KH₂PO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 10mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7mM), pH 6,0, Tween20 0,005 % (v/v). El FcgRIIIa humano soluble se diluyó en acetato sódico 10 mM, pH 5,0 y se inmovilizó en un chip biosensor CM5 utilizando
25 el equipo de acoplamiento amina estándar (GE Healthcare Biosciences AB, Suecia) para obtener densidades en superficie de FcgRIIIa de aproximadamente 1000 RU. Se utilizó como tampón de reacción HBS-P (HEPES 10 mM, pH 7,4,

NaCl 150 mM, Surfactante P20 0,005%; GE Healthcare Biosciences AB, Suecia) durante la inmovilización. Los anticuerpos biespecíficos XGFR se diluyeron con PBS, Tween20 0,005%(v/v), pH 6,0 a una concentración de 450 nM y se inyectó durante 3 minutos en una tasa de flujo de 30µl/minuto. Después, el chip sensor se regeneró durante 1 minuto con PBS, pH 8,0, Tween20 0,005% (v/v). El análisis de datos se realizó con el programa BIAevaluation (BIAcore, Suecia).

Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 7.

Tabla 6 - Afinidades de unión de anticuerpos biespecíficos (nomenclatura XGFR) a FcγRIIIa y FcRn

Molécula	Afinidad a FcγRIIIa	Afinidad a FcRn
XGFR1-2321	sí	sí
XGFR1-2421	sí	sí
XGFR1-3321	sí	sí
XGFR1-3421	sí	sí
XGFR1-4321	sí	sí
XGFR1-4421	sí	sí
XGFR1-5321	sí	sí
XGFR1-5421	sí	sí
<EGFR> ICR62	sí	n.d
<IGF-1R> HUMAB-Clon 18	n.d.	n.d.

Estos análisis revelan que la unión de FcγRIIIa de las moléculas XGFR1 no unidas a antígeno es indistinguible de la unión de las moléculas de IgG1 salvajes. Así, estos

ensayos bioquímicos indican una competencia total de XGFR1-2421 no unido a antígeno, y XGFR1-4421 para unirse al receptor FcγRIIIa mediador de CCDA.

La repetición de estos experimentos utilizando 5 moléculas de XGFR1 en presencia de antígeno no reveló ningún efecto en la capacidad de unión a FcγRIIIa soluble.

Otro grupo de experimentos Biacore se realizó con moléculas XGFR1 que han sido glucomodificadas (véase Ejemplo 7) por una tecnología previamente descrita (Umana, 10 P., et al. Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y WO 99/54342). Esta glucomodificación aumenta la afinidad de las regiones Fc hacia el FcγRIIIa y por lo tanto aumenta CCDA en células diana. Una comparación de la capacidad de unirse a FcγRIIIa de las moléculas XGFR1 glucomodificadas 15 no unidas a antígeno con las IgG salvajes glucomodificadas no unidas a antígeno, mostró que las moléculas XGFR1 glucomodificadas no unidas a antígeno poseen un aumento de la afinidad de unión en comparación con el anticuerpo salvaje.

20 **Tabla 7** -Afinidades de unión de los anticuerpos biespecíficos (nomenclatura XGFR) a FcγRIIIa y FcRn

Molécula	Afinidad a FcγRIIIa	Afinidad a FcRn
XGFR1-2421-GE	sí	sí
XGFR1-3421-GE	sí	sí
XGFR1-4421-GE	sí	sí
XGFR1-5421-GE	sí	sí

Para analizar en qué grado la competencia de unión de las moléculas XGFR1 a FcγRIIIa se traduce también en la

actividad CCDA in-vitro hacia las células tumorales, se determinó la competencia CCDA en ensayos celulares. Para estos ensayos, los derivados glucomodificados de XGFR1-2421, XGFR1-3421, XGFR1-4421 y XGFR1-5421 (XGFR1-2421-GE, XGFR1-3421-GE, XGFR1-4421-GE y XGFR1-5421-GE) se prepararon (véase Ejemplo 6) y se analizaron en el formato de ensayo de competencia CCDA BIAcore, que se ha descrito previamente y también el ensayo CCDA in-vitro que se describe más adelante.

10 Las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) se utilizaron como células efectoras y se prepararon utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 USA) siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. En breve, se tomó la sangre venosa con jeringas heparinizadas de voluntarios sanos. La sangre se diluyó 1:0,75-1,3 con PBS (sin Ca^{++} ni Mg^{++}) y se extendió una capa en un Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 400 x g durante 30 min a temperatura ambiente (TA) sin pausa. La interfase que contiene las CMSP se 15 recogió y se lavó con PBS (50 ml por células de dos gradientes) y se recogieron por centrifugación a 300 x g durante 10 minutos a TA. Tras la resuspensión del botón con PBS, se contaron las CMSP y se lavaron una segunda vez por centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a TA. Las 20 células se resuspendieron entonces en el medio apropiado para los procedimientos posteriores.

La proporción de efector y diana utilizada para los ensayos CCDA fue de 25:1 para las CMSP. Las células

efectoras se prepararon en el medio AIM-V a la concentración apropiada para poder añadir 50 µl por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondeado. Las células diana eran células que expresan EGFR/IGFR humanas (por ejemplo, H322M, A549, o MCF-7) crecidas en DMEM que contienen FCS al 10%. Las células diana se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a 0,3 millones por ml para poder añadir 30000 células en 100 µl por micropocillo. Se diluyeron los anticuerpos en AIM-V, se añadieron en 50 µl de las células diana preplaqueadas y se dejaron unir a las dianas durante 10 minutos a TA. Después se añadieron las células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene CO2 al 5%. Se analizó la muerte de las células diana midiendo la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) de las células dañadas utilizando el equipo de Detección de citotoxicidad (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Tras la incubación de 4 horas, las placas se centrifugaron a 800 x g. Se transfirió 100 µl de sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa transparente de 96 pocillos de fondo plano. Se añadió 100 µl por pocillo de tampón de sustrato de color del equipo. Los valores de Vmax de la reacción de color se determinaron en un lector de ELISA a 490 nm durante al menos 10 min utilizando el programa SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). La liberación espontánea de LDH se midió de los pocillos que contienen solamente células diana y células efectoras pero no anticuerpos. La máxima liberación

se determinó de los pocillos que contienen solamente células diana y Triton X-100 1%. El porcentaje de muertes mediadas por anticuerpo específico se calculó como sigue:
 $((x - LE)/(ML - LE) * 100$, en la que x es la media de Vmax a una concentración de anticuerpo específica, LE es la media de Vmax de la liberación espontánea y ML es la media de la Vmax de la máxima liberación.

En estos ensayos, la competencia CCDA se comparó también con la de anticuerpos salvajes glucomodificados.
10 Los resultados de estos ensayos mostraron una excelente competencia de CCDA para los XGFR1-3421-GE/ XGFR1-4421-GE/ XGFR1-5421-GE glucomodificados (véase Figura 9).

Ejemplo 9

Expresión y Purificación de moléculas de anticuerpo 15 biespecífico <EGFR-IGF1R> scFab-XGFR1

Se construyeron las cadenas ligera y pesada de los correspondientes anticuerpos biespecíficos en vectores de expresión portadores de marcadores de selección procariotas y eucariotas. Estos plásmidos se amplificaron en E.coli, se
20 purificaron, y posteriormente se transfectaron para una expresión transitoria de proteínas recombinantes en células HEK293F (utilizando el sistema Freestyle de Invitrogen). Tras 7 días, los sobrenadantes de las células HEK 293 se recogieron y se purificaron mediante proteína A y
25 cromatografía de exclusión por tamaño. La homogeneidad de todas las construcciones de anticuerpo biespecífico se confirmó mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras. Bajo condiciones reductoras (Figura 15), las

cadenas de polipéptido portadoras de fusiones scFab en C- y N-terminal mostró tras el SDS-PAGE unos tamaños moleculares aparentes análogos a los pesos moleculares calculados. Los niveles de expresión de todas las construcciones se
5 analizaron mediante HPLC proteína A y fue similar a los rendimientos de expresión de IgG "estándar", o en algunos casos algo inferior. El rendimiento medio de proteína estuvo entre 1,5 y 10 mg de proteína purificada por litro de sobrenadante de cultivo celular en los experimentos de
10 expresión transitoria no optimizada (Figura 13 y 14).

El análisis por cromatografía HP de exclusión por tamaño de las proteínas purificadas mostró cierta tendencia a agregar en moléculas recombinantes. Para enfrentarse a los problemas de agregación de dichos anticuerpos
15 biespecíficos, se aplicó estabilización por disulfuros entre VH y VL de las porciones de unión adicionales. Por eso se introdujeron sustituciones únicas de cisteína en las VH y VL de los scFab en determinadas posiciones (posiciones VH44/VL100 de acuerdo con el esquema de numeración Kabat).
20 Estas mutaciones permiten la formación de disulfuros intercadena estables entre VH y VL, que a su vez estabilizan el módulo resultante de scFab estabilizado con disulfuros. La introducción de los VH44/VL100 disulfuros en scFab no interfiere significativamente con los niveles de
25 expresión de proteína y en algunos casos incluso rendimientos de expresión mejorados (véase Figuras 13 y 14).

Los anticuerpos biespecíficos se expresaron mediante

MB

transfección transitoria de células de riñón embrionario humano 293-F utilizando el sistema de Expresión FreeStyle™ 293 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA). Brevemente, se cultivaron las células 293-F en suspensión FreeStyle™ en medio de expresión FreeStyle™ 293 a 37°C/CO₂ 8 % y las células se sembraron en medio fresco a una densidad de 1-2x10⁶ células viables/ml el día de la transfección. Los complejos de DNA-293fectin™ se prepararon en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) utilizando 333 µl de 293fectin™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de DNA de plásmido de cadena pesada y ligera en una proporción molar 1:1 para un volumen de transfección final de 250 µl. Los sobrenadantes de cultivo celular que contienen derivados de anticuerpo recombinante se clarificaron 7 días tras la transfección mediante centrifugación a 14000 g durante 30 minutos y se filtraron a través de un filtro estéril (0,22 µm). Los sobrenadantes se almacenaron a -20° C hasta su purificación.

Los anticuerpos secretados se purificaron del sobrenadante en dos pasos mediante cromatografía de afinidad utilizando Proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de exclusión Superdex200 por tamaño. Brevemente, los sobrenadantes de los cultivos clarificados que contienen anticuerpos biespecíficos y triespecíficos se aplicaron en una columna HiTrap Proteína A HP (5 ml) equilibrada con tampón PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no unidas se eliminaron mediante lavados con tampón de

equilibrado. Los derivados de anticuerpo se eluyeron con
tampón citrato 0,1 M, pH 2,8, y las fracciones que
contienen proteína se neutralizaron con 0,1 ml Tris 1 M, pH
8,5. Después, las fracciones de proteína eluída se
5 juntaron, se concentraron con un Dispositivo de filtro por
centrifugación Amicon Ultra (MWCO: 30 K, Millipore) en un
volumen de 3 ml y se cargaron en una columna de filtración
en gel Superdex200 HiLoad 120 ml 16/60 (GE Healthcare,
Suecia) equilibrada con Histidina 20mM, NaCl 140 mM, pH
10 6,0. Las fracciones de anticuerpo monomérico se juntaron,
se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80°C. Parte
de las muestras se proporcionaron para un posterior
análisis de las proteínas y caracterización.

Un ejemplo de análisis por SDS-PAGE de proteínas
15 purificadas y perfiles de Cromatografía HP de exclusión por
tamaño (SEC) de derivados de anticuerpo biespecífico se
muestra en las Figuras 15 y 16.

Las Figuras 13 y 14 listan los rendimientos de
expresión que se observaron en los sistemas de expresión
20 transitorios: Todos los derivados de anticuerpos diseñados
pudieron expresarse y purificarse en cantidades suficientes
para un posterior análisis. El rendimiento de expresión por
litro de sobrenadante estuvo en el rango desde menos de 1
mg a > 30 mg. Por ejemplo, scFab-XGFR1-2720 tuvo un
25 rendimiento final tras la purificación de menos de 1 mg
mientras que scFab-XGFR1-2721 tuvo un rendimiento final de
13,8 mg. Esta diferencia muestra también la influencia
positiva de la estabilización de VH44-VL100 por disulfuros

en los rendimientos de expresión que se observó para algunas proteínas.

Ejemplo 10

Estabilidad de moléculas de anticuerpo biespecífico

5 <EGFR-IGF1R> scFab-XGFR1 in vitro

Estabilidad y tendencia de agregación de moléculas de anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF1R> scFab

Se realizó un análisis por cromatografía HP de exclusión por tamaño para determinar la cantidad de
10 agregados que están presentes en la preparación de los derivados de anticuerpo recombinante. Para ello, se analizaron muestras de anticuerpo biespecífico mediante SEC de alto rendimiento en un Sistema UltiMate 3000 HPLC (Dionex) utilizando una columna analítica de exclusión por
15 tamaño Superdex 200 (GE Healthcare, Suecia). La Figura 16 muestra un ejemplo de estos análisis. Los agregados aparecen como un pico separado o loma antes de las fracciones que contienen el derivado de anticuerpo monomérico. Para este trabajo, se definió moléculas
20 "monoméricas" deseadas las compuestas por 2 heterodímeros de cadenas ligera y pesada con scFab conectado a ambas. La integridad de la estructura de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada reducidas del anticuerpo biespecífico y las proteínas de fusión se verificaron mediante espectrometría
25 de masas por NanoElectropulverización Q-TOF tras eliminar los N-glicanos mediante tratamiento enzimático con Péptido-N-Glicosidasa F (Roche Molecular Biochemicals). El análisis por cromatografía HP de exclusión por tamaño de las

proteínas purificadas bajo diferentes condiciones (variando la concentración y el tiempo) mostró - en comparación con IgG normal - cierto aumento de la tendencia a agregar las moléculas que contienen scFab. Esta tendencia de agregación
5 que se observó para algunas moléculas puede aliviarse mediante la introducción de enlaces disulfuro VH44/VL100 intercadena en los módulos scFab.

Ejemplo 11

Unión de moléculas de anticuerpo biespecífico <EGFR- 10 IGF1R> scFab- a los RTK de EGFR e IGF1R

Se comparó la unión de los módulos de scFab y de los sitios de unión a antígeno de los retenidos en el módulo IgG IgG -de longitud completa de los diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos scFab-XGFR en la unión de las IgG
15 "salvajes" de los módulos de unión y anticuerpos biespecíficos de los que derivan. Estos análisis se llevaron a cabo aplicando Resonancia de plasmón en superficie (Biacore), así como un ELISA celular.

Las propiedades de unión de los anticuerpos
20 biespecíficos <IGF-1R-EGFR> se analizaron mediante resonancia de plasmón en superficie (SPR) utilizando un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala). Este sistema está bien establecido para el estudio de interacciones moleculares. Permite una
25 monitorización continua en tiempo real de unión de ligando/analito y así la determinación de las constantes de tasa de asociación (k_a), constantes de tasa de disociación (k_d), y constantes de equilibrio (KD) en varios ajustes de

ensayo. La tecnología SPR está basada en la medición del índice de refracción cerca de la superficie de un chip biosensor cubierto de oro. Los cambios en el índice de refracción indican cambios en la masa en la superficie
5 provocados por la interacción de ligando inmovilizado con analito inyectado en solución. Si las moléculas se unen al ligando inmovilizado en la superficie la masa aumenta, en el caso de disociación la masa disminuye.

Se inmovilizó anticuerpo de captura anti-IgG humana en
10 la superficie de un chip biosensor C1 utilizando química de acoplamiento a amina. El flujo de células se activó con una mezcla 1:1 de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida 0,1 M en una tasa de flujo de 5 µl/min. El anticuerpo anti-IgG humano se inyectó
15 en acetato sódico, pH 5,0 a 10 µg/ml, que resultó en una densidad de superficie de aproximadamente 200 RU. Un flujo de células de referencia control se trató de la misma manera pero solamente con tampones vehículo en lugar del anticuerpo de captura. Las superficies se bloquearon con
20 una inyección de etanolamina 1M /HCl pH 8,5. Los anticuerpos biespecíficos se diluyeron en HBS-P y se inyectaron a una tasa de flujo de 5 µl/min. El tiempo de contacto (fase de asociación) fue de 1 min para los anticuerpos a una concentración entre 1 y 5 nM. Se inyectó
25 EGFR-ECD a concentraciones incrementales de 1,2, 3,7, 11,1, 33,3, 100 y 300 nM, IGF-1R a concentraciones de 0,37, 1,11, 3,33, 10, 30 y 90 nM. El tiempo de contacto (fase de asociación) fue de 3 min, el tiempo de disociación (lavados

con tampón de reacción) 5 min para ambas moléculas en una tasa de flujo de 30 µl/min. Todas las interacciones se realizaron a 25°C (temperatura estándar). Las soluciones de regeneración de ácido fosfórico 0,85% e hidróxido sódico 5 mM se inyectaron cada uno durante 60 s a un flujo de 5 µl/min para eliminar cualquier proteína no unida de forma covalente tras cada ciclo de unión. Las señales se detectaron a una tasa de una señal por segundo. Las muestras se inyectaron a concentraciones incrementales.

10 Un ejemplo de unión simultánea de un anticuerpo biespecífico <IGF-1R-EGFR> a EGFR e IGF1R se muestra en la Figura 17a-d.

Tabla 8: Afinidades (KD) de anticuerpos biespecíficos (scFab-XGFR1_2720 y scFab-XGFR2_2720) a EGFR e IGF-1R

Molécula	valor KD (Afinidad a EGFR)	valor KD (Afinidad a IGF-1R)
scFab-XGFR1_2720	2 nM	2 nM
scFab-XGFR2_2720	0,5 nM	11 nM
<IGF-1R> Clon 18	n.a.	2 nM
<EGFR> ICR62	0,5 nM	n.a.

15 Los análisis de unión -y competición- basados en FACS en células cultivadas pueden también aplicarse para evaluar la capacidad de unión de los derivados de anticuerpos biespecíficos a RTK que están expuestos en las superficies celulares. La Figura 18 muestra el plan experimental que se
20 utilizó para analizar las capacidades de unión de scFab que contienen los derivados de anticuerpo biespecífico XGFR sobre células cancerígenas A549. Para estos ensayos de

competición celular, las células A549 que expresan los antígenos EGFR así como IGF1R se despegaron y se contaron. Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células por pocillo de una placa de 96 pocillos cónicos. Las células se centrifugaron (1500 rpm, 4°C, 5 min) y se incubaron durante 45 min en hielo en 50 μ L de una serie de dilución de los correspondientes anticuerpos biespecíficos en PBS con FCS 2% (suero fetal bovino) que contienen 1 μ g/mL de anticuerpo específico de IGF1R marcado con Alexa647. Las células de 5 centrifugaron de nuevo y se lavaron dos veces con 200 μ L de PBS que contiene FCS 2%. Finalmente, las células se resuspendieron en solución BD CellFix (BD Biosciences) y se incubaron durante al menos 10 min en hielo. La intensidad de fluorescencia media (mfi) de las células se determinó 10 mediante citometría de flujo (FACS Canto). Se determinó la mfi al menos por duplicado de dos tinciones independientes. El espectro de citometría de flujo se procesó posteriormente utilizando el programa FlowJo (TreeStar). La unión de la mitad máxima se determinó utilizando XLFit 4.0 15 (IDBS) y la dosis respuesta en modelo de un sitio 205.

Los resultados de estos ensayos que se muestran en la Figura 19a-c demuestran la funcionalidad de unión del scFab biespecífico que contienen los derivados de anticuerpo en las superficies de las células tumorales. Por ejemplo, la 25 CI50 en los experimentos de competición del derivado de anticuerpo biespecífico scFab-XGFR1_2721 fue de 0,11 μ g/ml mientras que la CI50 del anticuerpo monoespecífico fue más de un 50% superior (0,18 μ g/ml). Este incremento de

actividad en los ensayos de competición del derivado de scFab-XGFR_2721 biespecífico en comparación con el anticuerpo parental sugiere que la molécula biespecífica se une mejor a las superficies celulares que el anticuerpo
5 monoespecífico.

Ejemplo 12

Regulación negativa de EGFR así como IGF-1R mediante moléculas de anticuerpo biespecífico <EGFR-IGF-1R> scFab-XGFR

10 Los anticuerpos anti-IGF-1R humanos <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) inhiben la señalización de IGF1R y los anticuerpos anti-EGFR de rata humanizados <EGFR>ICR62 inhiben la señalización mediante EGFR. Para evaluar la actividad inhibidora potencial de las diferentes variantes
15 de scFab-XGFR1, se analizó el grado de regulación negativa del receptor de ambos.

Para poder detectar los efectos del anticuerpo de la invención en la cantidad de receptor de IGF-I (IGF-IR) en células tumorales, se realizaron experimentos de
20 seguimiento a lo largo del tiempo y posterior análisis ELISA con anticuerpos específicos de IGF-IR y EGFR.

Las células tumorales humanas (H322M, 5×10^5 células/ml) en RPMI 1640 suplementado con FCS 10% (PAA, N° de Cat. E15-039) y PenStrep A 1% en una placa de 6 pocillos
25 y se inoculó con 1 ml por pocillo. Se añadió 3 ml de medio a cada pocillo y las células se cultivaron durante 24 horas a 37°C y CO₂ al 5%.

El medio se retiró con cuidado y se sustituyó por 2ml

de anticuerpos XGFR 100 nM diluidos en Medio RPMI-VM. En los pocillos control, el medio se sustituyó por el medio y el tampón sin anticuerpo, y el medio con anticuerpos control (<IGF-1R> HUMAB Clon 18 y <EGFR>ICR62 concentración
5 final 100 nM). Las células se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% y las placas individuales se retiraron para un posterior procesamiento a las 24 horas.

El medio se retiró con cuidado por aspiración y las células se lavaron con 1ml PBS. Se añadió 300 µl/pocillo de
10 tampón de lisis MES frío ((MES, Na₃VO₄ 10 mM, e inhibidor de proteasa Complete®). Tras una hora las células se despegaron en hielo utilizando un rascador de células (Corning, N° de Cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se eliminaron
15 los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C.

Detección de EGFR

Las placas microtituladas de 96 pocillos con estreptavidina (PMT) se prepararon de acuerdo con el
20 protocolo (DuoSet ELISA para EGFR Humano, RnD systems N° de Cat. DY231). El anticuerpo de cabra anti-EGFR Humano 144 µg/ml en PBS se diluyó 1:180 en PBS y se añadió 100 µl/pocillo a la PMT. La PMT se incubó durante la noche a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron 3
25 veces con PBS suplementado con Tween®20 al 0,1% y se bloquearon con 300 µl/pocillo de PBS, solución de BSA al 3% y Tween®20 al 0,1% durante 1 hora (h) a temperatura ambiente (TA) con agitación. Las placas se lavaron 3 veces

con PBS suplementado con Tween®20 al 0,1%.

La cantidad de proteína en los lisados celulares se determinó utilizando el equipo BCA Protein Assay de (Pierce), los lisados celulares se ajustaron entonces a la
5 concentración de proteína de 0,04 mg/ml con tampón de lisis MES suplementado con Na₃VO₄ 100 mM 1:100 e inhibidor de proteasa Complete® 1:20 y 100 µl por pocillo del lisado se añadió a la PMT previamente preparada. Para la medición del ruido de fondo se añadió 100 µl de tampón de lisis al
10 pocillo en la PMT.

e utilizó una segunda concentración de lisado celular a 0,025 mg/ml el lisado se diluyó 1:2 y se añadieron 100 µl por pocillo a la PMT previamente preparada. La PMT se incubó durante otras 2 horas a TA con agitación y después
15 se lavaron 3 veces con PBS con una solución de Tween®20 al 0,1%.

El anticuerpo de detección para EGFR era un anticuerpo biotinilado de cabra anti-EGFR humano a una concentración de 36 µg/ml diluido 1:180 en PBS, BSA al 3% y Tween®20 al
20 0,2%. Se añadió 100 µl por pocillo y se incubó a TA durante 2 horas con agitación. La PMT se lavó después tres veces con 200 µl por pocillo de PBS con solución de Tween®20 al 0,1%. Se añadió entonces 100 µl por pocillo del anticuerpo secundario Estreptavidina-HRP 1:200 en PBS, BSA al 3% y
25 Tween®20 al 0,2% y se incubó con agitación durante 20 minutos a TA. La placa se lavó después seis veces con PBS con solución de Tween®20 al 0,1%. Se añadió 100 µl por pocillo de 3,3'-5,5'-Tetrametilbencidina (Roche, BM-Blue

ID-Nº: 11484581) y se incubó durante 20 minutos a TA con agitación. Se paró la reacción de color al añadir 25 µl por pocillo de H₂SO₄ 1M y se incubó durante otros 5 minutos a TA. La absorbancia se midió a 450nm.

5 Detección de IGF-1R

La PMT de estreptavidina (Roche ID. No.: 11965891001) se preparó añadiendo 100 µl por pocillo del anticuerpo AK1a-Biotinilado (Genmab, Dinamarca) que se diluyó 1:200 en PBS, BSA 3% y Tween®20 0,2%. La PMT de estreptavidina se
10 incubó durante 1 hora a TA con agitación y después se lavó tres veces con 200 µl por pocillo de PBS con una solución de Tween®20 al 0,1%.

La cantidad de proteína en los lisados celulares se determinó utilizando el equipo BCA Protein Assay de
15 (Pierce), los lisados celulares se ajustaron entonces a la concentración de proteína de 0,3 mg/ml con Tris 50mM pH 7,4, Na₃VO₄ 100 mM 1:100 e inhibidor de proteasa Complete® 1:20 y se añadió 100 µl por pocillo del lisado a la PMT de estreptavidina previamente preparada.

20 Se utilizó una segunda concentración de lisado celular a 0,15 mg/ml el lisado se diluyó y se añadió 100 µl por pocillo a la PMT de estreptavidina previamente preparada. Para la medición del ruido de fondo se añadió 100 µl de tampón de lisis al pocillo en la PMT de estreptavidina.

25 La PMT se incubó durante otra hora a TA con agitación y después se lavó 3 veces con PBS con una solución de Tween®20 al 0,1%.

El anticuerpo de detección para IGF-1R fue un

anticuerpo de conejo anti IGF-1R β humano (Santa Cruz Biotechnology, N° de Cat. sc-713) diluido 1:750 en PBS, BSA al 3% y Tween[®]20 al 0,2%. Se añadió 100 μ l por pocillo y se incubó a TA durante 1 hora con agitación. La PMT se lavó
5 después tres veces con 200 μ l por pocillo de PBS con una solución de Tween[®]20 al 0,1%. Se añadió después el anticuerpo secundario de conejo IgG-POD (Cell signaling N° de Cat. 7074) 1:4000 en PBS, BSA al 3% y Tween[®]20 al 0,2%, se añadió 100 μ l por pocillo y se incubó con agitación
10 durante 1 hora a TA. La placa se lavó después seis veces con PBS con una solución de Tween[®]20 al 0,1%. Se añadió 100 μ l por pocillo de 3,3'-5,5'-Tetrametilbencidina (Roche, BM-Blue ID-N°: 11484581) y se incubó durante 20 minutos a TA con agitación. Se paró la reacción de color al añadir 25 μ l
15 por pocillo de H₂SO₄ 1M y se incubó durante otros 5 minutos a TA. La absorbancia se midió a 450nm.

Los resultados de la detección de la regulación negativa del receptor por el scFab biespecífico que contienen las moléculas XGFR en comparación con los
20 anticuerpos monoespecíficos parentales <EGFR>ICR62 y <IGF-1R> HUMAB-Clon 18 en las células H322M se muestran en la Figuras 20 y 21. Los anticuerpos biespecíficos scFab-XGFR regulan negativamente ambos EGFR e IGF1R. Esto muestra que se retiene la funcionalidad completa (funcionalidad
25 biológica) y mediación del fenotipo de los módulos de unión. La Figura 21 también indica que, de forma sorprendente, los anticuerpos biespecíficos scFab-XGFR_2720 mostraron una regulación negativa de EGFR mejorada en

comparación con el anticuerpo parental <EGFR>ICR62 sólo.

El hecho de que cuando se aplican los scFab que contienen las variantes XGFR1 a los mismos ensayos a molaridades idénticas, mostraron la misma o mejor actividad que los anticuerpos salvajes, indica que las moléculas de scFab-XGFR1 son capaces de interferir con ambas vías de señalización.

Ejemplo 13

Inhibición del crecimiento mediado por scFab-XGFR1 y scFab-XGFR2 en líneas celulares tumorales in vitro

El anticuerpo anti-IGF-1R humano <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) inhibe el crecimiento en líneas celulares tumorales que expresan el IGF1R (WO 2005/005635). De forma similar, los anticuerpos de rata humanizados anti-EGFR <EGFR>ICR62 han mostrado inhibir el crecimiento en líneas celulares tumorales que expresan EGFR (WO 2006/082515). Para evaluar la actividad inhibidora potencial de las diferentes variantes de scFab-XGFR1 en los ensayos de crecimiento de líneas celulares tumorales, se analizó el grado de inhibición en células H322M que expresan EGFR así como IGF1R.

Las células H322M (5000 células/pocillo) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS 10% en placas cubiertas de poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) para prevenir la adherencia a la superficie de plástico. Bajo estas condiciones las células H322M forman esferoides densos que crecen tridimensionalmente (una propiedad que se denomina independencia de anclaje). Estos esferoides se

parecen mucho a la histoarquitectura tridimensional y organización de los tumores sólidos in-situ. Los cultivos de esferoides se incubaron durante 7 días en presencia de anticuerpos 100 nM. El ensayo de luminiscencia Celltiter
5 Glow se utilizó para medir la inhibición del crecimiento. Cuando los cultivos de esferoides H322M se trataron con <IGF-1R> HUMAB-Clon 18, pudo observarse una inhibición en el crecimiento.

La Figura 22 muestra que la aplicación de <IGF-1R>
10 HUMAB-Clon 18 100nM redujo el crecimiento celular en un 72%, y que la aplicación de <EGFR>ICR62 100nM redujo el crecimiento celular en un 77% de la misma forma.

La aplicación simultánea de ambos anticuerpos (en las mismas concentraciones de 100 nM) resultó en un descenso
15 completo de la viabilidad celular (inhibición del). Esto indica que la interferencia simultánea con ambas rutas de RTK tiene un efecto más profundo en las líneas celulares tumorales que la interferencia con tan solo una ruta. La aplicación de varias variantes de scFab-XGFR1 a una
20 concentración molar de 100nM resultó en una mayor inhibición del crecimiento que fue más pronunciada que la observada con sólo moléculas únicas. De hecho, a una concentración de anticuerpo de 100 nM, varias variantes de scFab-XGFR1 mostraron una inhibición completa (100%) del
25 crecimiento celular, mientras que la aplicación de módulos únicos provocó sólo una inhibición parcial.

Se concluye que las moléculas de scFab-XGFR1 poseen un profundo aumento de la actividad inhibidora del crecimiento

en comparación con las IgG que interfieren sólo con la señalización de EGFR o de IGF1R.

Ejemplo 14

Expresión y purificación de moléculas de anticuerpo

5 **Mab-mixto (VH/VL)** (intercambio de dominio VH/VL) o **Mab-mixto (CH/CL)** (intercambio de dominio CH/CL), con intercambio de dominios, bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R>

De forma análoga a los procedimientos descritos en el
10 Ejemplo 1 y 9, se expresaron y purificaron las moléculas de anticuerpo Mab-mixto (VH/VL) (intercambio de VH/VL como se describe en WO 2009/080252) y Mab-mixto (CH/CL) (intercambio de CH/CL como se describe en WO 2009/080253) con intercambio de dominios, bivalentes, biespecíficas
15 <EGFR-IGF1R>. Ambos anticuerpos biespecíficos <EGFR - IGF-1R> están basados en los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 8, y en los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 10 (derivados de <EGFR>ICR62 humanizados) como primer sitio de unión a
20 antígeno que se une a EGFR, y en los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 23, y en los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 25 (derivados de los anticuerpos anti-IGF-1R humanos <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587)) como segundo sitio de unión a
25 antígeno que se une a IGF-1R.

Los rendimientos de expresión tras la cromatografía de afinidad utilizando Proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200

fueron de 29,6 mg/L para el Mab-mixto (VH/VL) y 28,2 mg/L para el Mab-mixto (CH/CL).

Las secuencias de aminoácidos relevantes completas (parcialmente modificadas) de las cadenas ligera y pesada de los correspondientes anticuerpos biespecíficos, se proporcionan en Id. de Sec. N°: 30 -33 para el Mab-mixto (VH/VL) y en Id. de Sec. N°: 34 -37 para el Mab-mixto (CH/CL).

Ejemplo 15

10 Regulación negativa de EGFR así como IGF-1R mediante moléculas de anticuerpo Mab-mixto (VH/VL) o Mab-mixto (CH/CL) con intercambio de dominios, bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R>

De forma análoga al Ejemplo 12, se determinó la 15 regulación negativa de EGFR así como de IGF-1R sobre células tumorales H322M mediante moléculas de anticuerpo Mab-mixto (VH/VL) (intercambio de VH/VL) y Mab-mixto (CH/CL) (intercambio de CH/CL) con intercambio de dominios, bivalentes, biespecíficos <EGFR-IGF1R> del Ejemplo 14.

20 La regulación negativa de EGFR por ambos anticuerpos Mab-mixto (VH/VL) y Mab-mixto (CH/CL) con intercambio de dominios, bivalentes, biespecíficos <EGFR-IGF1R> fue similar (Mab-mixto (VH/VL) ca. 41%) o ligeramente superior (Mab-mixto (VH/VL) ca 49%) cuando se compara con la 25 regulación negativa de <EGFR>ICR62 monoespecífico (ca 41%; a 9,38 µg Proteína/ml).

La regulación negativa de IGF-1R por ambos anticuerpos Mab-mixto (VH/VL) y Mab-mixto (CH/CL) con intercambio de

dominios, bivalentes, biespecíficos <EGFR-IGF1R> fue sorprendentemente significativamente menor (Mab-mixto (VH/VL) ca 17%) (Mab-mixto (VH/VL) ca 20%) cuando se compara con la regulación negativa de <IGF-1R> HUMAB-Clon 18 monoespecífico (ca 85%; a 75 µg Proteína/ml).

Ejemplo 16

Inhibición del crecimiento tumoral en líneas de células tumorales H322M in vitro mediante moléculas de anticuerpo Mab-mixto (VH/VL) o Mab-mixto (CH/CL) con intercambio de dominios, bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R>

De forma análoga al Ejemplo Ejemplo 13, se determinó la inhibición del crecimiento tumoral en células tumorales H322M mediante moléculas de anticuerpo Mab-mixto (VH/VL) o Mab-mixto (CH/CL) con intercambio de dominios, bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R> del Ejemplo 14.

Los anticuerpos <IGF-1R> HUMAB-Clon 18 monoespecíficos a 100 nM, redujeron el crecimiento celular en un 75%, y la aplicación de <EGFR>ICR62 100nM redujo el crecimiento celular en un 89%.

La aplicación simultánea de ambos anticuerpos (ambos en las mismas concentraciones de 100 nM que resultó en una concentración total de anticuerpo de 200nM resultó en una disminución completa de viabilidad (inhibición ≥100%).

Las moléculas de anticuerpo Mab-mixto (VH/VL) o Mab-mixto (CH/CL) con intercambio de dominios, bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R> (a concentraciones de sólo 100 nM) mostraron también cada una de forma separada una

inhibición completa ($\geq 100\%$) del crecimiento celular.

Esto indica que un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención puede inhibir completamente el crecimiento de células tumorales a una concentración de anticuerpo inferior que la combinación de los correspondientes anticuerpos parentales monoespecíficos, mientras que los anticuerpos parentales monoespecíficos solos, sólo causan inhibición parcial.

Ejemplo 17

10 **Expresión y purificación de molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R> scFab-Fc**

De forma análoga a los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y 9, se expresó y purificó anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífico <EGFR-IGF1R> scFab-Fc. Este anticuerpo biespecífico <EGFR - IGF-1R> está basado también en los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 8, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 10 (derivados de <EGFR>ICR62 humanizados) como primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR, y en los dominios variables de la cadena pesada de Id. de Sec. N°: 23, y los dominios variables de la cadena ligera de Id. de Sec. N°: 25 (derivados de los anticuerpos anti-IGF-1R humano <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587)) como segundo sitio de unión a antígeno que se une a IGF-1R.

Los rendimientos de expresión tras la cromatografía de afinidad utilizando Proteína A-SepharoseTM (GE Healthcare,

Suecia) y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200 fueron de 29,7 mg/L para el scFab-Fc.

5 Tabla 10: Rendimiento de la molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R> scFab-Fc tras la expresión y purificación

Sobrenadante	Proteína A		SEC	
	Rendimiento	Mono.	Rendimiento	Mono.
1,0 L	32,5 mg	88 %	29,7 mg	100 %

Las secuencias de aminoácidos relevantes completas (modificadas) de las cadenas pesadas del anticuerpo biespecífico scFab-Fc se proporcionan en Id. de Sec. N°: 38 -39

10 **Ejemplo 18**

Expresión y purificación de moléculas de anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>

De forma análoga al Ejemplo 12, se determinó la regulación negativa de EGFR así como de IGF-1R en células tumorales H322M provocada por anticuerpos de fusión ScFab-Fc bivalentes, biespecíficos <EGFR-IGF1R> del Ejemplo 17.

Ejemplo 19

20 **Inhibición del crecimiento tumoral en líneas celulares tumorales in vitro mediante moléculas de anticuerpo de fusión ScFab-Fc bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>**

De forma análoga al Ejemplo 13, se determinó la inhibición del crecimiento tumoral en células tumorales H322M mediante anticuerpos de fusión ScFab-Fc bivalentes, biespecíficos <EGFR-IGF1R> del Ejemplo 17.

Ejemplo 20

Análisis de supervivencia en el modelo de xenoinjerto ortotópico de A549

Cultivo celular

5 Las células de adenocarcinoma A549 (NSCLC) se obtuvieron originalmente del ATCC y tras su expansión se depositaron en un banco de células interno. La línea celular tumoral se cultivó de forma rutinaria en medio DMEM (GIBCO, Suiza) suplementado con suero fetal bovino al 10 %
10 (Invitrogen, Suiza) y L-glutamina 2 mM (GIBCO, Suiza) a 37 °C en una atmósfera saturada con agua y CO2 5 %. Los pases de cultivo se realizaron con tripsina/ EDTA 1x (GIBCO, Suiza) dividiendo cada tres días. El pase 10 se utilizó para las inyecciones.

15 Animales

Los ratones SCID beige hembra; de 8-9 semanas al inicio del experimento (compradas a Charles River, Sulzfeld, Alemania) se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h
20 luz/12 h oscuridad, de acuerdo con las guías consensuadas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo del estudio experimental se revisó y se aprobó por el gobierno local (P 2005086). Tras la llegada de los animales se mantuvieron una semana para que se acostumbraran al nuevo ambiente y
25 para su observación. Se llevó a cabo una monitorización continua de su salud de forma regular.

Inyección de las células tumorales

El día de la inyección, las células tumorales A549 se

recogieron utilizando tripsina-EDTA (Gibco, Suiza) de los
frascos de cultivo (Greiner Bio-One) y se transfirieron a
50 ml de medio de cultivo, se lavaron una vez y se
resuspendieron en AIM V (Gibco, Suiza). Tras un lavado
5 adicional con AIM V, la concentración celular se determinó
utilizando un contador de células. Para la inyección de
células A549, la titulación final se ajustó a $5,0 \times 10^6$
células/ml. Posteriormente se inyectó 200 µl de esta mezcla
en la vena lateral de la cola de los ratones utilizando una
10 jeringa de tuberculina de 1,0 ml (BD Biosciences,
Alemania)).

Tratamiento

El tratamiento de los animales se inició dos semanas
después de la inoculación de las células tumorales con 10
15 animales por grupo. Los anticuerpos anti-EGFR/anti-IGF1R
bienespecíficos XGFR1-4421 GE, XGFR1-2421 GE, XGFR1-3421 GE,
<EGFR>ICR62 GE, <IGF-1R> HUMAB-Clon 18, y los
correspondientes vehículos se administraron por vía i.v.
una vez a la semana en la dosis indicada. Una dosis mensual
20 se administró hasta el final del experimento. Las
diluciones de anticuerpo se prepararon al momento antes de
su uso a partir de soluciones de reserva.

Tabla 11: Diseño del estudio del análisis de
supervivencia en el modelo de xenoinjerto ortotópico de
25 A549

Grupo	Nº de	Compuesto	Dosis	Ruta/Modo de	Nº de
-------	-------	-----------	-------	--------------	-------

	anima- les		mg/kg	adminis- tración	tratamie ntos
1	10	Vehículo (+ 2 reconocimientos)	-	i.v.	3
2	10	<EGFR>ICR62 GE y <IGF-1R> HUMAB-Clon 18	10 mg/kg + 10 mg/kg	i.v.	3
3	10	XGFR1-4421 GE	13,6 mg/kg	i.v.	3
4	10	XGFR1-2421 GE	13,6 mg/kg	i.v.	3
5	10	XGFR1-3421 GE	13,6 mg/kg	i.v.	3
6	6	<EGFR>ICR62 GE	25 mg/kg	i.v.	3

GE = glicodiseñado

Monitorización

Los animales se controlaron diariamente para la detección de síntomas clínicos y efectos adversos como, distrés respiratorio, movilidad reducida y pelaje desaliñado. Los criterios de exclusión del estudio para los animales se describen y se aprobaron en la correspondiente licencia de proyecto.

Identificación / preparación

Los ratones se distribuyeron aleatoriamente para su preparación. Los animales se acomodaron en jaulas de tamaño M3.

Autopsia

Los ratones se sacrificaron de acuerdo con los

criterios de finalización (pelaje desaliñado, espalda arqueada, reducción de la locomoción). Para todos los animales, se recogieron los tumores pulmonares para su posterior análisis histopatológico (PFA, congelado).

5 **Análisis de supervivencia**

Los datos de supervivencia que contienen los tiempos de duración hasta que sucede un evento específico y se refieren a veces como datos de tiempo hasta que ocurre el evento. El evento puede ser por ejemplo la muerte de un
10 paciente. Si no sucede el evento antes de finalizar un estudio para una observación o cuando un sujeto del estudio abandona el estudio antes de que ocurra el evento, la observación se debe censurar. Entonces se desconoce el tiempo de supervivencia exacto, pero se sabe que es mayor
15 que el valor especificado.

Los datos de supervivencia necesitan analizarse con métodos especializados, debido a que poseen distribuciones no normales especializadas, como la exponencial o Weibull. Además, las observaciones censuradas no pueden ignorarse
20 sin desviarse del análisis.

Las curvas de Kaplan-Meier proporcionan una estimación de las funciones de supervivencia para uno o más grupos de datos censurados a la derecha.

Tabla 12: Cuantiles -Resumen de la mediana de la
25 supervivencia

Grupo	Mediana del tiempo de supervivencia
-------	-------------------------------------

Vehículo	68
<EGFR>ICR62 GE	136
<EGFR>ICR62 GE y <IGF-1R> HUMAB-Clon 18	207
XGFR1-4421 GE	212
XGFR1-2421 GE	207
XGFR1-3421 GE	212

GE = glicodiseñado

La Tabla de cuantiles muestra la mediana del tiempo de supervivencia. De la Tabla Y se extrae que la mediana del tiempo de supervivencia en días del tratamiento con anticuerpos <EGFR-IGF1R> biespecíficos XGFR1-4421 GE, XGFR1-2421 GE, XGFR1-3421 GE es mayor cuando se compara con el tratamiento con <EGFR>ICR62 GE monoespecífico, y es mayor o al menos el mismo cuando se compara con el tratamiento con la combinación de <EGFR>ICR62 GE y <IGF-1R> HUMAB-Clon 18

Ejemplo 21

Expresión y Purificación, propiedades in Vitro e in Vivo de moléculas de anticuerpos de fusión ScFab-Fc bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R> N-scFabSS-salt-bridge-s3 y N-scFabSS-salt-bridge-w3C

Las moléculas de anticuerpos de fusión ScFab-Fc bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R> N-scFabSS-salt-bridge-s3 y N-scFabSS-salt-bridge-w3C son expresadas y purificadas de manera analoga a los procedimientos descritos en los Ejemplos 17, 1 y 9. Estos anticuerpos biespecíficos <EGFR-IGF-1R> tambien se basan en los

dominios variables de cadena pesada de Id. de Sec. N°:8, y los dominios variables de cadena ligera de Id. de Sec. N°:10 (derivadas de <EGFR>ICR62 humanizado) como primer sitio de union al antígeno uniéndose a EGFR, y en los dominios
5 variables de cadena pesada de Id. de Sec. N°:23, y los dominios variables de cadena ligera de Id. de Sec. N°:25 (derivados de los anticuerpos anti-IGF-1R humano <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587)) como segundo sitio de union al antígeno uniéndose a IGF-1R.

10 Las secuencias de aminoácidos relevantes completas (modificadas) de las cadenas pesadas de las moléculas de anticuerpos biespecíficas de N-scFabSS-salt-bridge-s3 son las Id. de Sec. N°:40-41 y de N-scFabSS-salt-bridge-w3C son las Id. de Sec. N°:42-43.

15 Los rendimientos de expresión, pureza, propiedades in Vitro e in Vivo de las moléculas de anticuerpos de fusión ScFab-Fc bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R> N-scFabSS-salt-bridge-s3 y N-scFabSS-salt-bridge-w3C son determinadas de acuerdo con los ejemplos descritos anteriormente.

20

Ejemplo 22

**Expresión y Purificación, propiedades in Vitro e in Vivo de moléculas de anticuerpos de fusión ScFab-IgG trivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R> KiH-C-scFab-1 y
25 KiH-C-scFab-2.**

Las moléculas de anticuerpos de fusión ScFab-IgG trivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R> KiH-C-scFab-1 y KiH-C-scFab-2 (fusión de un scFab específico para IGF1R a

un C-terminal de solo una cadena pesada de un anticuerpo específico EGFR de longitud completa (o viceversa) bajo el uso de la tecnología "boton en ojal") son expresadas y purificadas de manera analoga a los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 9, 17.

Estos anticuerpos biespecificos <EGFR-IGF-1R> tambien se basan en los dominios variables de cadena pesada de Id. de Sec. N°:8, y los dominios variables de cadena ligera de Id. de Sec. N°: 10 (derivadas de <EGFR>ICR62 humanizado) como primer sitio de union al antígeno uniendose a EGFR, y en los dominios variables de cadena pesada de Id. de Sec. N°:23, y los dominios variables de cadena ligera de Id. de Sec. N°:25 (derivados de los anticuerpos anti-IGF-1R humanos <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587)) como segundo sitio de union al antígeno uniendose a IGF-1R.

Las secuencias de aminoácidos relevantes completas (modificadas) de las cadenas pesadas y ligeras de las moleculas de anticuerpos biespecificas de N-scFabSS son las Id. de Sec. N°:44-46 y de N-scFabSS-salt-bridge-s3 son las Id. de Sec. N°:47-49.

Los rendimientos de expresión, pureza, propiedades in Vitro e in Vivo de las moleculas de anticuerpos de fusión ScFab-Fc bivalentes, biespecíficas <EGFR-IGF1R> N-scFabSS, N-scFabSS-salt-bridge-s3 y N-scFabSS-salt-bridge-w3C son determinadas de acuerdo con los ejemplos descritos anteriormente.

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo biespecífico que se une a EGFR e IGF-1R que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a EGFR y un segundo sitio de unión a antígeno
5 que se une a IGF-1R, que se caracteriza en que

i) dichos sitios de unión a antígeno son cada uno un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo;

ii) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende
10 en el dominio variable de la cadena pesada una región CD3 de Id. de Sec. N°: 1, una región CD2 de Id. de Sec. N°: 2, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:3, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CD3 de Id. de Sec. N°: 4, una región CD2 de Id. de Sec. N°:5, y una región CD1
15 de Id. de Sec. N°:6; y

iii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CD3 de Id. de Sec. N°: 11, una región CD2 de Id. de Sec. N°: 12, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:13, y en el
20 dominio variable de la cadena ligera una región CD3 de Id. de Sec. N°: 14, una región CD2 de Id. de Sec. N°:15, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:16;

o dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CD3 de
25 Id. de Sec. N°: 17, una región CD2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:19, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CD3 de Id. de Sec. N°: 20, una región CD2 de Id. de Sec. N°:21, y una región

CD1 de Id. de Sec. N°:22.

2. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza en que

i) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende
5 en el dominio variable de la cadena pesada una región CD3 de Id. de Sec. N°: 1, una región CD2 de Id. de Sec. N°: 2, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:3, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CD3 de Id. de Sec. N°: 4, una región CD2 de Id. de Sec. N°:5, y una región CD1
10 de Id. de Sec. N°:6; y

ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CD3 de Id. de Sec. N°: 11, una región CD2 de Id. de Sec. N°: 12, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:13, y en el dominio
15 variable de la cadena ligera una región CD3 de Id. de Sec. N°: 14, una región CD2 de Id. de Sec. N°:15, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:16.

3. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza en que

20 i) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CD3 de Id. de Sec. N°: 1, una región CD2 de Id. de Sec. N°: 2, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:3, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CD3 de Id. de Sec. N°: 4, una región CD2 de Id. de Sec. N°:5, y una región CD1
25 de Id. de Sec. N°:6; y

ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende en el dominio variable de la cadena pesada una región CD3

de Id. de Sec. N°: 17, una región CD2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CD1 de Id. de Sec. N°:19, y en el dominio variable de la cadena ligera una región CD3 de Id. de Sec. N°: 20, una región CD2 de Id. de Sec. N°:21, y una región
5 CD1 de Id. de Sec. N°:22.

4. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza en que

i) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec.
10 N°: 7 o el Id. de Sec. N°: 8, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°: 9 o el Id. de Sec. N°: 10

ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°: 23 o el Id. de Sec. N°: 24, y como dominio
15 variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°: 25 o el Id. de Sec. N°: 26.

5. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza en que

i) dicho primer sitio de unión a antígeno comprende
20 como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec. N°: 8, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°: 10,

ii) dicho segundo sitio de unión a antígeno comprende como dominio variable de la cadena pesada el Id. de Sec.
25 N°: 23, y como dominio variable de la cadena ligera el Id. de Sec. N°: 25.

6. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se

caracteriza en que dicho anticuerpo es bivalente, trivalente o tetravalente.

7. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se
5 caracteriza en que dicho anticuerpo está glucosilado con una cadena de azúcar en la Asn297 mientras que la cantidad de fucosa dentro de dicha cadena de azúcar es del 65 % o inferior.

8. Una composición farmacéutica que comprende un
10 anticuerpo biespecífico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7.

9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para el tratamiento del cáncer.

10. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con
15 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el tratamiento del cáncer.

11. El uso de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

20 12. Un método de tratamiento de pacientes que padecen cáncer mediante la administración de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 a un paciente que necesita dicho tratamiento.

Fig. 1

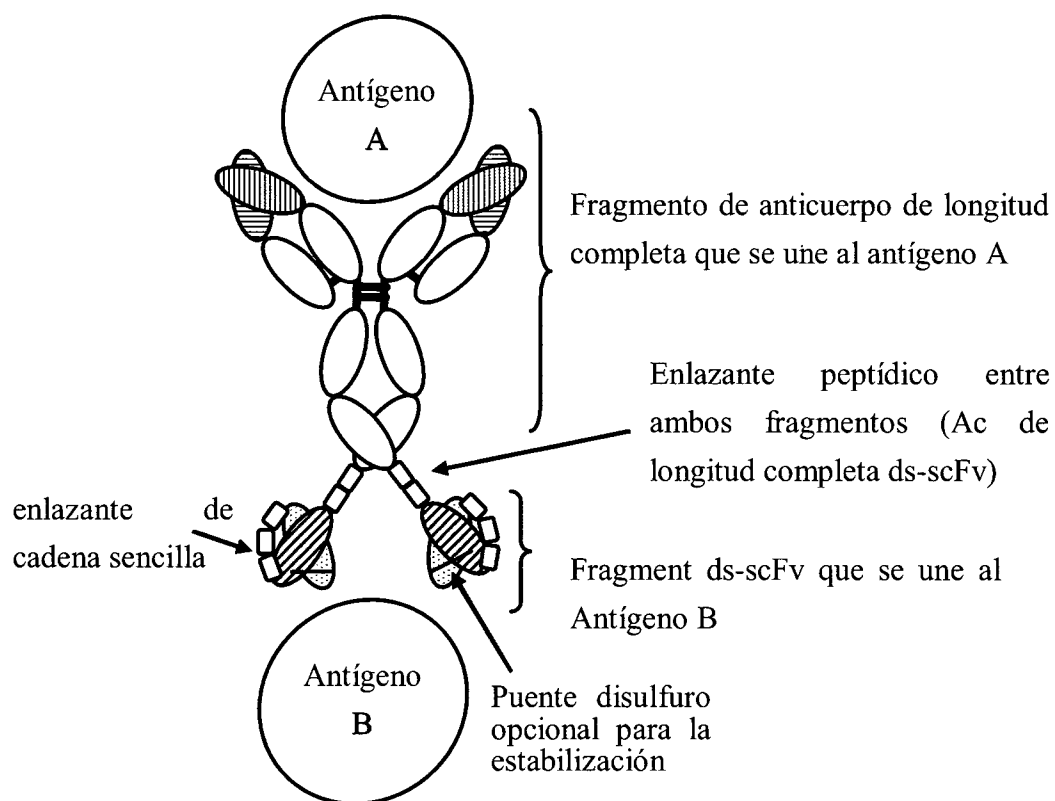


Fig. 2

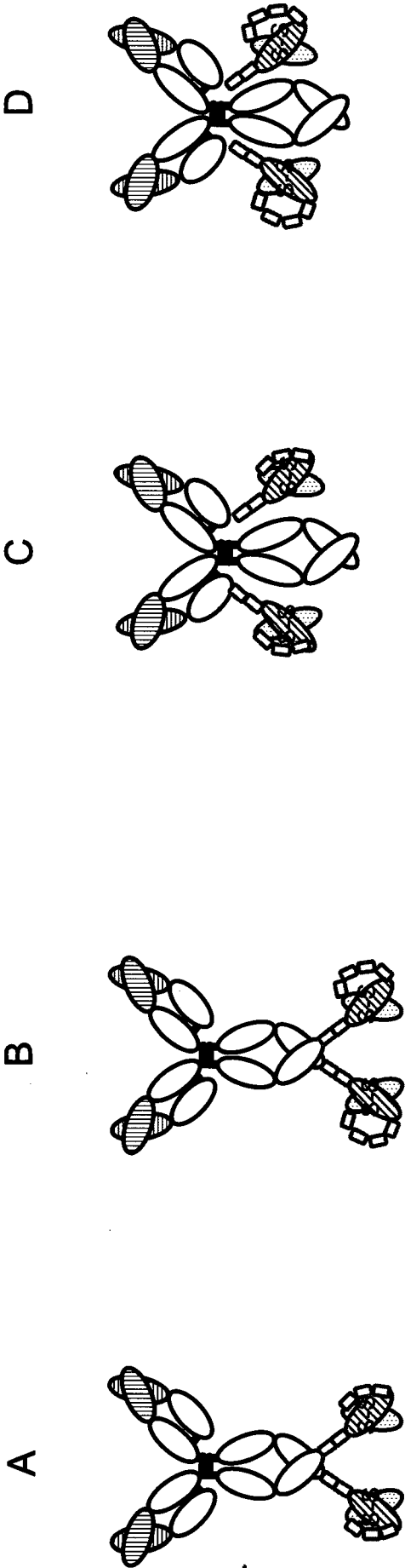


Fig. 3

a)

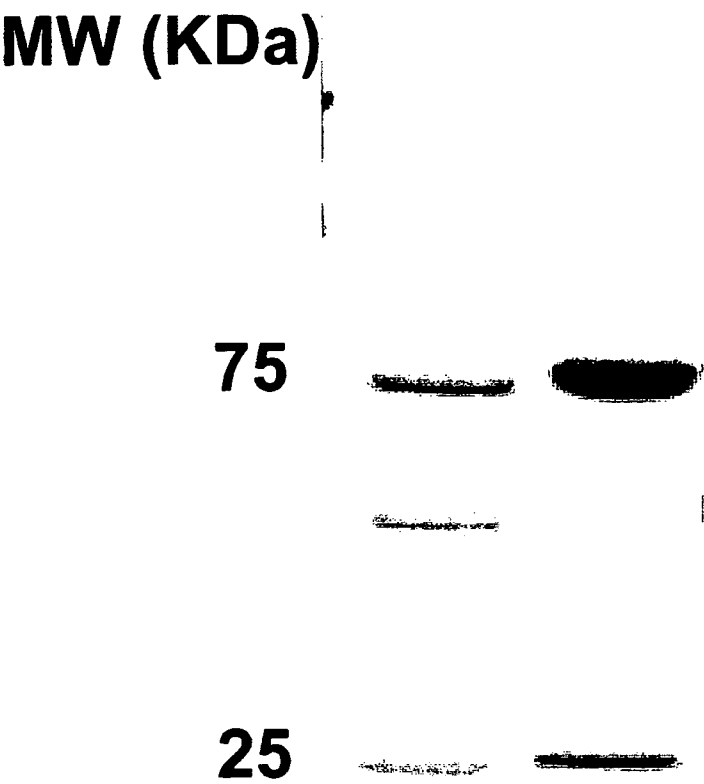


Fig. 3

b)

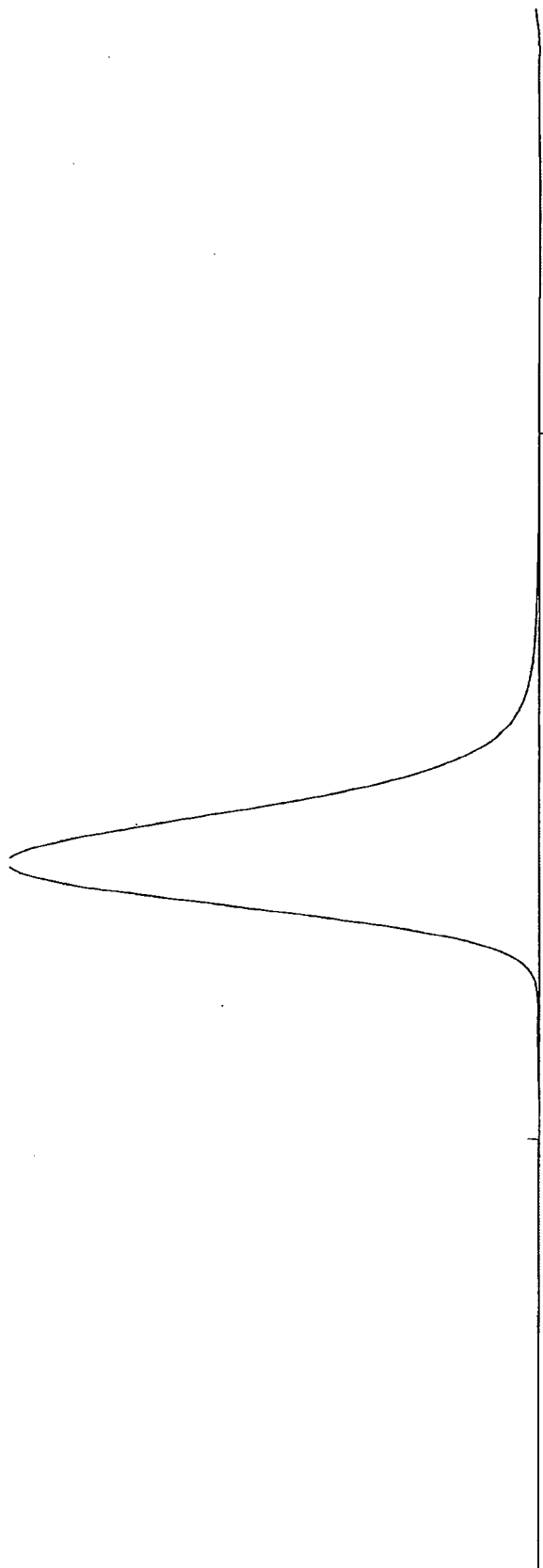


Fig. 3

c)

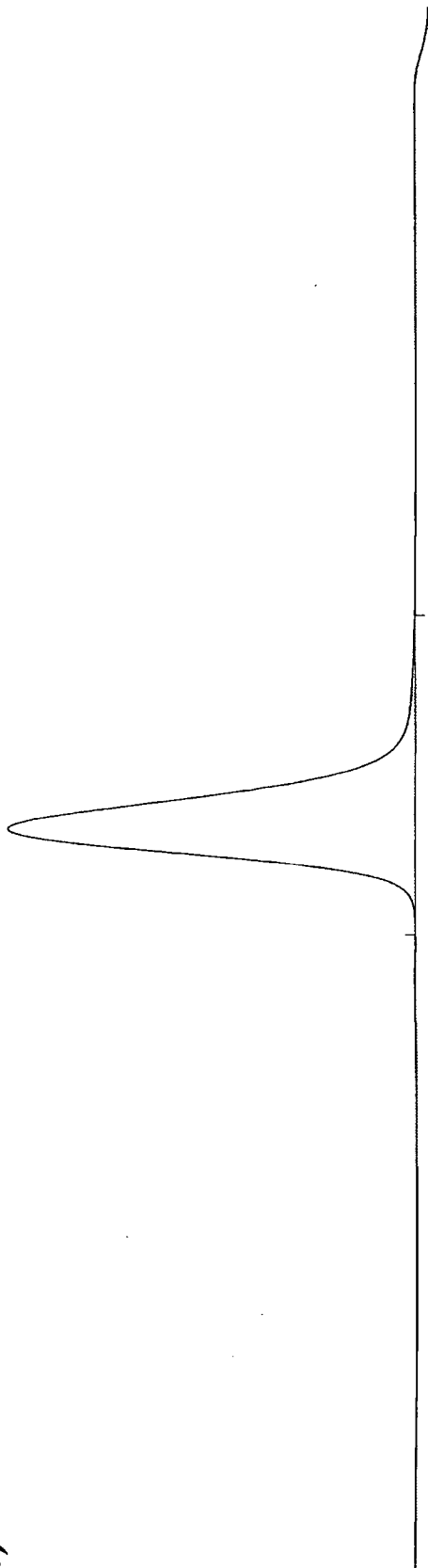


Fig. 4

a)

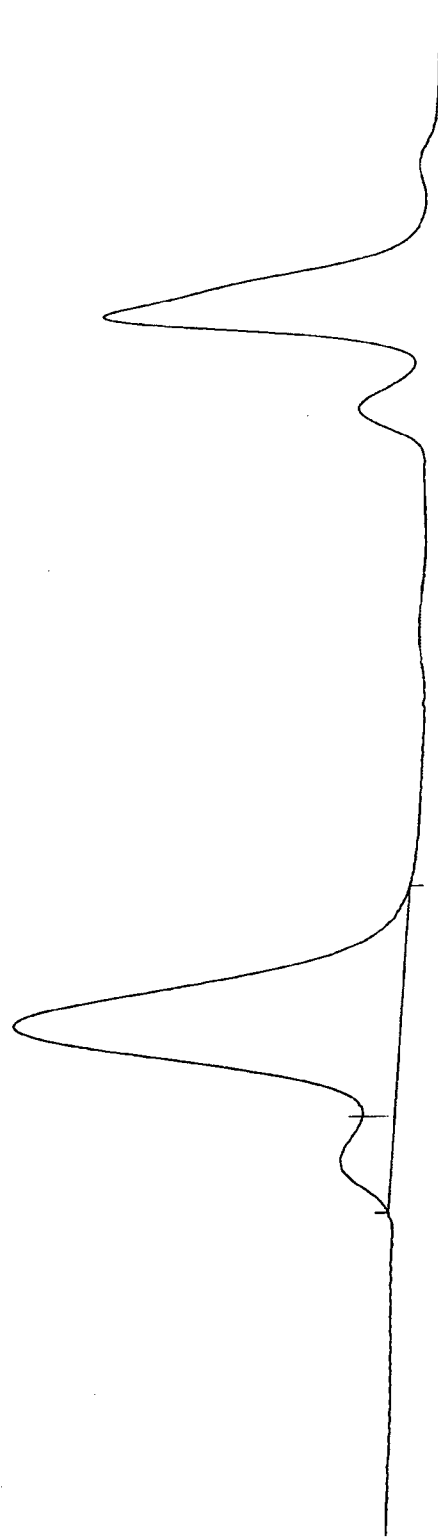


Fig. 4

b)

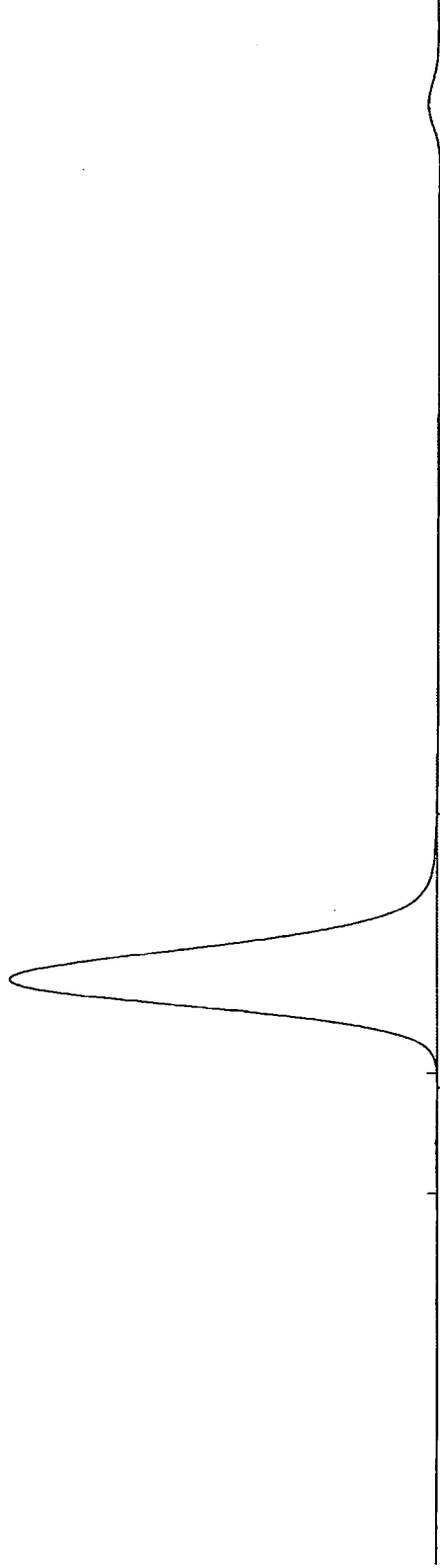


Fig. 5

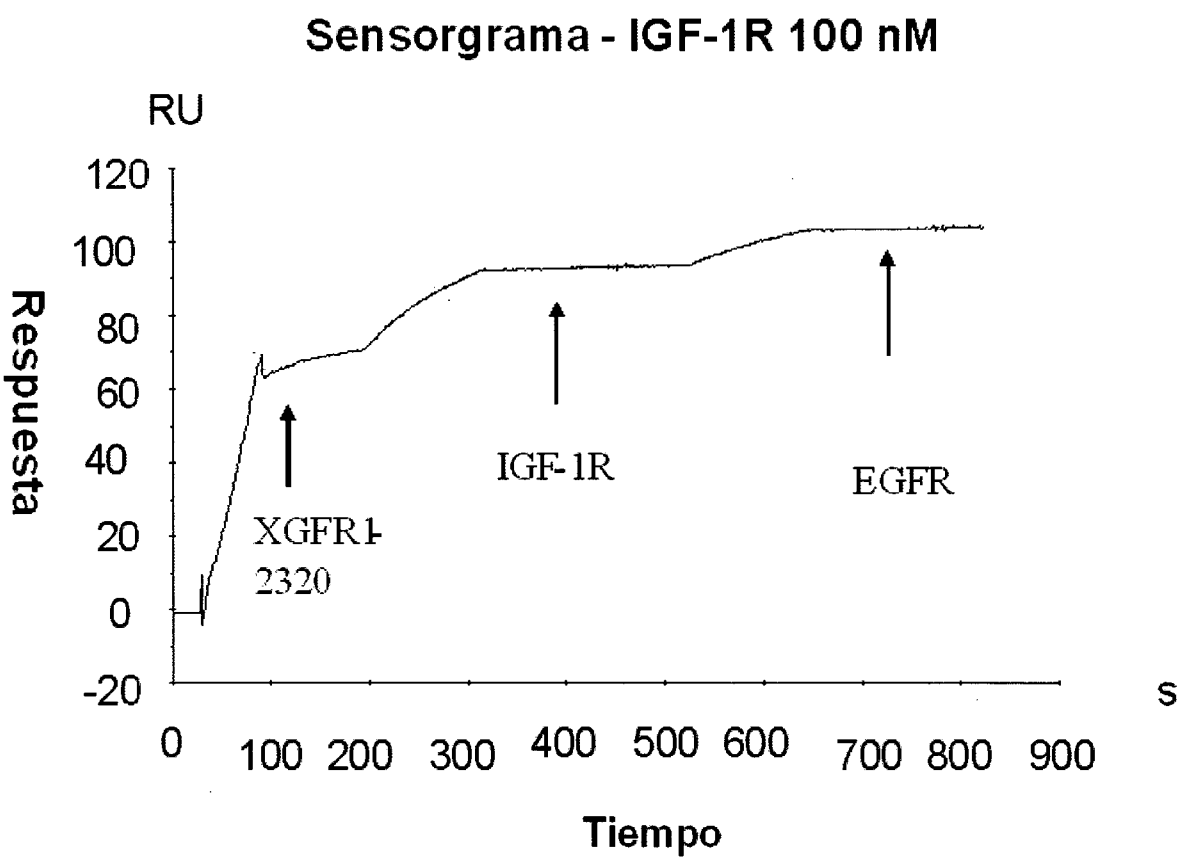
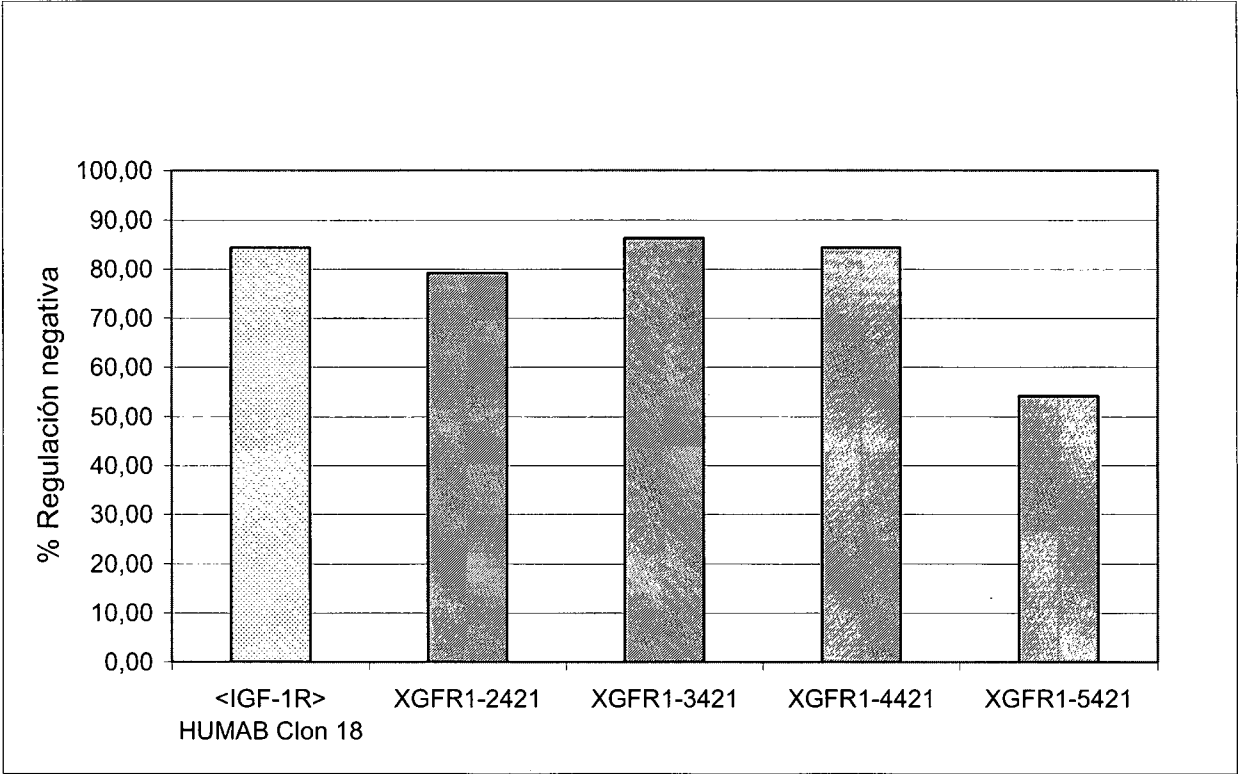
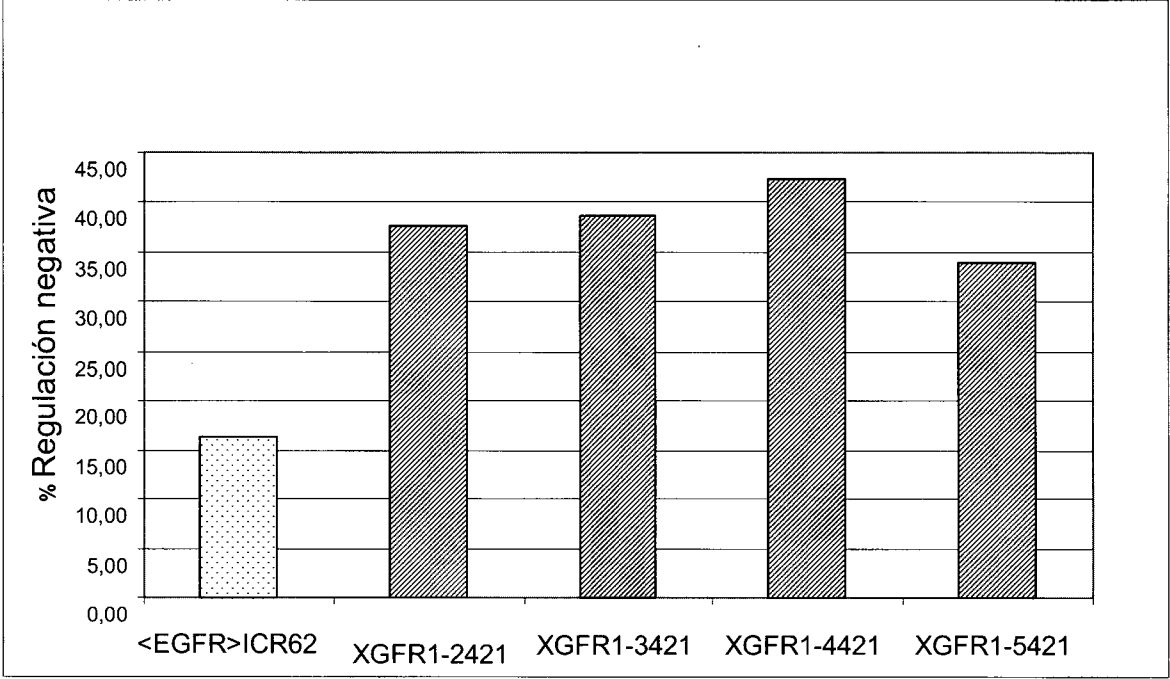


Fig. 6

a)



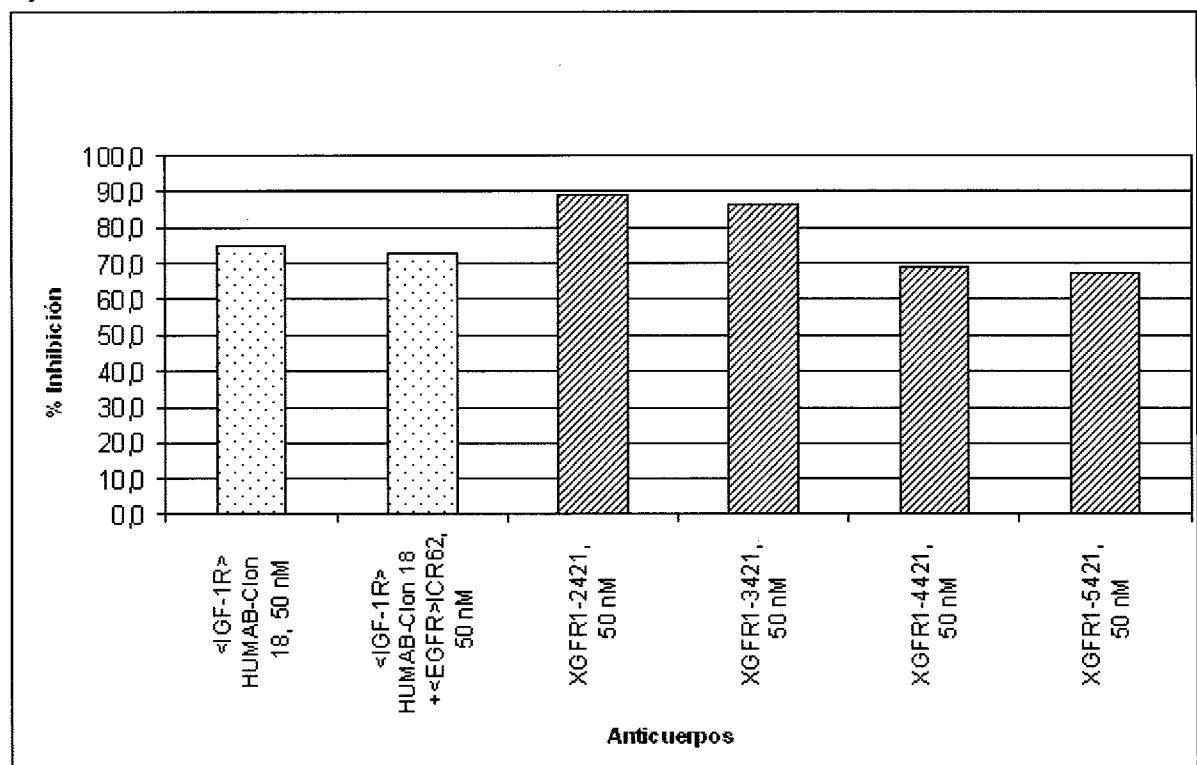
b)



197

Fig. 7

a)



b)

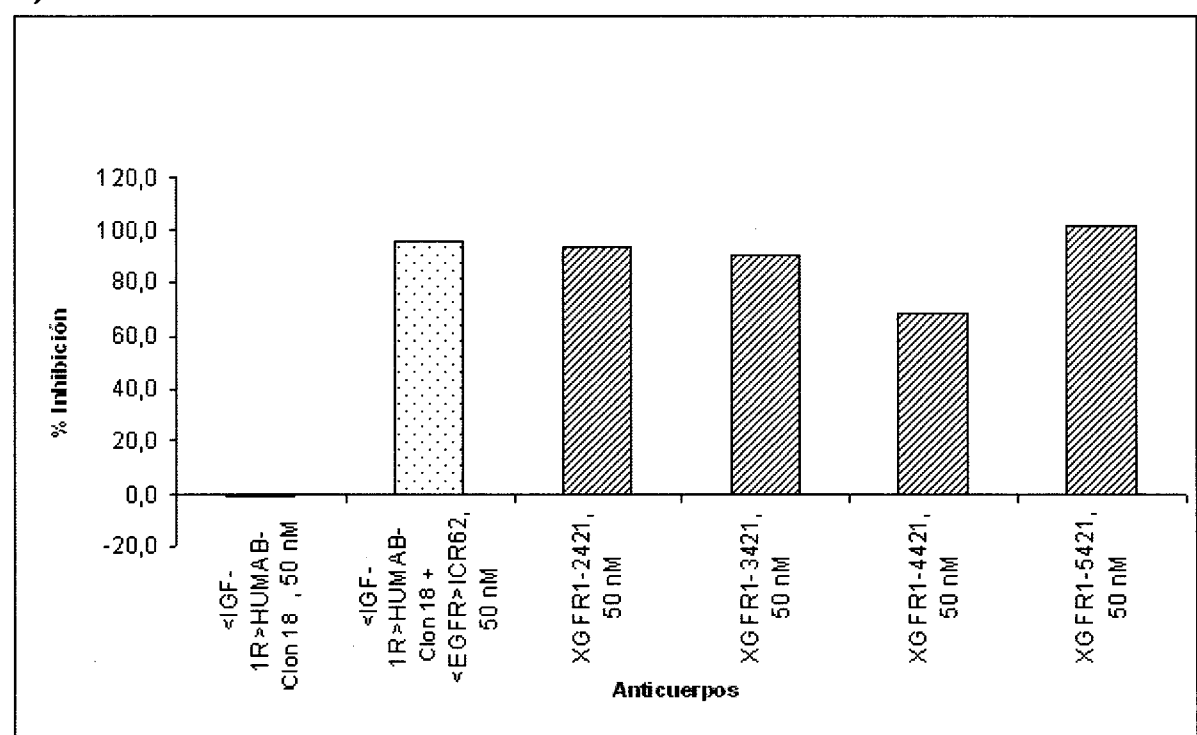
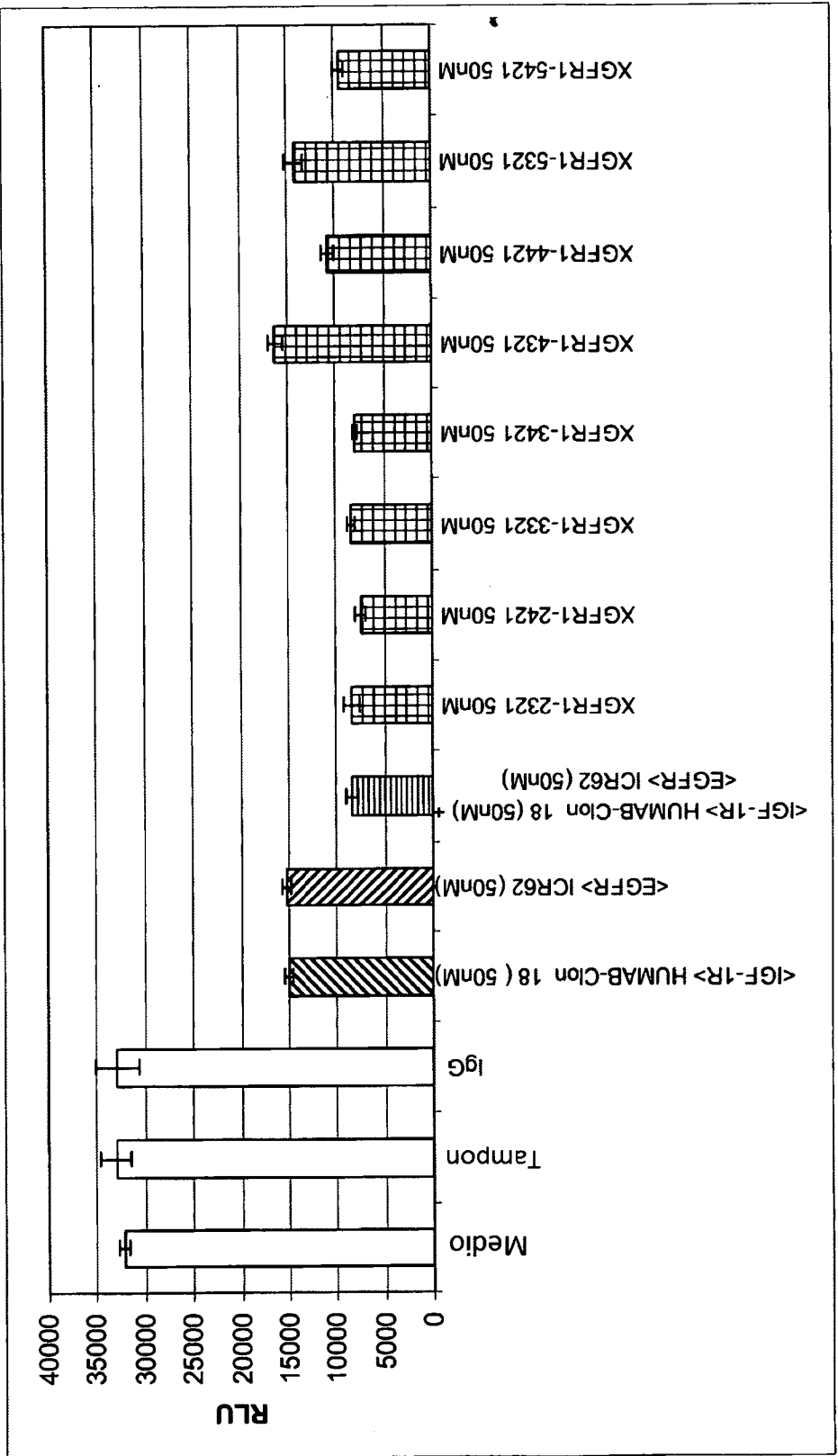


Fig. 8



199

Fig. 9

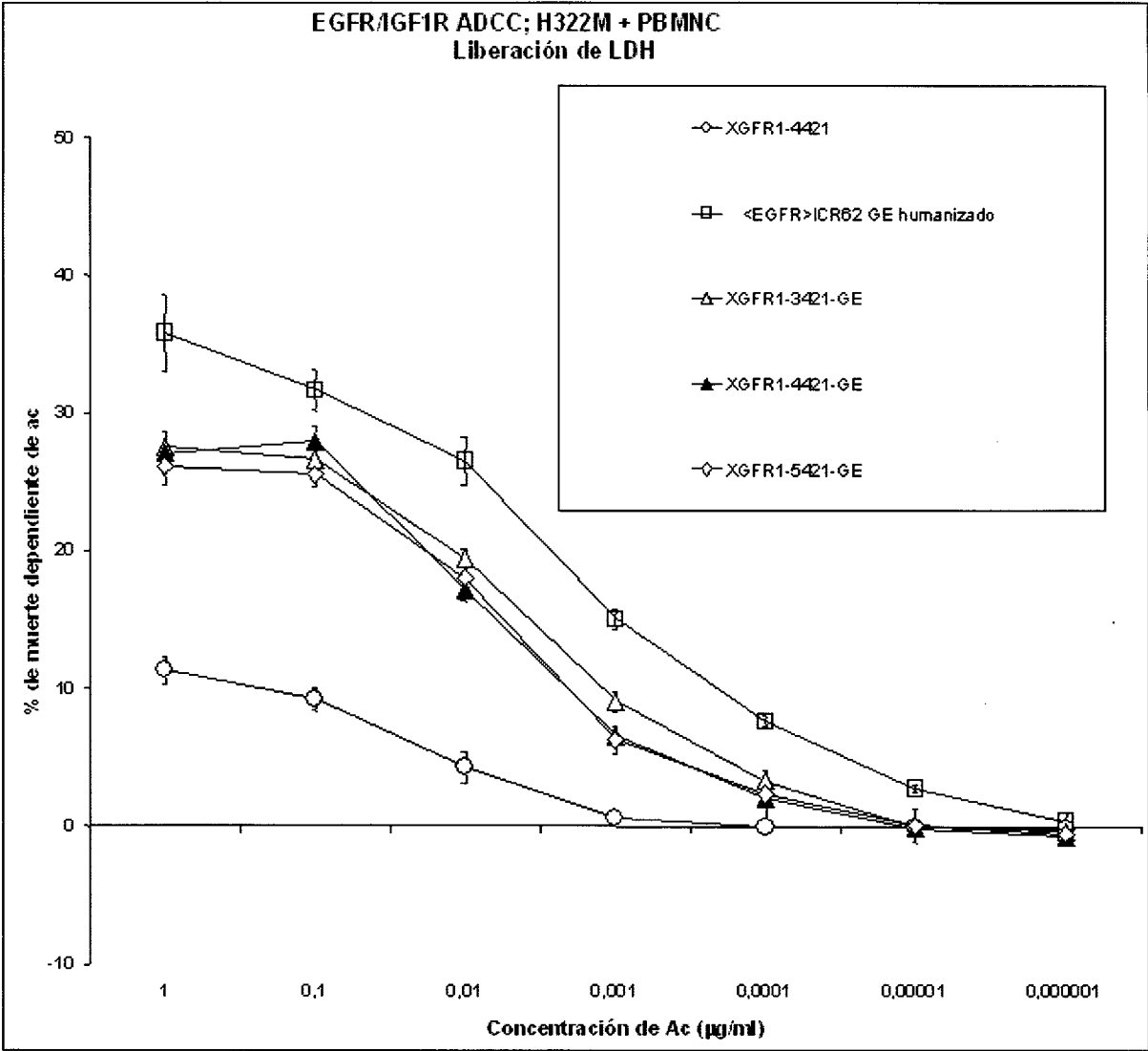
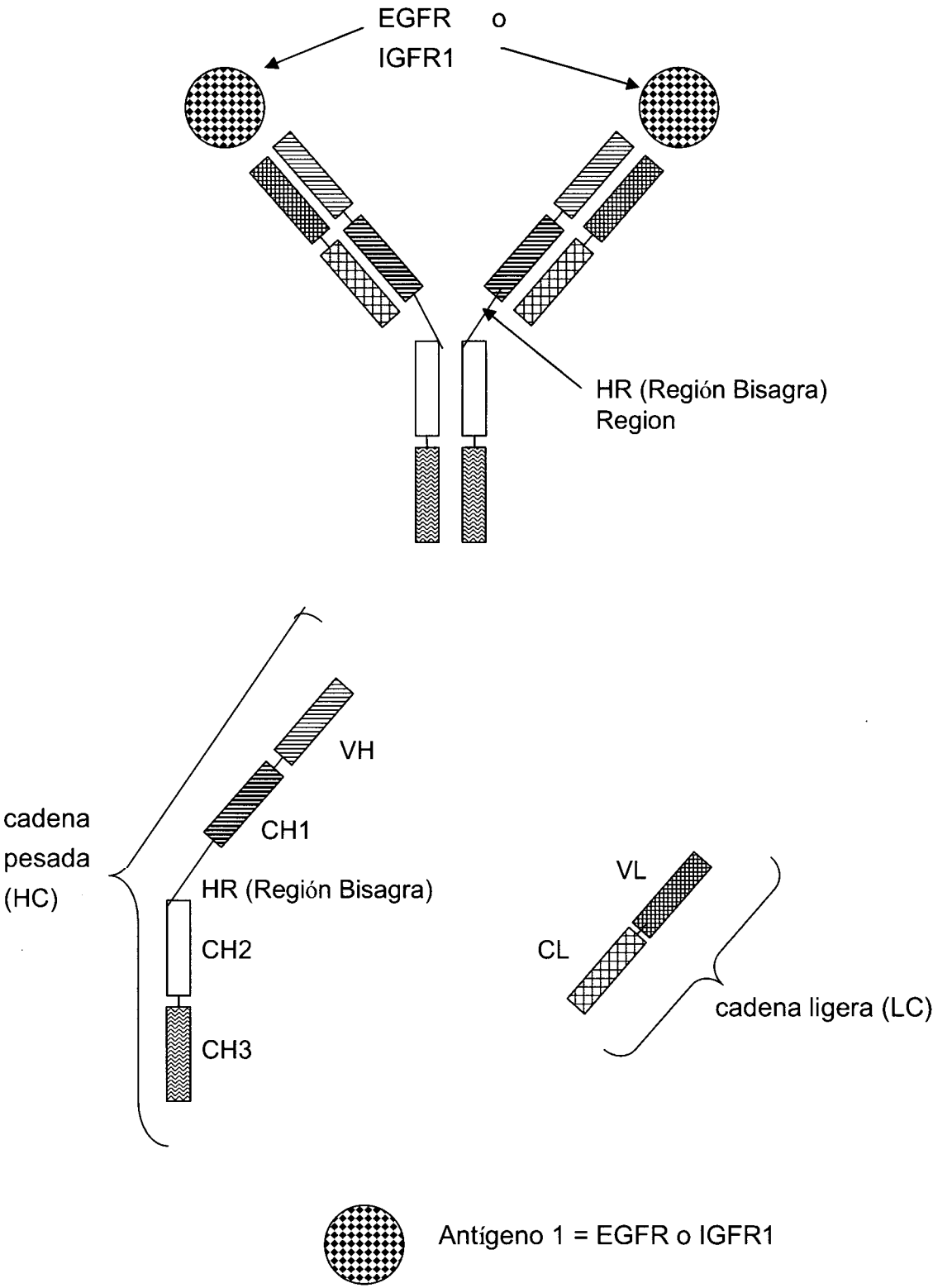
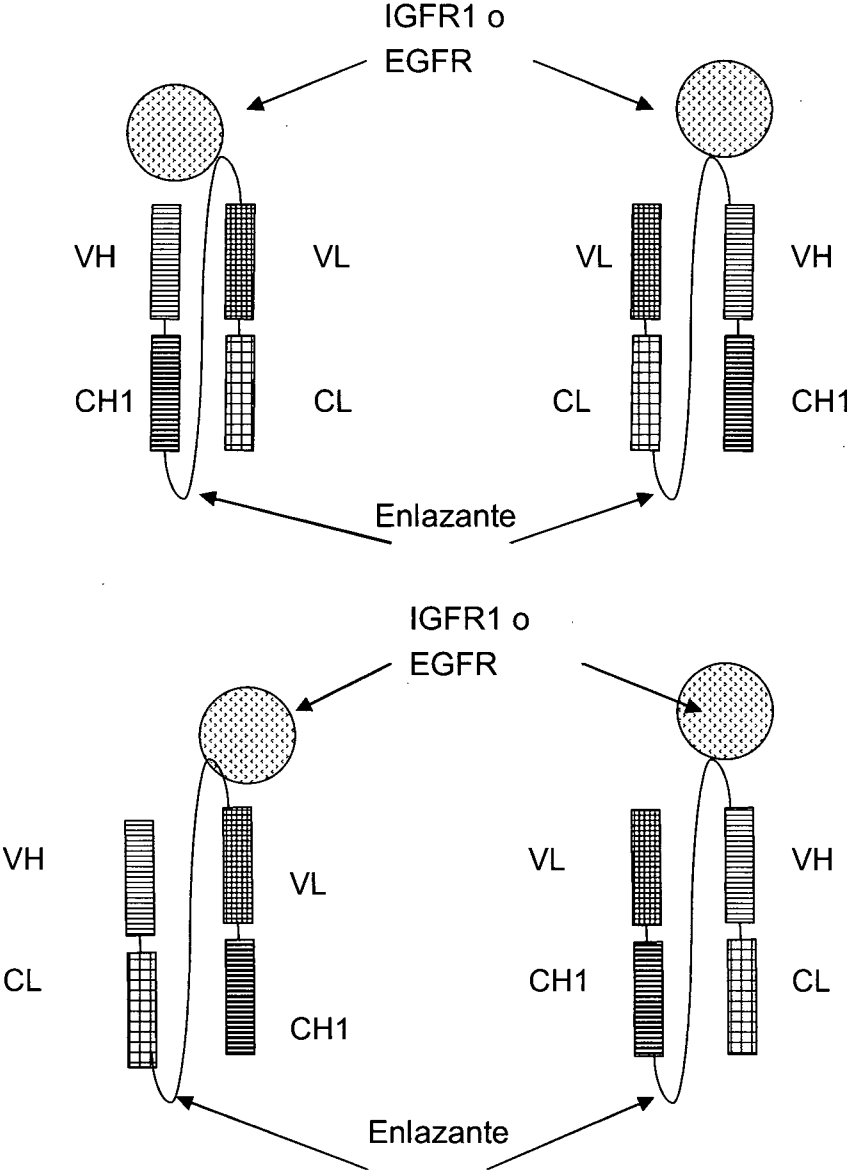


Fig. 10



201

Fig. 11



Antígeno 2 = IGFR1 o EGFR

Fig. 12

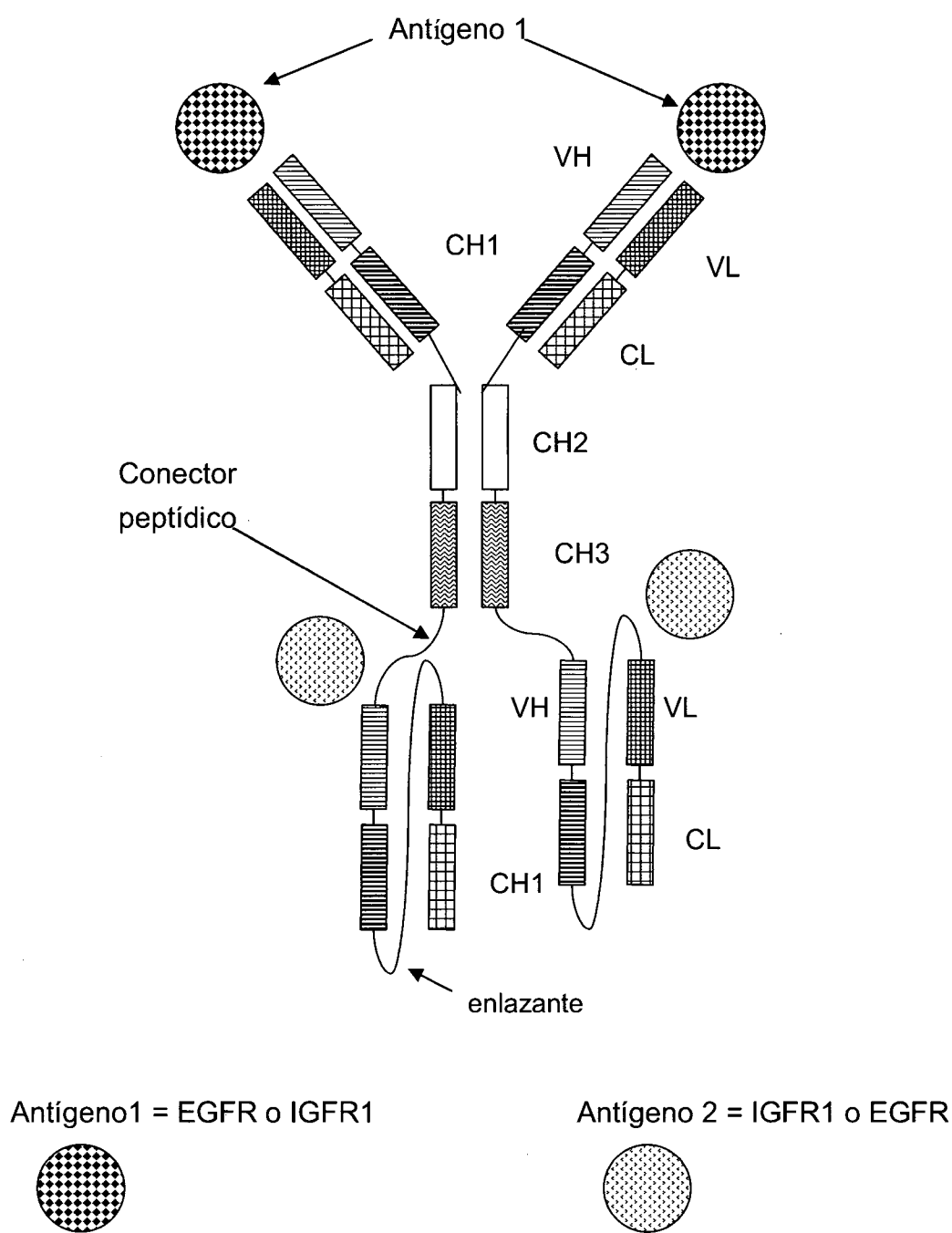
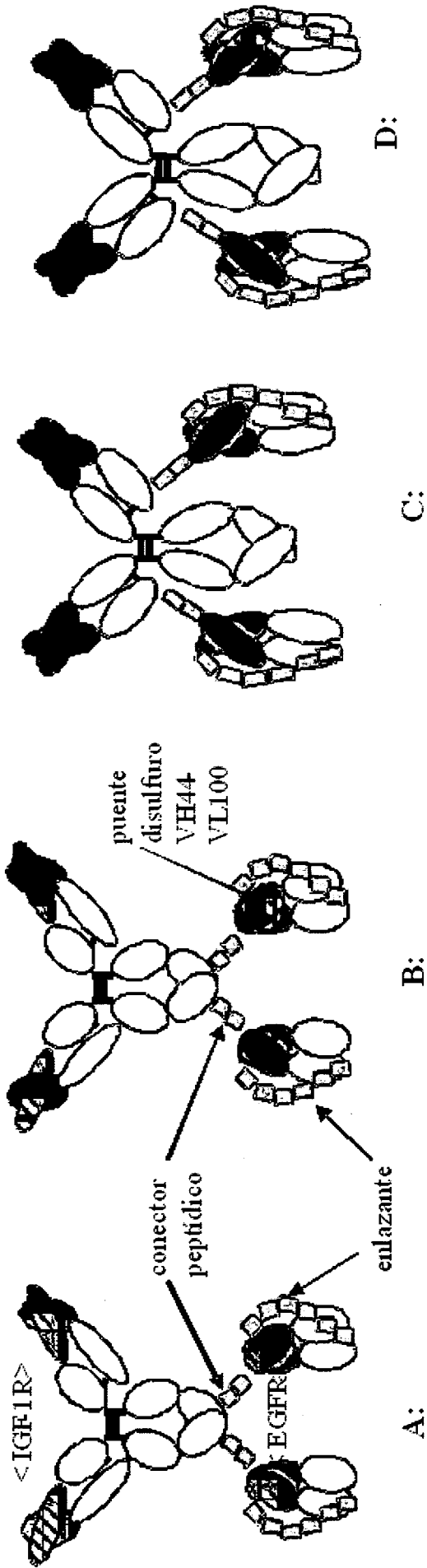
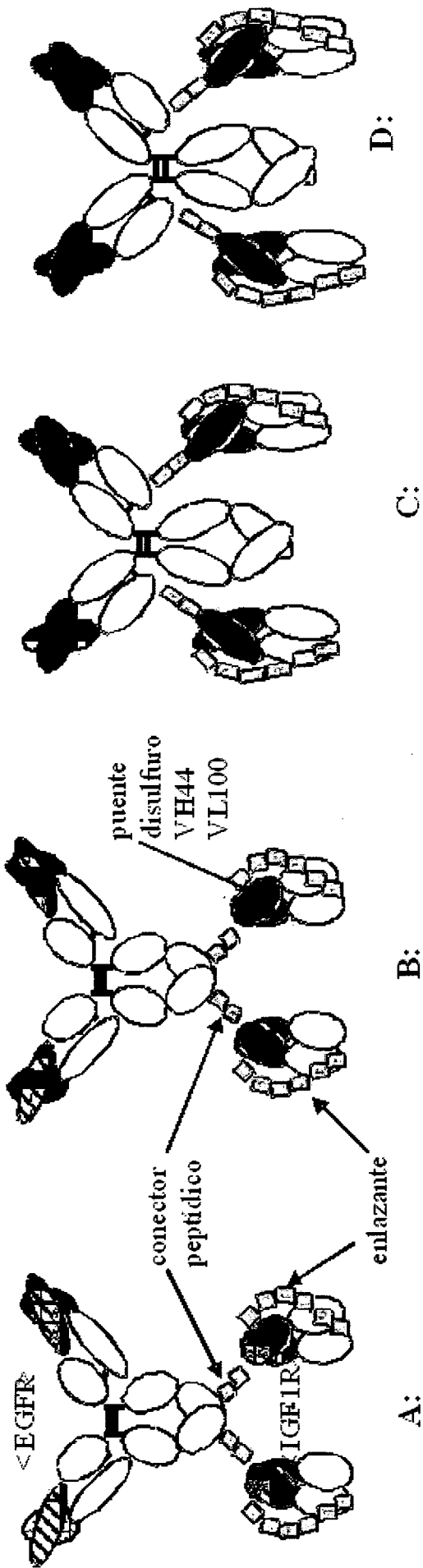


Fig. 13



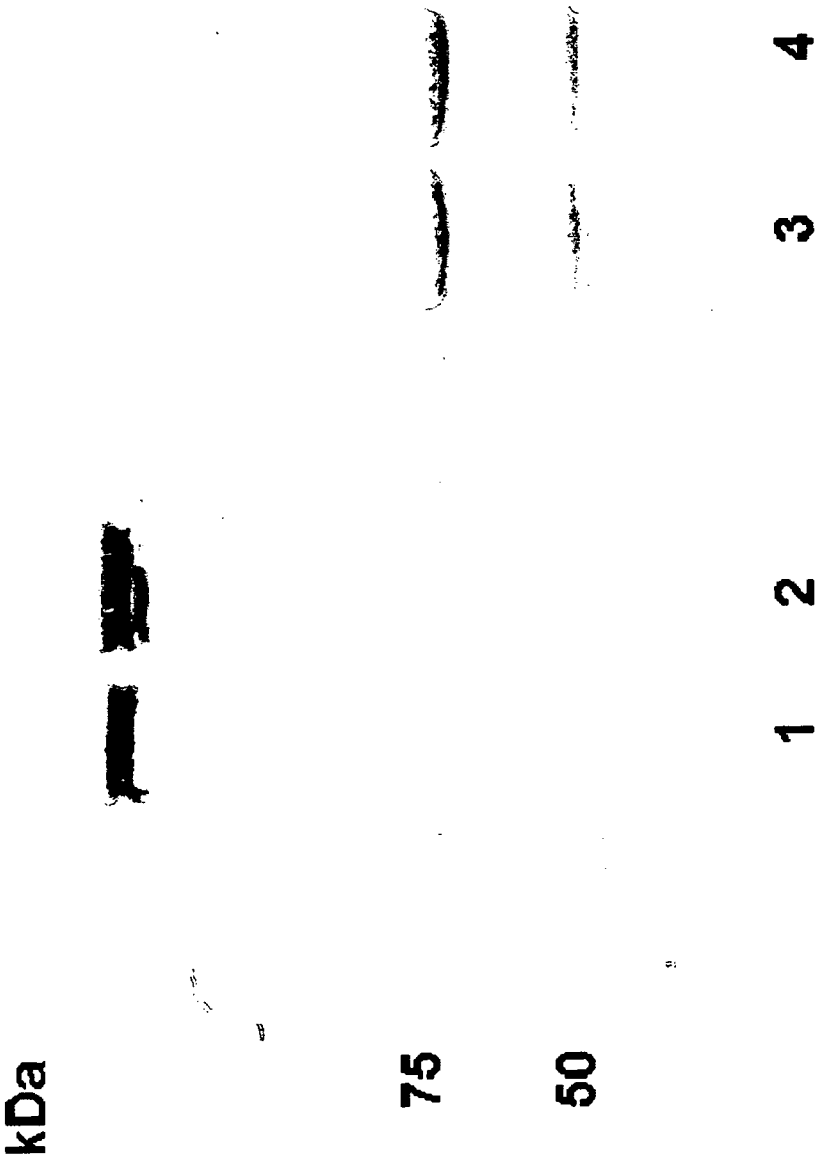
Formato	Nombre de la molécula	Rendimiento medio (mg/L)	Agregación tras SEC (%) a 1 mg/ml
A	scFab-XGFR1_2720	6.8	4.3
B	scFab-XGFR1_2721	7.5	1.7
C	scFab-XGFR1_4720	5.2	7.7
D	scFab-XGFR1_4721	9.5	3.5

Fig. 14



Formato	Nombre de la molécula	Rendimiento medio (mg/L)	Agregación tras SEC (%) a 1 mg/ml
A	scFab-XGFR2_2720	4.4	0
B	scFab-XGFR2_2721	1.2	2.2
C	scFab-XGFR2_4720		
D	scFab-XGFR2_4721		

Fig. 15



206

Fig. 16a

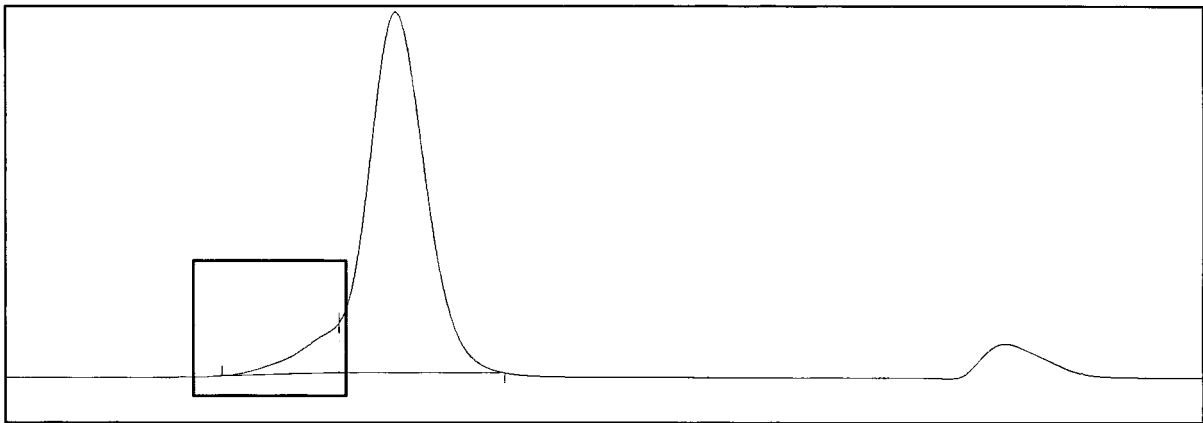
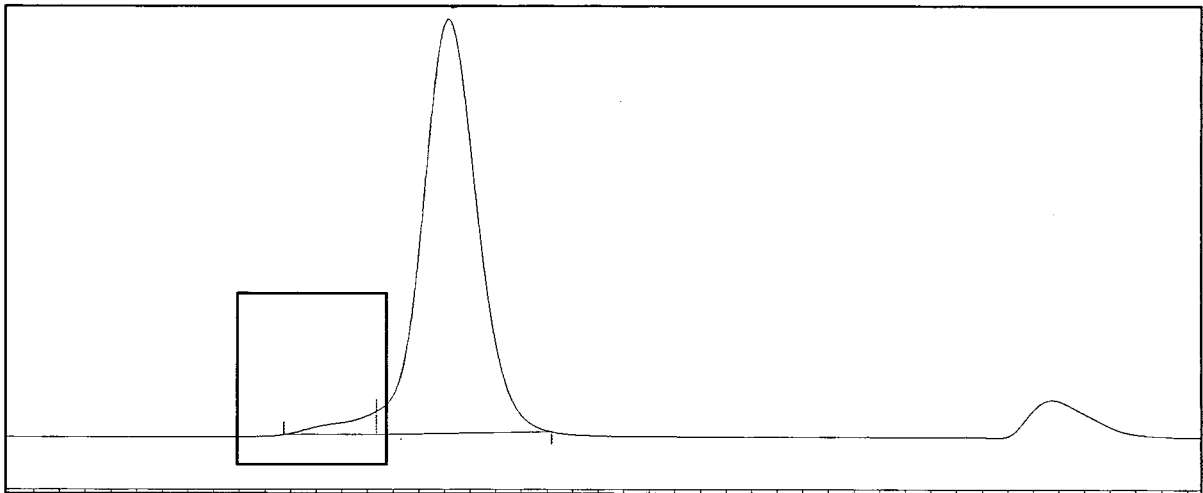


Fig. 16b



257

Fig. 17a

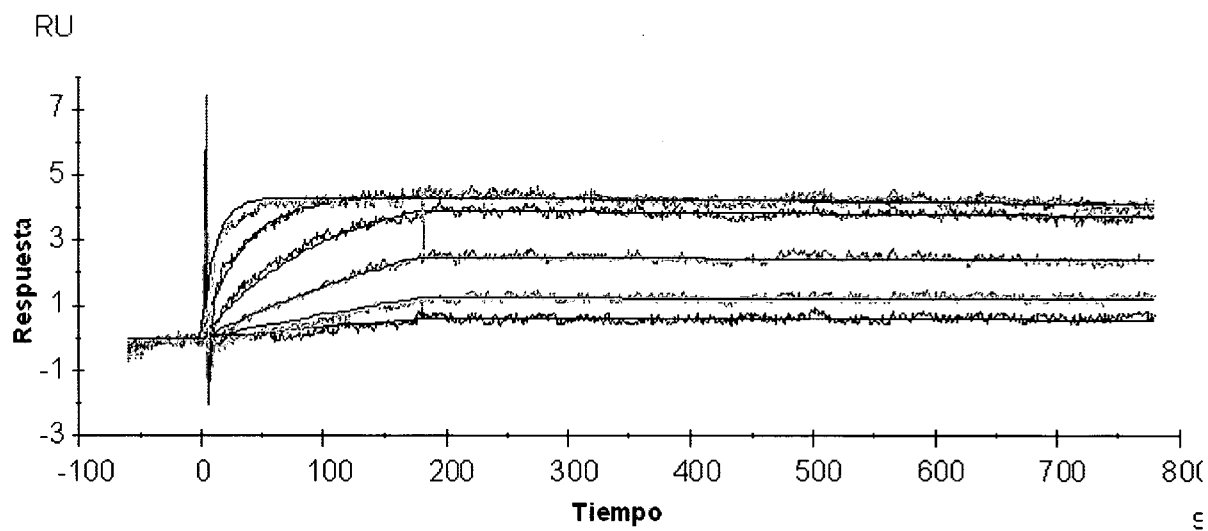
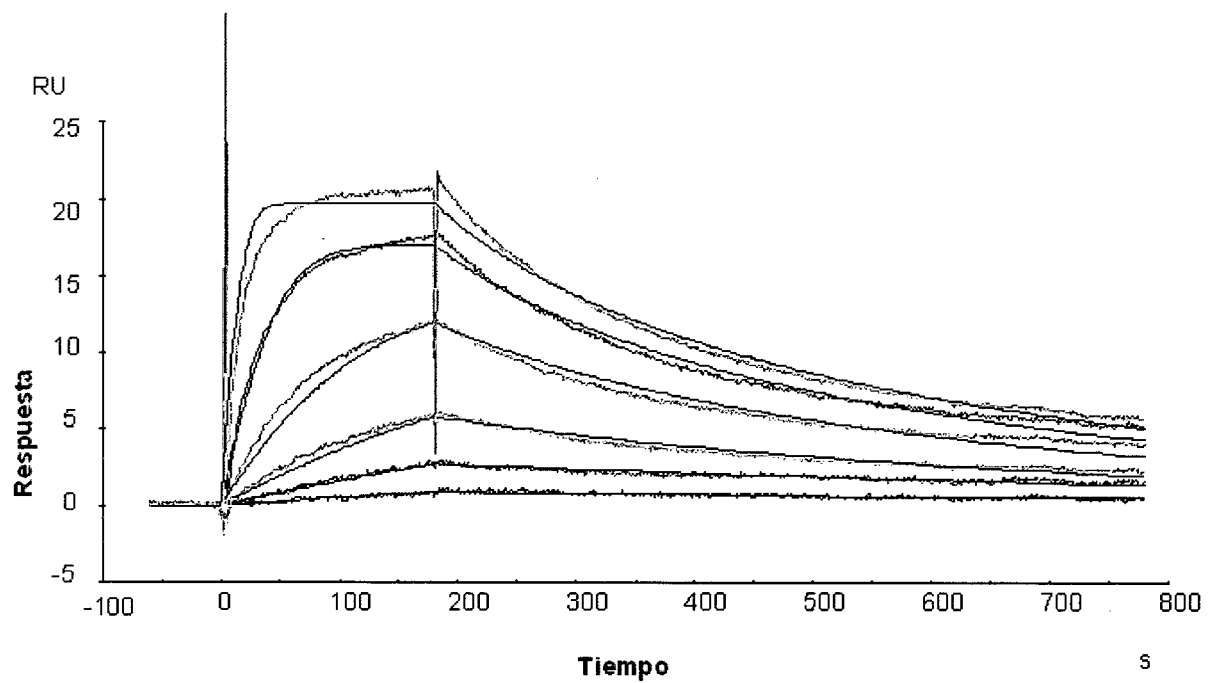


Fig. 17b



208

Fig. 17c

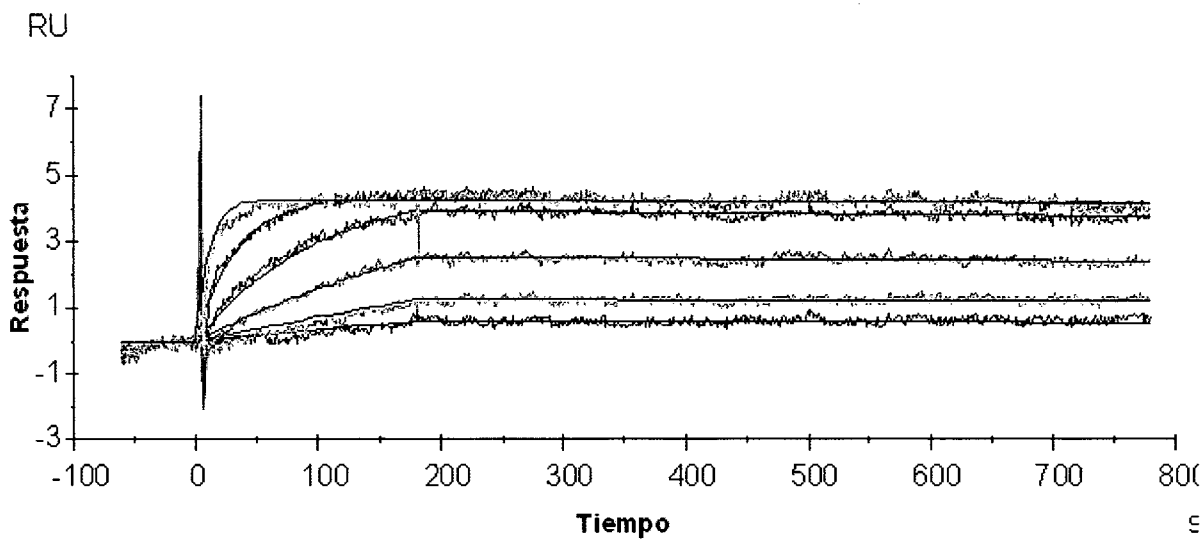


Fig. 17d

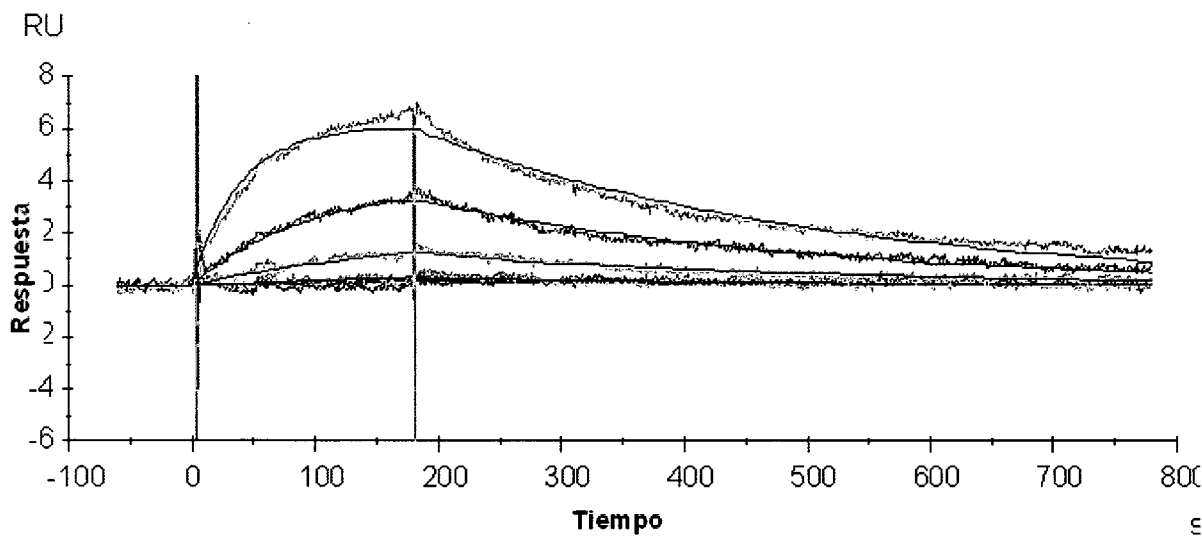


Fig. 18

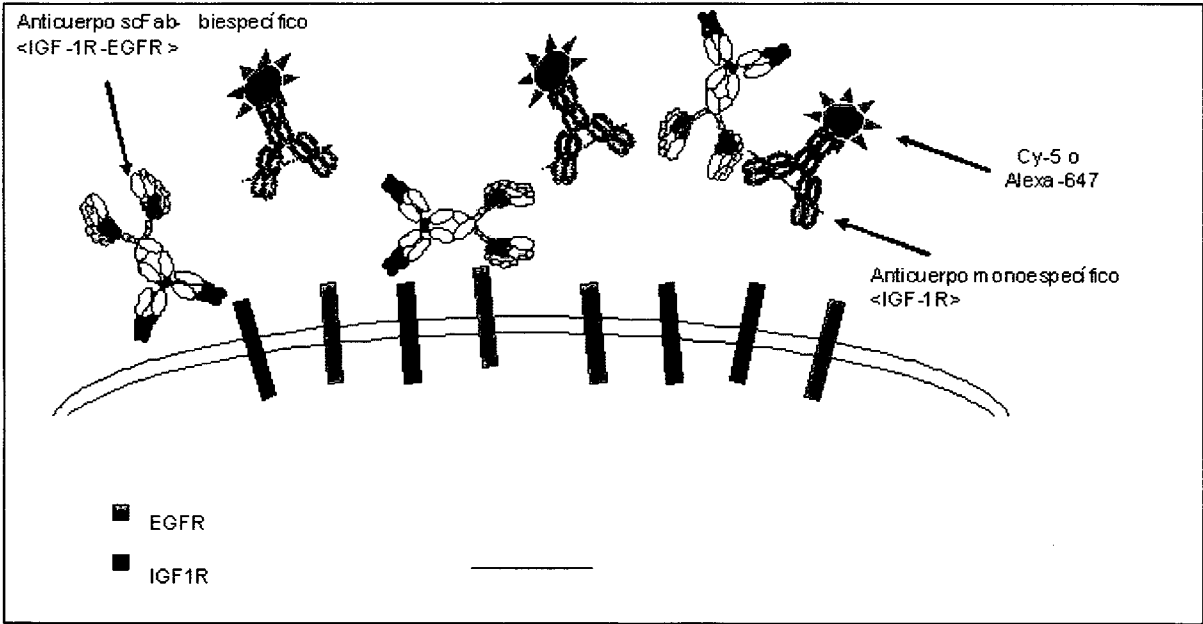


Fig. 19a

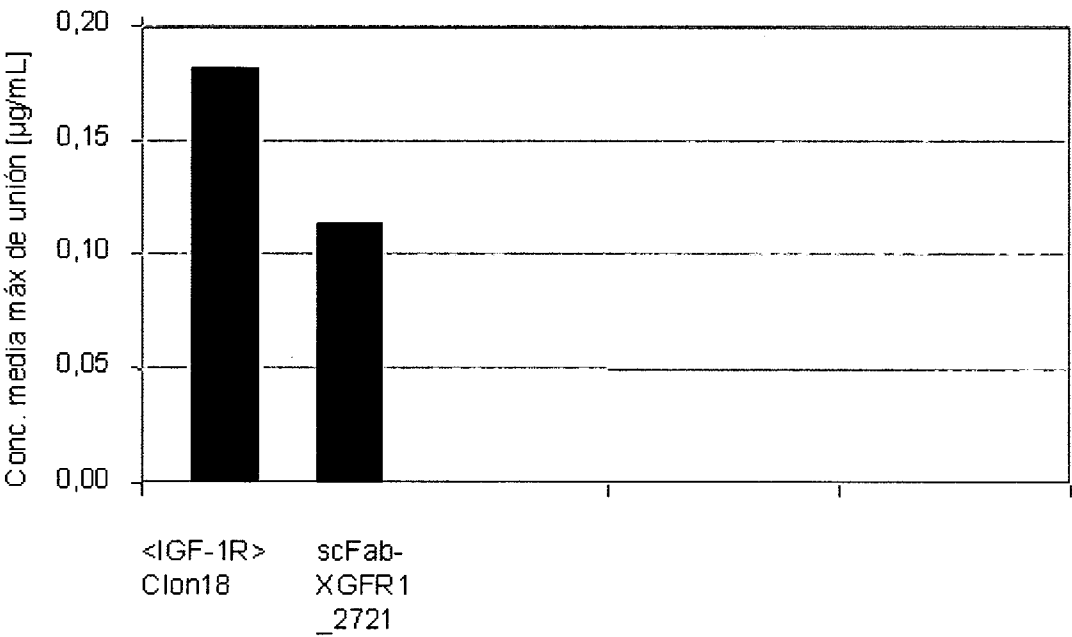


Fig. 19b

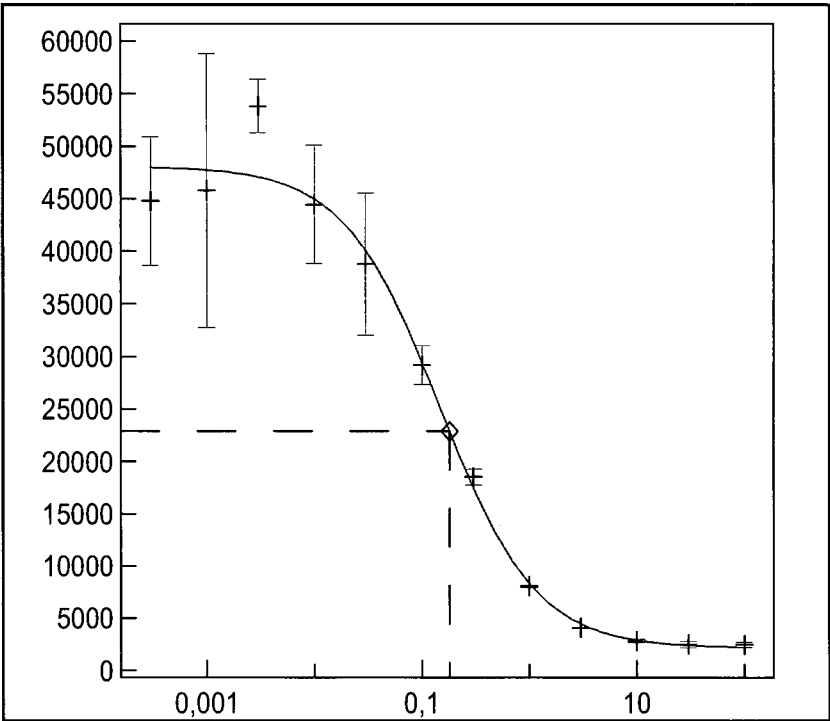
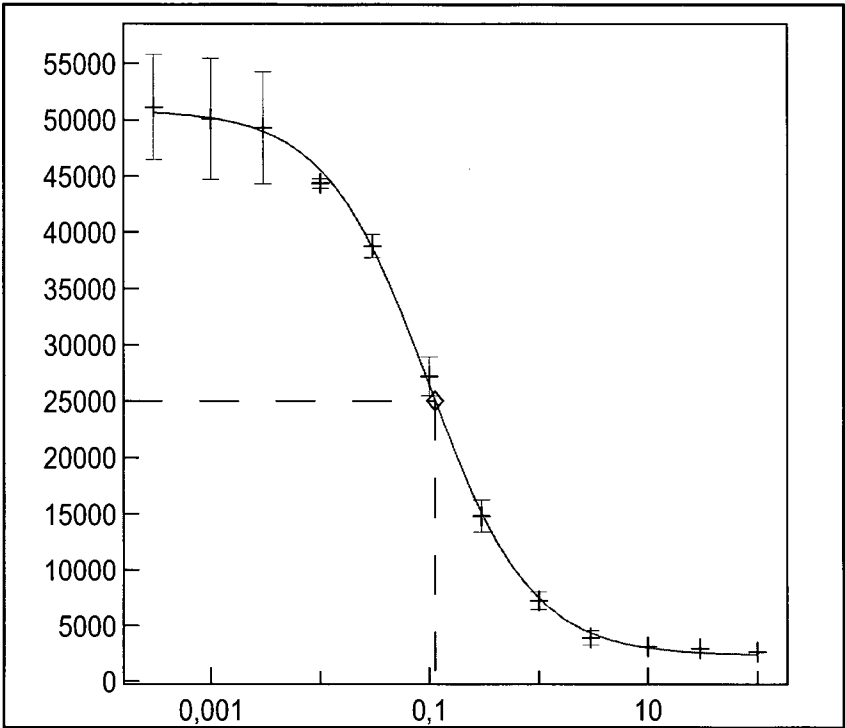
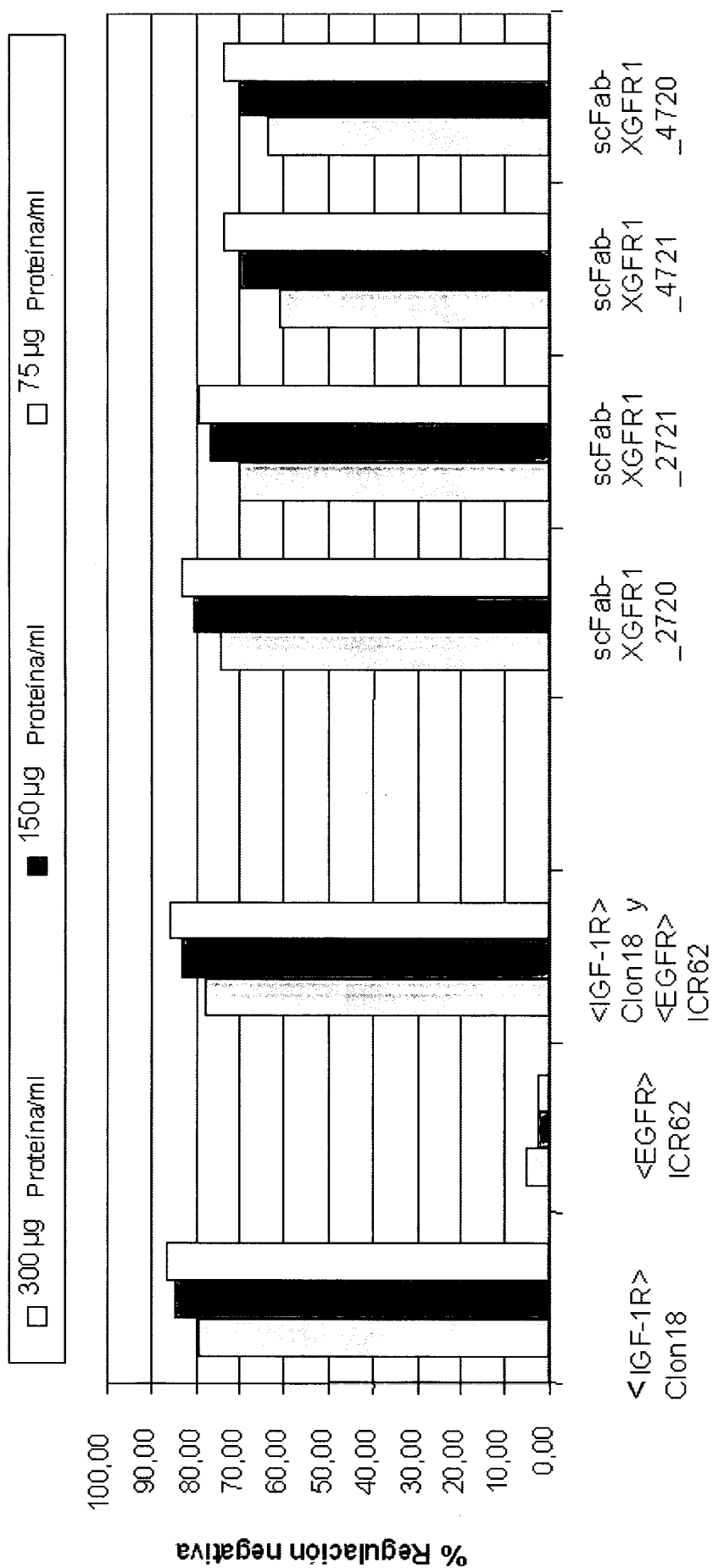


Fig. 19c



201

Fig. 20



242

Fig. 21

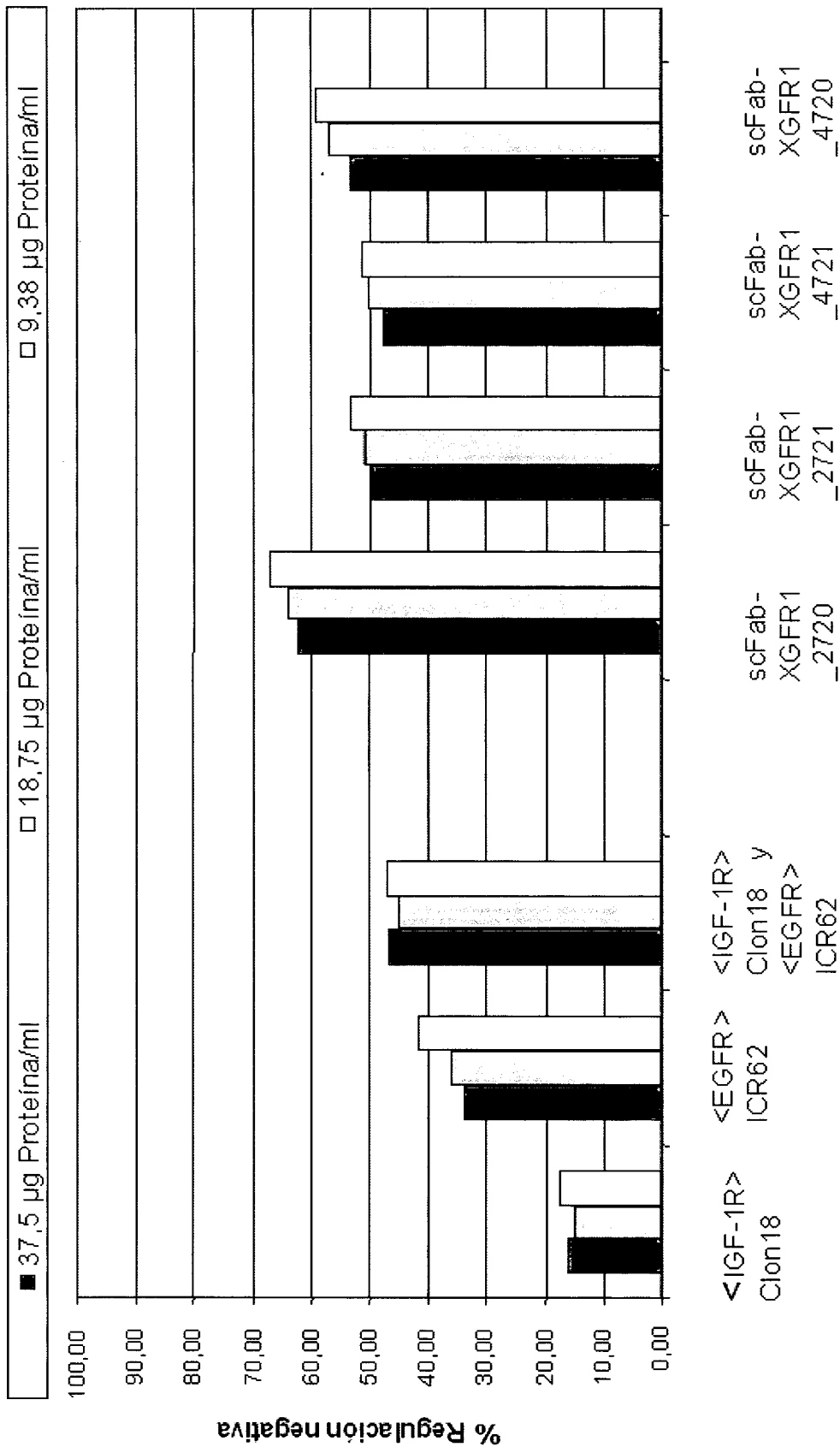
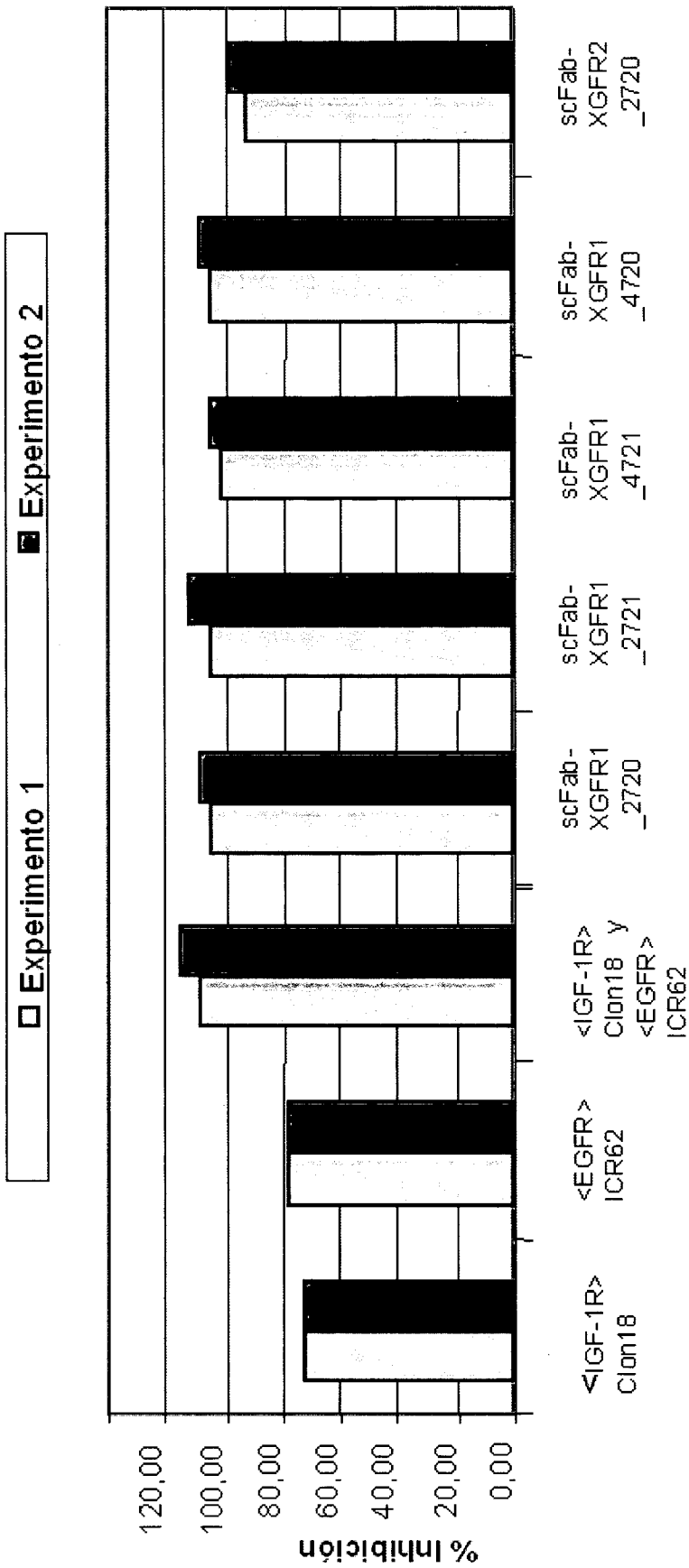


Fig. 22



214

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> anticuerpos Biespecífico anti-EGFR/anti-IGF-1R

<130> 25393

<150> EP 08016952.7

<151> 2008-09-26

<150> EP 09004908.1

<151> 2009-04-02

<160> 49

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR3, <EGFR>ICR62 humanizado

<400> 1

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR2, <EGFR>ICR62 humanizado

<400> 2

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 5

215

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR1, <EGFR>ICR62 humanizado

<400> 3

Asp Tyr Lys Ile His

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR3, <EGFR>ICR62 humanizado

<400> 4

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR2, <EGFR>ICR62 humanizado

<400> 5

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR1, <EGFR>ICR62 humanizado

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada, <EGFR>ICR62-I-HHB

humanizado

<400> 7

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 Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada, <EGFR>ICR62-I-HHD

humanizado

<400> 8

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 Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <EGFR>ICR62 -I-KA

humanizado

<400> 9

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val

100

105

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera, <EGFR>ICR62 -I-KC

humanizado

<400> 10

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35

40

45

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

100

105

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR3, <IGF-1R> HUMAB-Clon 18

<400> 11

Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR2, <IGF-1R> HUMAB-Clon 18

<400> 12

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR1, <IGF-1R> HUMAB-Clon 18

<400> 13

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR3, <IGF- 1R> HUMAB-Clon 18

<400> 14

Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR2, <IGF-1R> HUMAB-Clon 18

<400> 15

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR1, <IGF-1R> HUMAB-Clon 18

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR3, <IGF-1R> HUMAB-Clon 22

<400> 17

Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR2, <IGF-1R> HUMAB-Clon 22

<400> 18

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada CDR1, <IGF-1R> HUMAB-Clon 22

<400> 19

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR3, <IGF-1R> HUMAB-Clon 22

<400> 20

Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR2, <IGF-1R> HUMAB-Clon 22

<400> 21

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera CDR1, <IGF-1R> HUMAB-Clon 22

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr

100

105

110

Leu Val Ser Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser

1

5

10

15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

20

25

30

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Ala

35

40

45

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro

85

90

95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys

100

105

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro

85

90

95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<400> 27

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 28

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100

105

110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115

120

125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130

135

140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145

150

155

160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165

170

175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180

185

190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195

200

205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210

215

220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225

230

235

240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245

250

255

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

260

265

270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 30

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo biespecífico,
bivalente, con intercambio de dominio <EGFR-IGF1R>: Mab-Mixto (VH/VL)

<400> 30

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 Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 31

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo biespecífico,
bivalente, con intercambio de dominio <EGFR-IGF1R>: Mab-Mixto (VH/VL)

<400> 31

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Tyr 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 Ala

305

310

315

320

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

325

330

335

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

340

345

350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val

385

390

395

400

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys

435

440

<210> 32

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 1 de molécula de anticuerpo biespecífico,
bivalente, con intercambio de dominio <EGFR-IGF1R>: Mab-Mixto (VH/VL)

<400> 32

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35

40

45

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100

105

110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115

120

125

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

130

135

140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145

150

155

160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165

170

175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180

185

190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 33

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 2 de molécula de anticuerpo biespecífico,
bivalente, con intercambio de dominio <EGFR-IGF1R>: Mab-Mixto (VH/VL)

<400> 33

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 115 120 125
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 130 135 140
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 145 150 155 160
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 165 170 175
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 180 185 190
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 195 200 205
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 210 215 220
 Cys
 225
 <210> 34
 <211> 450

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo biespecífico,
bivalente, con intercambio de dominio <EGFR-IGF1R>: Mab-Mixto (CH/CL)

<400> 34

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 Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 35

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo biespecífico,
bivalente, con intercambio de dominio <EGFR-IGF1R>: Mab-Mixto (CH/CL)

<400> 35

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr

100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile

115 120 125

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val

130 135 140

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys

145 150 155 160

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu

165 170 175

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu

180 185 190

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 195 200 205
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 36

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 1 de molécula de anticuerpo biespecífico, bivalente, con intercambio de dominio <EGFR-IGF1R>: Mab-Mixto (CH/CL)

<400> 36

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

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

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180

185

190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 37

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 2 de molécula de anticuerpo biespecífico,

bivalente, con intercambio de dominio <EGFR-IGF1R>: Mab-Mixto (CH/CL)

<400> 37

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro

85

90

95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser

100

105

110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

115

120

125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

130

135

140

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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 38

<211> 695

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc

bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: scFab-Fc

<400> 38

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 245 250 255
 Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe
 260 265 270
 Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 275 280 285
 Cys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser
 305 310 315 320
 Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 325 330 335
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met
 340 345 350
 Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 355 360 365

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 370 375 380
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 385 390 395 400
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 405 410 415
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 420 425 430
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 435 440 445
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 450 455 460
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 485 490 495
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 500 505 510
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 515 520 525
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 530 535 540
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 545 550 555 560
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 565 570 575
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 580 585 590
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 595 600 605
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 610 615 620

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 625 630 635 640

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 645 650 655

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 660 665 670

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 675 680 685

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690 695

<210> 39

<211> 695

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo de fusión ScFab-Fc

bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: scFab-Fc

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys 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
 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 260 265 270
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 275 280 285
 Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 305 310 315 320
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 325 330 335
 Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe
 340 345 350
 Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr
 355 360 365

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 370 375 380
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 385 390 395 400
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 405 410 415
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 420 425 430
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 435 440 445
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 450 455 460
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 485 490 495
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 500 505 510
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 515 520 525
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 530 535 540
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 545 550 555 560
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 565 570 575
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 580 585 590
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 595 600 605
 Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 610 615 620

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
625 630 635 640
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
645 650 655
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
660 665 670
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
675 680 685
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 40
<211> 695
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-Fc
bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: N-scFabSS-Salt-bridge-s3

<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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
625 630 635 640

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 645 650 655

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 660 665 670

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser
 675 680 685

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 41
<211> 695
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-Fc bivalente,
bienespecífica <EGFR-IGF1R>: N-scFabSS-Salt-bridge-s3

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys 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

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 260 265 270

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 275 280 285

Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser
 290 295 300

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 305 310 315 320

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 325 330 335

Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe
 340 345 350

Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr
 355 360 365

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 370 375 380

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
385 390 395 400

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
405 410 415

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
420 425 430

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
435 440 445

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
450 455 460

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
465 470 475 480

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
485 490 495

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
500 505 510

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
515 520 525

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
530 535 540

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
545 550 555 560

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
565 570 575

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
580 585 590

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys
595 600 605

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
610 615 620

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
625 630 635 640

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
645 650 655

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
660 665 670

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
675 680 685

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210>	42
<211>	695
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-Fc bivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: N-scFabSS-Salt-bridge-w3C

<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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 245 250 255

Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe
 260 265 270

Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 275 280 285

Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
 290 295 300

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser
 305 310 315 320

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 325 330 335

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met
 340 345 350

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 355 360 365

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 370 375 380

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 385 390 395 400

288

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
405 410 415

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
420 425 430

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
435 440 445

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
450 455 460

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
465 470 475 480

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
485 490 495

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
500 505 510

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
515 520 525

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
530 535 540

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
545 550 555 560

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
565 570 575

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
580 585 590

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
595 600 605

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
610 615 620

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
625 630 635 640

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
645 650 655

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
660 665 670

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser
675 680 685

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

<210> 43
<211> 695
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-Fc bivalente,
biespecífica <EGFR-IGF1R>: N-scFabSS-Salt-bridge-w3C

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys 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

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
405 410 415

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 420 425 430

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 435 440 445

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 450 455 460

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 465 470 475 480

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 485 490 495

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 500 505 510

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 515 520 525

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 530 535 540

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 545 550 555 560

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 565 570 575

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 580 585 590

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Lys Lys Leu Thr Lys
 595 600 605

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 610 615 620

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 625 630 635 640

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 645 650 655

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 660 665 670

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
675 680 685

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695

```
<210> 44
<211> 932
<212> PRT
<213> Artificial
```

<220>
<223> Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG
trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-1

<400> 44

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 Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

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

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu
450 455 460

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
465 470 475 480

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
485 490 495

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser
500 505 510

Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
515 520 525

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
530 535 540

Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Lys	Trp	Pro	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly
545					550					555					560

Cys Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
565 570 575

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
580 585 590

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
595 600 605

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
610 615 620 .

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
625 630 635 640

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
645 650 655

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
660 665 670

Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
675 680 685

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
690 695 700

Ser Gly Gly Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
705 710 715 720

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
725 730 735

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu
740 745 750

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
755 760 765

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
770 775 780

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
785 790 795 800

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
805 810 815

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
820 825 830

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
835 840 845

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
850 855 860

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
865 870 875 880

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
885 890 895

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
900 905 910

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
915 920 925

Asp Lys Thr His
930

<210> 45
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-1

<400> 45

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 Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys 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 Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

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

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

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

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

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 46
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-1

<400> 46

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 47
<211> 930
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada 1 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-2

<400> 47

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 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 His Glu Asp Pro
 260 265 270

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

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

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 355 360 365

Leu 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 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 450 455 460

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 465 470 475 480

Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 485 490 495

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Asn Leu
 500 505 510

Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
 515 520 525

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 530 535 540

Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 545 550 555 560

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 565 570 575

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 580 585 590

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 595 600 605

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 610 615 620

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 625 630 635 640

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 645 650 655

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly
 660 665 670

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 675 680 685

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln
 690 695 700

Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu		Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser
705					710						715					720

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys
725 730 735

Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly
740 745 750

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
755 760 765

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
770 775 780

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
785 790 795 800

Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly
805 810 815

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
820 825 830

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
835 840 845

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
850 855 860

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
865 870 875 880

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
885 890 895

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
900 905 910

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
915 920 925

Thr His
930

```
<210> 48
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial
```

<220>

<223> Cadena pesada 2 de molécula de anticuerpo de fusión scFab-IgG
trivalente, biespecífica <EGFR-IGF1R>: KiH-C-scFab-2

<400> 48

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

{JLLCCO: 278591.DOC v.1}

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys 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

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

...



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

ADM

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-039189- -00000-0000

Fecha: 2011-03-30 16:22:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 273

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐ Indicación que solicita una patente

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art .33 Decisión 486/00, Circular Única

(1) ☒

Indicación que se solicita una PCT

(25) ☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capitulo descriptivo, reivindicatorio, resume)

(189) ☒

Dibujos de ser estos pertinentes.

(2) ☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que Incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación grafica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
ROCHE GLYCART AG

REFERENCIA	Radicación No.	11 039189
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/6782
	Fecha inicio fase nacional	26/04/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

08225

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 20 MAYO 2011
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
ROCHE GLYCART AG

REFERENCIA	Radicación No.	11 039189
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/6782
	Fecha inicio fase nacional	26/04/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

08226

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 20 MAYO 2011
adpa11