

COMPUESTOS DE VEGFR2/Ang2**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere al campo de la
5 medicina. Más particularmente, la presente invención se
refiere a compuestos que se unen al receptor 2 del factor de
crecimiento endotelial vascular humano (VEGFR2) y
angiopoyectina 2 humana (Ang2), y pueden ser útiles para el
tratamiento de cáncer, especialmente tumores sólidos
10 impulsados por VEGFR2 y Ang2, incluyendo cánceres gástrico,
carcinoma hepatocelular, de ovarios, colorrectal, de pulmón
de células no pequeñas, del tracto biliar, y de mama.

Una característica del cáncer es la nueva formación
persistente de vasos sanguíneos, llamada angiogénesis. La vía
15 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una
cascada de señalización importante en la regulación de la
angiogénesis; el VEGFR2 humano es un receptor clave en la vía
de VEGF. Ramucirumab (IMC-1121B) es un anticuerpo de IgG1 que
se dirige al VEGFR2 humano, y se ha mostrado que tiene un
20 efecto anti-tumor en ciertos estudios clínicos (ver, por
ejemplo, Zhu et al., Clin Cancer Res (2013) 19:6614).

La angiopoyetina-1 (Ang1) y Ang2 son miembros de
otra vía cable que regula la angiogénesis; Ang1 y Ang2 son
factores secretados que se unen al receptor de tirosina
25 cinasa específico de células endoteliales Tie2. La Ang1 es

secretada constitutivamente por pericitos y estabiliza la integridad de los vasos sanguíneos vía el receptor Tie2. La Ang2 es liberada de las células endoteliales sólo en respuesta al estímulo (por ejemplo, curación de las heridas, crecimiento del tumor) y facilita el brote de vasos sanguíneos e inhibe la interacción de pericitos-células endoteliales vía la señalización de Tie2. Se ha mostrado que un anticuerpo contra la Ang2 humana, cuando se dosifica en combinación con el bloqueador de VEGF aflibercept, inhibe el crecimiento de tumor y disminuye la vascularidad del tumor en modelos de tumor de xenoinjerto de ratón (Daly et al., Cancer Res (2013) 73(1):108). Múltiples anticuerpos de Ang2 de investigación actualmente están en ensayos clínicos.

Se ha propuesto la inhibición de ambas vías de VEGF y Ang/Tie2 de la angiogénesis para el potencial de mejorar el resultado contra el cáncer (ver, por ejemplo, Daly et al., Cancer Res (2013) 73:108). Actualmente, la co-administración de un anticuerpo de VEGFR2 y anticuerpo de Ang-2 requeriría ya sea inyecciones o infusiones de dos productos separados o la administración de una co-formulación de una mezcla de anticuerpos. La administración separada permitiría la flexibilidad de la cantidad de dosis y sincronización, pero sería un problema potencial para el cumplimiento del paciente e inconveniencia debido al aumento del tiempo de infusión. Una co-formulación podría proporcionar alguna flexibilidad de

las cantidades de dosificación, pero puede ser desafiante hallar las condiciones de formulación que permitan la estabilidad química y física de ambos anticuerpos debido a las diferentes características moleculares de los dos
5 diferentes anticuerpos. Además, la co-administración o la co-formulación involucra los costos aditivos de dos terapias con fármacos.

El documento WO2012/009705 describe complejos que contienen uno o más dominios de reconocimiento modular (MRD)
10 unidos a andamiajes que incluyen anticuerpos. La Ang2 se listó como se contempla para la porción de MRD del complejo, y un anticuerpo de VEGFR2 se especificó como un anticuerpo al cual los MRD se podrían unir. Un MRD contra la Ang2 unida a un anticuerpo de VEGFR2 no se ejemplificó. Brown *et al.* (Mol
15 Cancer Ther (2010) 9(1):145) describieron un anticuerpo de Ang2 monoclonal humano, 3.19.3. En un estudio de xenoinjerto SW620, el 3.19.3 se dosificó en combinación con DC101, un anticuerpo monoclonal que se une a VEGFR2 murino.

Cuando se generan compuestos (Compuesto A y B) que
20 contienen una porción de anticuerpo de VEGFR2 que contiene la región variable de cadena ligera (LCVR) y región variable de cadena pesada (HCVR) del anticuerpo IMC-1121B en un esqueleto de IgG1 o IgG4, fusionado a una porción de Fv de cadena única (scFv) que se une a la Ang2 humana, se observaron problemas
25 de expresión y estabilidad por el Solicitante como parte de

la presente invención. Específicamente, se observaron
sorepresentemente la inestabilidad química y la calidad del
producto inaceptable en materiales recombinantemente
expresados debido a los mal apareamientos de cadena ligera
5 libres. Como se observa por el Solicitante como parte de la
presente invención, la ingeniería del compuesto para mejorar
la inestabilidad química y calidad del producto en los
materiales obtenidos del cultivo celular condujo
inesperadamente a ciertos compuestos con homogeneidad de
10 producto aumentada debido a la formación del Mab-diacuerpo.

Permanece una necesidad de proporcionar compuestos
que inhiban dos vías de angiogénesis uniendo y neutralizando
tanto el VEGFR2 humano como la Ang2 humana. En particular,
hay una necesidad de proporcionar compuestos que inhiban dos
15 vías de angiogénesis uniendo y neutralizando tanto el VEGFR2
humano como la Ang2 humana, y sin comprometer la actividad de
unión *in vitro* de Ang2 significativa debido al uso de un scFv
de Ang2, y sin comprometer la actividad significativa del
ensayo *in vitro* basado en células debido a la combinación del
20 anticuerpo de VEGFR2 y scFv de Ang2 en un compuesto. También
permanece una necesidad de proporcionar compuestos que
inhiban dos vías de angiogénesis uniendo y neutralizando
tanto el VEGFR2 humano como la Ang2 humana, y eviten al menos
unos de los problemas de estabilidad y heterogeneidad del
25 producto listados anteriormente.

Por consiguiente, una modalidad de la presente invención proporciona un compuesto, que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de fragmentos variables de cadena única (scFv), en donde:

- 5 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas idénticas (HC) y dos cadenas ligeras idénticas (LC), en donde cada HC comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de aminoácidos se da en la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, o SEC ID NO: 4, y en donde cada LC
10 comprende una región variable de cadena ligera (LVCR) cuya secuencia de aminoácidos se da en la SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, o SEC ID NO: 15,
- 15 b) los dos polipéptidos de scFv son idénticos y cada uno comprende una HCVR operativamente enlazada a una LCVR, en donde cada HCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, o SEC ID NO: 22, y en donde cada LCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23, o SEC ID NO:
20 24, y
- 25 c) los dos enlazantes son enlazantes idénticos ricos en glicina que enlazan operativamente cada uno el carboxi terminal de una HC del anticuerpo al amino terminal de uno de los polipéptidos de scFv.
- En una modalidad adicional, la presente invención

proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde los dos polipéptidos de scFv comprenden cada uno el carboxi terminal de la LCVR de un polipéptido de scFv operativamente enlazado al amino terminal de la HCVR de un polipéptido de scFv.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 1, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 13, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 2, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 14, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada

en la SEC ID NO: 23.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 3, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 15, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 4, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 13, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 22, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 24.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras

(LC), en donde cada HC tiene la secuencia de aminoácidos dada en una de la SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, o SEC ID NO: 8, y cada LC tiene la secuencia de aminoácidos dada en una de la SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, o SEC ID NO: 18.

5 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 5, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de
10 aminoácidos dada en la SEC ID NO: 16.

 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC
15 ID NO: 6, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 17.

 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada HC del
20 anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 7, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 18.

 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos
25 enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada HC del

anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 8, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 16.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos
5 enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos idéntica dada en una de la SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 20. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto
10 que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 19. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo fusionado por dos
15 enlazantes a dos polipéptidos de scFv, en donde cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 20.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos y dos
20 segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, o SEC ID NO: 12, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, o SEC ID NO: 18.
25 Como se muestra en la Tabla 1, los dos primeros polipéptidos

comprende la HC del anticuerpo, el enlazante, y el polipéptido de scFv; los dos segundos polipéptidos comprenden la LC del anticuerpo.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 17. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 18. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de

SEC ID NO: 16.

En una modalidad, la presente invención adicionalmente proporciona un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde
5 cada uno de los primeros polipéptidos forma un enlace de disulfuro inter-cadena con cada uno de los segundos polipéptidos, y el primer polipéptido forma dos enlaces de disulfuro inter-cadena con el otro primer polipéptido, y cada uno de los primeros polipéptidos forma un enlace de disulfuro
10 intra-cadena.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de
15 scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde:

a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas idénticas (HC) y dos cadenas ligeras idénticas (LC), en donde cada HC comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de
20 aminoácidos se da en la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, o SEC ID NO: 4, y en donde cada LC comprende una región variable de cadena ligera (LVCR) cuya secuencia de aminoácidos se da en la SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, o SEC ID NO: 15,

25 b) los dos polipéptidos de scFv son idénticos y

5 cada uno comprende una HCVR operativamente enlazada a una LCVR, en donde cada HCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, o SEC ID NO: 22, y en donde cada LCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23, o SEC ID NO: 24, y

10 c) los dos enlazantes son enlazantes idénticos ricos en glicina que enlazan operativamente cada uno el carboxi terminal de una HC del anticuerpo al amino terminal de uno de los polipéptidos de scFv.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 15 33), en donde el carboxi terminal de la LCVR de cada polipéptido de scFv se enlaza operativamente al amino terminal de la HCVR.

20 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 1, cada LCVR del anticuerpo tiene la 25

secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 13, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos
5 dada en la SEC ID NO: 23

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de
10 scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 2, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 14, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de
15 aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que
20 comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 3, cada LCVR del anticuerpo tiene la
25 secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 15, la HCVR de

cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23.

5 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde
10 cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 4, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 13, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 22, y la LCVR de cada uno
15 de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 24.

 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID
20 NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC), en donde cada HC tiene la secuencia de aminoácidos dada en una de la SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC
25 ID NO: 7, o SEC ID NO: 8, y cada LC tiene la secuencia de

aminoácidos dada en una de la SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, o SEC ID NO: 18.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que
5 comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 5, y cada LC del anticuerpo tiene la
10 secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 16.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de
15 scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 6, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 17.

En una modalidad, la presente invención proporciona
20 un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada
25 en la SEC ID NO: 7, y cada LC del anticuerpo tiene la

secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 18.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID
5 NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 8, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 16.

10 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde
15 cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos idéntica dada en una de la SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 20. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32)
20 fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 19. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano y la
25 Ang2 humana que comprende un anticuerpo que se une al VEGFR2

humano (SEC ID NO: 32) fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de scFv que se unen a la Ang2 humana (SEC ID NO: 33), en donde cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 20.

5 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) y la Ang2 humana (SEC ID NO: 33) que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, o SEC ID NO: 12, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, o SEC ID NO: 18. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) y la Ang2 humana (SEC ID NO: 33) que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) y la Ang2 humana (SEC ID NO: 33) que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10, y cada uno de los segundos polipéptidos

tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 17. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) y la Ang2 humana (SEC ID NO: 33) que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 18. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) y la Ang2 humana (SEC ID NO: 33) que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16.

En una modalidad, la presente invención adicionalmente proporciona un compuesto que se une al VEGFR2 humano (SEC ID NO: 32) y la Ang2 humana (SEC ID NO: 33) que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en donde cada uno de los primeros polipéptidos forma un enlace de disulfuro inter-cadena con cada uno de los segundos polipéptidos, y el primer polipéptido forma dos enlaces de disulfuro inter-cadena con el otro primer polipéptido, y cada uno de los primeros polipéptidos forma un enlace de disulfuro intra-cadena.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto of la presente invención que tiene una constante de equilibrio de disociación, K_D , de aproximadamente 300 pM a aproximadamente 1400 pM para VEGFR2 humano y una K_D de aproximadamente 300 pM a aproximadamente 800 pM para Ang2 humana. El compuesto de la presente invención se caracteriza adicionalmente por una velocidad de k_{on} para VEGFR2 humano de aproximadamente $0.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ a aproximadamente $0.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y una velocidad k_{on} para Ang2 humana de aproximadamente $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ a aproximadamente $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$. El compuesto de la presente invención se caracteriza adicionalmente por una velocidad de k_{off} para VEGFR2 humano de aproximadamente $0.1 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ a aproximadamente $0.5 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ y una velocidad de K_{off} para Ang2 humana de aproximadamente $0.8 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ a aproximadamente $1.2 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$. Los valores de K_D , k_{on} , y k_{off} se establecen por cinéticas de unión a 25°C como se describe en la "Cinética, afinidad, y selectividad de unión" en la sección de Ensayos.

El compuesto de la presente invención se une al VEGFR2 humano y la Ang2 humana con alta afinidad. Para los propósitos de la presente descripción, el "alta afinidad" se refiere a una K_D menor que aproximadamente 1500 pM para VEGFR2 humano y menor que aproximadamente 1000 pM para Ang2 humana. Los valores de K_D se establecen por cinéticas de unión a 25°C

como se describe en la "Cinética, afinidad, y selectividad de unión" en la sección de Ensayos.

En una modalidad, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que
5 comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido que consiste de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12 y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que
10 consiste de un polipéptido que consiste de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18, en donde la célula es capaz de expresar un compuesto que comprende un primer polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11 y SEC
15 ID NO: 12 y un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18.

En una modalidad, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que
20 comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9 y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16, en donde la célula es capaz de expresar un compuesto
25 que comprende un primer polipéptido que tiene una secuencia

de aminoácidos de SEC ID NO: 9 y un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16.

En una modalidad, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que
5 comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10 y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 17, en donde la célula es capaz de expresar un compuesto
10 que comprende un primer polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10 y un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 17.

En una modalidad, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que
15 comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11 y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 18, en donde la célula es capaz de expresar un compuesto
20 que comprende un primer polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11 y un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 18.

En una modalidad, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que
25 comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un

polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12 y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16, en donde la célula es capaz de expresar un compuesto
5 que comprende un primer polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12 y un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16.

En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para producir un compuesto que comprende dos
10 primeros polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12 y dos segundos polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18, que comprende cultivar la célula de mamífero de la presente
15 invención bajo condiciones de modo que el compuesto se expresa, y recuperar el compuesto expresado.

En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para producir un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos de SEC ID NO: 9 y dos segundos
20 polipéptidos de SEC ID NO: 16, que comprende cultivar la célula de mamífero de la presente invención bajo condiciones de modo que el compuesto se expresa, y recuperar el compuesto expresado.

En una modalidad, la presente invención proporciona
25 un proceso para producir un compuesto que comprende dos

primeros polipéptidos de SEC ID NO: 10 y dos segundos polipéptidos de SEC ID NO: 17, que comprende cultivar la célula de mamífero de la presente invención bajo condiciones de modo que el compuesto se expresa, y recuperar el compuesto expresado.

En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para producir un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos de SEC ID NO: 11 y dos segundos polipéptidos de SEC ID NO: 18, que comprende cultivar la célula de mamífero de la presente invención bajo condiciones de modo que el compuesto se expresa, y recuperar el compuesto expresado.

En una modalidad, la presente invención proporciona un proceso para producir un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos de SEC ID NO: 12 y dos segundos polipéptidos de SEC ID NO: 16, que comprende cultivar la célula de mamífero de la presente invención bajo condiciones de modo que el compuesto se expresa, y recuperar el compuesto expresado.

En una modalidad de los procesos descritos anteriormente, las dos secuencias de polinucleótidos en la célula de mamífero de la presente invención son parte de la misma molécula de ácido nucleico.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto obtenible por uno de los procesos mencionados

anteriormente.

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de la presente invención, y un portador, diluyente, o excipiente
5 aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención. En una modalidad
10 adicional, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o
15 carcinoma hepatocelular. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de
20 ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del tracto biliar, o carcinoma hepatocelular. En una modalidad adicional, estos métodos comprenden la administración de una cantidad efectiva del compuesto de la presente invención en combinación
25 simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes

anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de cisplatino, carboplatino, doxorubicina liposómica, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, partículas unidas a la proteína paclitaxel para
5 suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina, ramucirumab, FOLFOX (leucovorin, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorin, fluorouracilo, y irinotecan), y cetuximab.

En una modalidad adicional, estos métodos
10 comprenden la administración de una cantidad efectiva del compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes de inmunología seleccionados del grupo que consiste de nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, y durvalumab.

15 En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más
20 agentes de inmunología, en donde el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, o cáncer testicular, y en donde los agentes de inmunología se seleccionan del grupo que consiste de nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, y durvalumab.

25 En una modalidad, la presente invención proporciona

un método para tratar cáncer de mama, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención. En una modalidad adicional, estos métodos para tratar cáncer

5 de mama comprenden la administración de una cantidad efectiva del compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina,

10 partículas unidas a la proteína paclitaxel para suspensión inyectable, ixabepilona, y capecitabina.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de ovarios, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una

15 cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención. En una modalidad adicional, estos métodos para tratar cáncer de ovarios comprenden la administración de una cantidad efectiva del compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más

20 agentes anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de cisplatino, carboplatino, y doxorubicina liposómica.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer gástrico, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una

25 cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención.

En una modalidad adicional, estos métodos para tratar cáncer gástrico comprenden la administración de una cantidad efectiva del compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con
5 ramucirumab.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar carcinoma hepatocelular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención.
10 En una modalidad adicional, estos métodos para tratar carcinoma hepatocelular comprenden la administración de una cantidad efectiva del compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con ramucirumab.

15 En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer colorrectal, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención.
En una modalidad adicional, estos métodos para tratar cáncer
20 colorrectal comprenden la administración de una cantidad efectiva del compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de FOLFOX (leucovorin, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI
25 (leucovorin, fluorouracilo, y irinotecan), y cetuximab.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención, para uso en terapia. En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención, para uso en el

5 tratamiento de cáncer. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular. En una

10 modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del tracto

15 biliar, o carcinoma hepatocelular. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer, el compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de cisplatino, carboplatino,

20 doxorubicina liposómica, docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, partículas unidas a la proteína paclitaxel para suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina, ramucirumab, FOLFOX (leucovorin, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorin, fluorouracilo, y

25 irinotecan), y cetuximab.

En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer, el compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes de inmuno-oncología seleccionados del grupo que
5 consiste de nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, y durvalumab.

En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer, el compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o
10 más agentes de inmuno-oncología, en donde el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, o cáncer testicular, y en donde los agentes de inmuno-oncología se seleccionan del grupo que consiste de nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, y durvalumab.

15 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer de mama. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer de mama, el compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o
20 secuencial con uno o más agentes anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina, eribulina, partículas unidas a la proteína paclitaxel para suspensión inyectable, ixabepilona, y capecitabina.

25 En una modalidad, la presente invención proporciona

un compuesto de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer de ovarios. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer de ovarios, el compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, 5 o secuencial con uno o más agentes anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de cisplatino, carboplatino, y doxorubicina liposómica.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención, para uso en el 10 tratamiento de cáncer gástrico. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer gástrico, el compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con ramucirumab.

En una modalidad, la presente invención proporciona 15 un compuesto de la presente invención, para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular, el compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más 20 agentes anti-tumor seleccionados del grupo ramucirumab.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención, para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal. En una modalidad adicional, para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal, 25 el compuesto de la presente invención en combinación

simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de FOLFOX (leucovorin, fluorouracilo, y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorin, fluorouracilo, y irinotecan), y cetuximab.

5 En una modalidad, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para la
10 manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente
15 invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del tracto biliar, o carcinoma hepatocelular.

20 En una modalidad adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial con uno o más agentes anti-tumor seleccionados del grupo que consiste de cisplatino, carboplatino, doxorubicina liposómica,
25 docetaxel, ciclofosfamida y doxorubicina, navelbina,

eribulina, partículas unidas a la proteína paclitaxel para
suspensión inyectable, ixabepilona, capecitabina,
ramucirumab, FOLFOX (leucovorin, fluorouracilo, y
oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorin, fluorouracilo, y
5 irinotecan), y cetuximab para la manufactura de un
medicamento para el tratamiento de cáncer.

Un compuesto de la presente invención es un
complejo de polipéptidos modificado genéticamente que no se
presenta naturalmente. Una molécula de ADN de la presente
10 invención es una molécula de ADN que no se presenta
naturalmente que comprende una secuencia de polinucleótidos
que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de
aminoácidos de uno de los polipéptidos en un compuesto de la
presente invención.

15 La porción de anticuerpo del compuesto de la
presente invención se diseña para tener CDR modificadas
genéticamente y tener algunas porciones del anticuerpo (todo
o partes de las regiones de armazón, regiones bisagra, y
regiones constantes) que son de origen humano que son
20 idénticas o sustancialmente idénticas (sustancialmente
humanas) con regiones de armazón y constantes derivadas de
las secuencias genómicas humanas. Las regiones de armazón,
regiones bisagra, y regiones constantes completamente humanas
son aquellas secuencias de línea germinal humana así como
25 secuencias con mutaciones somáticas que se presentan

naturalmente y aquellas con mutaciones modificadas genéticamente. La porción de anticuerpo del compuesto de la presente invención puede comprender regiones de armazón, bisagra, o constantes derivadas de una región de armazón, bisagra, o constante completamente humana que contiene una o
5 más sustituciones, supresiones, o adiciones de aminoácidos en esta. Además, la porción de anticuerpo del compuesto de la presente invención es de manera preferible sustancialmente no inmunogénica en humanos.

10 La porción de anticuerpo del compuesto de la presente invención es un anticuerpo tipo IgG y tiene cuatro cadenas de aminoácidos (dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras") que se estabilizan covalentemente vía enlaces de disulfuro intra- e inter-cadena. Cada cadena pesada está
15 comprendida de una HCVR N-terminal y una región constante de cadena pesada ("HCCR"). Cada cadena ligera está comprendida de una LCVR y una región constante de cadena ligera ("LCCR"). Cuando se expresan en ciertos sistemas biológicos, los anticuerpos que tienen secuencias de Fc humano nativo son
20 glicosilados en la región Fc. Típicamente, la glicosilación ocurre en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glicosilación altamente conservado. Los N-glicanos típicamente se unen a la asparagina. Los anticuerpos pueden ser glicosilados en otras posiciones también.

25 Opcionalmente, la porción de anticuerpo del

compuesto de la presente invención contiene una porción Fc la cual se deriva de una región Fc de IgG₄ debido a una capacidad reducida de acoplar los mecanismos inflamatorios mediados por el receptor de Fc o de activar el complemento
5 que resulta en la función efectora reducida.

Además, la porción de anticuerpo de ciertos compuestos de la presente invención contiene una porción Fc de IgG₄-PAA. La porción Fc de IgG₄-PAA tiene una mutación de serina a prolina en la posición 224, una mutación de
10 fenilalanina a alanina en la posición 230, y una mutación de leucina a alanina en la posición 231. La mutación S224P es una mutación de bisagra que previene la formación de medio anticuerpo (fenómeno del intercambio dinámico de medias moléculas en anticuerpos de IgG₄). Las mutaciones F230A y
15 L231A adicionalmente reducen la función efectora del isotipo de IgG₄ humana ya bajo.

Una molécula de ADN aislado que codifica una región HCVR se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que
20 codifica la HCVR a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada. Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanos, así como de otro mamífero, son conocidas en la técnica. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por ejemplo,
25 por amplificación de PCR estándar.

Un ADN aislado que codifica una región LCVR se puede convertir a un gen de cadena ligera de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de
5 cadena ligera. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humanos, así como de otro mamífero, son conocidas en la técnica. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una
10 región constante kappa o lambda.

Un "fragmento variable de cadena única" o "scFv" o "polipéptido de scFv" se refiere a un polipéptido plegado único modificado genéticamente que no se presenta naturalmente que comprende la LCVR y la HCVR de un anticuerpo
15 enlazado a través de una molécula de enlazante de scFv. La porción de polipéptido de scFv del compuesto de la presente invención es un scFv modificado genéticamente que no se presenta naturalmente que se ha diseñado para tener CDR modificadas genéticamente y tener algunas porciones del scFv
20 (todo o partes de los armazones) que son de origen humano que son idénticas o sustancialmente idénticas (sustancialmente humanas) con los armazones derivados de las secuencias genómicas humanas. Los armazones completamente humanos son aquellas secuencias de línea germinal humana así como
25 secuencias con mutaciones somáticas que se presentan

naturalmente y aquellas con mutaciones modificadas genéticamente. La porción de polipéptido de scFv del compuesto de la presente invención puede comprender un armazón derivado de un armazón completamente humano que
5 contiene una o más sustituciones, supresiones, o adiciones de aminoácidos en esta. Además, la porción de polipéptido de scFv del compuesto de la presente invención es de manera preferible sustancialmente no inmunogénica en humanos. Opcionalmente, la porción de polipéptido de scFv del
10 compuesto puede tener 44-100 disulfuro de cisteína 44 en HCVR y cisteína 100 en LCVR (la numeración Cys44 y Cys100 corresponde con una numeración que inicia con el primer aminoácido del polipéptido de scFv). En tal polipéptido de scFv, los dominios de HCVR y LCVR ya sea pueden estar en el
15 orden de HCVR - enlazante de scFv - LCVR o LCVR - enlazante de scFv - HCVR. El enlazante de scFv puede ser un enlazante de péptido flexible rico en glicina el cual hace posible que las cadenas de HCVR y LCVR sean plegadas como una unidad monomérica funcional para reconocer un antígeno.
20 Opcionalmente, el enlazante de scFv es un enlazante rico en glicina tal como un enlazante 2x G4S, un enlazante 3x G4S, un enlazante 4x G4S, o un enlazante 5x G4S.

La fusión de un scFv a un anticuerpo puede permitir que múltiples estructuras se formen durante la expresión y
25 secreción. En primer lugar, los elementos de scFv fusionados

a un anticuerpo pueden plegarse de manera independiente a través de una interacción intramolecular por la cual los elementos individuales de HCVR y LCVR ubicados dentro del mismo polipéptido se pliegan para formar dos unidades separadas y autónomas, referidas en la presente como Mab-scFv. En segundo lugar, a través de una vía de plegado alternativa, los elementos de scFv fusionados a un anticuerpo pueden plegarse a través de interacciones intermoleculares por las cuales una HCVR presente en un polipéptido se plegará con una LCVR presente en el polipéptido adyacente para formar una especie co-plegada única, referida aquí como Mab-Diacuerpo.

El término "enlazante" y "enlazante de scFv" se refiere a enlazantes de péptido ricos en glicina. Los "enlazantes" se utilizan en ciertas modalidades de la invención para enlazar el anticuerpo al scFv, y los "enlazantes de scFv" se utilizan en ciertas modalidades de la invención para enlazar la LCVR del scFv a la HCVR del scFv. Preferiblemente, los enlazantes de péptido son péptidos ricos en glicina con al menos 5 aminoácidos, preferiblemente al menos 10 aminoácidos, más preferiblemente entre 10 y 50 aminoácidos. En algunas modalidades de la presente invención, el enlazante de péptido rico en glicina 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). Por ejemplo, en algunas modalidades de la presente

invención, el enlazante de péptido rico en glicina es $(G_xS)_n$ con G=glicina, S=serina, $x=4$ y $n=2, 3, 4$ o 5 (es decir, GGGGSGGGGS (SEC ID NO: 34), GGGGSGGGSGGGGS (SEC ID NO: 35), GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEC ID NO: 36), o
5 GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEC ID NO: 37), respectivamente.

Los polinucleótidos de la presente invención serán expresados en una célula huésped después que las secuencias se han enlazado operativamente a una secuencia de control de expresión. Los vectores de expresión típicamente son
10 replicables en los organismos huéspedes como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina, y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de las células
15 transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

El compuesto de la presente invención se puede producir fácilmente en células de mamífero tales como células CHO, NS0, HEK293 o COS. Las células huéspedes se cultivan utilizando técnicas bien conocidas en el arte.

20 Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del compuesto y secuencias de control de expresión) se pueden transferir en la célula huésped por métodos bien conocidos, los cuales varían
25 dependiendo del tipo de huésped celular.

Se pueden emplear diversos métodos de purificación de proteínas y tales métodos son conocidos en el arte y descritos, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) and Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

En otra modalidad de la presente invención, el compuesto, o los ácidos nucleicos que codifican el mismo, se proporciona en forma aislada. Como se utiliza en la presente, el término "aislado" se refiere a una proteína, péptido, o ácido nucleico el cual está libre o sustancialmente libre de cualquier otra especie macromolecular encontrada en un ambiente celular. "Sustancialmente libre" como se utiliza en la presente significa la proteína, péptido, o ácido nucleico de interés que comprende más de 80% (sobre una base molar) de la especie macromolecular presente, preferiblemente más de 90%, y más preferiblemente más de 95%.

El compuesto de la presente invención, o composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo, se puede administrar por rutas parenterales (por ejemplo, subcutánea e intravenosa). Un compuesto de la presente invención se puede administrar a un paciente solo con portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables en dosis únicas o múltiples. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar por métodos bien conocidos en el arte (por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of*

Pharmacy, 19th ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.) y comprenden un compuesto, como se describe en la presente, y uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 El término "tratando" (o "tratar" o "tratamiento") se refiere a ralentizar, interrumpir, parar, aliviar, detener, reducir, o invertir la progresión o severidad de un síntoma, trastorno, afección, o enfermedad existente. Un paciente se refiere a un mamífero, preferiblemente un humano
10 con una enfermedad, trastorno, o afección que se beneficiaría de la inhibición del VEGFR2 y/o Ang2.

"Unión" como se utiliza en la presente con referencia a la afinidad de un compuesto, anticuerpo, o polipéptido de scFv para VEGFR2 humano o Ang2 humana se
15 pretende que signifique, a menos que se indique de otra manera, una K_D menor que aproximadamente 1×10^{-8} M, preferiblemente, menor que aproximadamente 1×10^{-9} M como se determina por los métodos comunes conocidos en el arte, incluyendo el uso de un biosensor de resonancia de plasmón
20 superficial (SPR) a 25°C o 37°C esencialmente como se describe en la presente. El término "selectivo" o "selectividad" utilizado en la presente con referencia a un compuesto de la presente invención se refiere a un compuesto que se une a un objetivo, tal como Ang2 humana, con una K_D de aproximadamente
25 1000, 500, 200, 100, 50, o aproximadamente 10 veces menor que

el compuesto se une a otras proteínas, incluyendo el miembro de la familia de objetivo tal como Ang1 humana, como se mide por resonancia de plasmón superficial a 25°C o 37°C. Adicional, o alternativamente, un compuesto selectivo de Ang2
5 de la presente invención se une a Ang2 humana pero no se une o sólo de manera mínima se une a Ang1 humana cuando se somete a ensayo por los métodos descritos en el Ejemplo a continuación.

"Cantidad efectiva" significa la cantidad de un
10 compuesto de la presente invención o composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que se está buscando por el investigador, doctor
15 médico, u otro médico clínico. Una cantidad efectiva del compuesto puede variar de acuerdo con los factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso de la persona, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en la persona. Una cantidad efectiva también es una
20 en la cual cualquier efecto tóxico o nocivo del compuesto se pondera por los efectos terapéuticamente benéficos.

Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Expresión y purificación del compuesto

Los polipéptidos de las porciones de anticuerpo, las porciones scFv, y el anticuerpo-enlazante-sFv del Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, y Compuesto F, y las
5 secuencias de nucleótidos que codifican los mismos, se listan a continuación en la sección titulada "Secuencias de aminoácidos y nucleótidos". Además, las SEC ID NOs para las porciones de anticuerpo, las porciones de scFv, y el anticuerpo-enlazante-scFv del Compuesto C, Compuesto D,
10 Compuesto E, y Compuesto F se muestran en la Tabla 1.

Los compuestos de la presente invención, incluyendo, pero no limitado al Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, y Compuesto F, se puede producir y purificar esencialmente como sigue. Una célula huésped apropiada, tal
15 como HEK 293 o CHO, puede ser ya sea temporalmente o establemente transfectada con un sistema de expresión para secretar compuestos utilizando una relación de vector de HC-enlazante-scFv:LC óptima predeterminada (tal como 1:3 o 1:2) o un sistema de vector único que codifica tanto a HC-enlazante-scFv como LC. Los medios aclarados, en los cuales
20 el compuesto se ha secretado, se pueden purificar utilizando cualquiera de muchas técnicas comúnmente utilizadas. Por ejemplo, el medio se puede aplicar de manera conveniente a una columna MabSelect (GE Healthcare), o columna KappaSelect
25 (GE Healthcare) para el fragmento Fab, que se ha equilibrado

con un amortiguador compatible, tal como solución salina amortiguada con fosfato (pH 7.4). La columna se puede lavar para remover los componentes de unión no específica. El compuesto unido se puede eluir, por ejemplo, por un gradiente

5 de pH (tal como amortiguador Tris 20 mM pH 7 a amortiguador de citrato de sodio 10 mM pH 3.0, o solución salina amortiguada con fosfato pH 7.4 a amortiguador de glicina 100 mM pH 3.0). Las fracciones de compuesto se pueden detectar, tales como por SDS-PAGE, y luego se pueden agrupar. La

10 purificación adicional es opcional, dependiendo del uso propuesto. El compuesto se puede concentrar y/o filtrar estéril utilizando técnicas comunes. Los multímeros y agregados solubles se pueden remover efectivamente por técnicas comunes, incluyendo la exclusión por tamaño,

15 interacción hidrofóbica, intercambio iónico, multimodal, o cromatografía con hidroxapatita. La pureza del compuesto después de estas etapas de cromatografía es mayor que 95%. El producto se puede congelar inmediatamente a -70°C o se puede liofilizar.

20

Tabla 1: SEC ID NOs

	Compuesto C	Compuesto D	Compuesto E	Compuesto F
HCVR de anticuerpo	1	2	3	4
HC de anticuerpo	5	6	7	8
HC de anticuerpo +	9	10	11	12

25

	enlazante + polipéptido de scFv				
	LCVR de anticuerpo	13	14	15	13
	LC de anticuerpo	16	17	18	16
5	polipéptido de scFv	19	19	19	20
	HCVR de polipéptido de scFv	21	21	21	22
10	LCVR de polipéptido de scFv	23	23	23	24

Ensayos

Cinética, afinidad, y selectividad de unión

La cinética, afinidad, y selectividad de unión a Ang2 humana y a VEGFR2 humano, para compuestos de la presente invención, se pueden determinar por el uso de un biosensor de resonancia de plasmón superficial tal como un Biacore® 2000, Biacore® 3000, o un Biacore® T100 (GE HealthCare) de acuerdo con los métodos conocidos en el arte.

La cinética y constante de disociación en equilibrio (K_D) para múltiples especies de Ang2 soluble (humana, cinomolgus, de ratón, de conejo y de perro) y dominio extracelular de VEGFR2 (ECD) (humano, cinomolgus, de conejo y de perro) se pueden determinar para los compuestos de la presente invención a 25°C o 37°C utilizando métodos de

resonancia de plasmón superficial Biacore. La Ang2 humana y VEGFR2-ECD se pueden adquirir de R&D Systems y Sino Biological, respectivamente. La superficie de la Proteína A para la captura de anticuerpos se puede preparar utilizando los siguientes métodos. La inmovilización de la Proteína A soluble (Calbiochem, Cat: 539202) o en un CM4 (Biacore # BR-1005-34) o CM5 (Biacore #BR-1000-99) se puede preparar utilizando el método de acoplamiento de amina EDC/NHS (Biacore # BR-1000-50). Brevemente, las superficie de todas las cuatro celdas de flujo se puede activar inyectando una mezcla 1:1 de EDC/NHS durante siete minutos a 10 μ L/min. Después de lo cual, la proteína A soluble se puede diluir a 50-100 μ g/mL in amortiguador de acetato 10 mM, pH 4.5, y se inmoviliza durante siete minutos sobre la celda de flujo (Fc) 2, 3 o 4 a una velocidad de flujo de 10 μ L/min. Los sitios sin reaccionar que permanecen aún en la superficie de microplaqueta se pueden bloquear con una inyección de siete minutos de etanolamina a 10 μ L/min. El amortiguador de corrida puede ser HBS-EP+ (Biacore # BR-1006-69). Las muestras de compuesto se pueden preparar a 1 μ g/mL por dilución en el amortiguador de corrida. Se pueden preparar concentraciones discretas de ligandos de Ang2 que varían desde 50 nM a 1.56 nM utilizando una dilución en serie de dos partes en el amortiguador de corrida. Cada ciclo de análisis puede consistir de una serie de cinco etapas separadas: (1)

captura del compuesto sobre celdas de flujo separadas (Fc2, Fc3, y Fc4), (2) inyección (utilizando kinject) de 250 μL (tiempo de contacto de superficie de 300 segundos) de concentraciones discretas de Ang2 o VEGFR2-ECD sobre todas las Fc a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, (3) retorno al flujo de amortiguador durante 20 minutos para monitorear la fase de disociación, (4) regeneración de las superficies de microplaquetas con una inyección de 10 μL (tiempo de contacto de 30 segundos) de glicina 10 mM, pH 1.5, (5) equilibrio de la superficie de microplaqueta con una inyección de 15 μL (tiempo de contacto de 45 segundos) de amortiguador de corrida HBS-EP+. Los datos resultantes se pueden procesar utilizando doble-referenciado estándar y se ajustan a un modelo de unión 1:1 utilizando el software Biacore 2000 Evaluation, versión 4.1, para determinar la velocidad de asociación (k_{on} , unidades $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), velocidad de disociación (k_{off} , unidades s^{-1}). El cálculo de la constante de disociación en equilibrio (K_{D}) se puede calcular de la siguiente relación, $K_{\text{D}} = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, y se presenta en unidades molares.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, y Compuesto F se unen a la Ang2 humana a 25°C con una K_{D} en el intervalo de 407 pM a 673 pM (Tabla 2). El Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, y Compuesto F se unen al VEGFR2 humano-ECD a 25°C con una K_{D} en el intervalo de 528

pM a 1110 pM (Tabla 3). Estos compuestos de la presente invención demuestran alta afinidad tanto para la Ang2 humana como el VEGFR2 humano.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto F exhibe cinéticas y afinidades de unión comparables para la Ang2 humana con relación a un anticuerpo de Ang2 con las mismas HCDR y LCDR como la porción de polipéptido de scFv del Compuesto F (Tablas 4 y 5). Esto demuestra que la potente cinética de unión del anticuerpo de Ang2 con las mismas HCDR y LCDR como la porción de polipéptido de scFv del Compuesto F se retiene en el Compuesto F.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto F se une a la Ang2 humana, de mono cinomolgus, de ratón, de conejo y de perro con altas afinidades comparables, y el Compuesto F se une al VEGFR2 humano, de mono cinomolgus, de conejo y de perro con altas afinidades comparables.

Tabla 2

Biacore SPR hAng2 a 25°C			
	k_{on} (10^5 1/Ms)	k_{off} (10^{-4} 1/s)	K_D (pM)
Compuesto A	1.83	<0.1	<100pM
Compuesto B	2.85	<0.1	<100pM
Compuesto C	2.26	1.05	462

Compuesto D	1.75	0.86	489
Compuesto E	2.39	0.97	407
Compuesto F	1.56	1.05	673

Tabla 3

5

Biacore SPR hVEGFR2-ECD a 25°C			
	k_{on} (10^5 1/Ms)	k_{off} (10^{-4} 1/s)	K_D (pM)
Compuesto A	0.68	0.48	711
Compuesto B	0.81	0.41	513
Compuesto C	0.38	0.20	528
Compuesto D	0.34	0.29	860
Compuesto E	0.32	0.35	1110
Compuesto F	0.25	0.18	721

10

Tabla 4

15

Anticuerpo de Ang2 (mismas HCDR/LCDR que la porción de polipéptido de scFv del Comp. F)			
Biacore SPR Unión de Ang2 a 37°C (n=3)			
	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
Ang2 humana	$1.0 (\pm 0.4) \times 10^6$	$0.7 (\pm 0.2) \times 10^{-4}$	80 ± 50
Ang2 de cinomolgus	$2.7 (\pm 0.2) \times 10^6$	$2.9 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	107 ± 6
Ang2 de ratón	$1.0 (\pm 0.2) \times 10^6$	$1.1 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	109 ± 9
Ang2 de conejo	$7.3 (\pm 1.9) \times 10^5$	$1.5 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	210 ± 40
Ang2 de perro	$7.9 (\pm 3.2) \times 10^5$	$1.1 (\pm 0.4) \times 10^{-4}$	140 ± 10

20

Tabla 5

Compuesto F Biacore SPR Unión de Ang2 a 37°C (n=3)			
	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
Ang2 humana	$8.2 (\pm 2.4) \times 10^5$	$0.7 (\pm 0.3) \times 10^{-4}$	100 ± 70

25

Ang2 de cinomolgus	$9.6 (\pm 1.3) \times 10^5$	$2.8 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	300 ± 30
Ang2 de ratón	$3.6 (\pm 0.9) \times 10^5$	$0.8 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	230 ± 20
Ang2 de conejo	$2.7 (\pm 0.7) \times 10^5$	$1.1 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	420 ± 60
Ang2 de perro	$3.6 (\pm 1.6) \times 10^5$	$0.9 (\pm 0.3) \times 10^{-4}$	240 ± 30

5 **Tabla 6**

Compuesto F Biacore SPR Unión de VEGFR2-ECD a 37°C (n=3)			
	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
VEGFR2 humano	$2.5 (\pm 0.1) \times 10^4$	$1.2 (\pm 0.2) \times 10^{-4}$	4.6 ± 0.7
VEGFR2 de cinomolgus	$3.4 (\pm 0.2) \times 10^4$	$1.1 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	3.3 ± 0.4
VEGFR2 de conejo	$3.8 (\pm 0.5) \times 10^4$	$2.3 (\pm 0.1) \times 10^{-4}$	6.1 ± 1.0
VEGFR2 de perro	$4.1 (\pm 0.3) \times 10^4$	$1.5 (\pm 0.7) \times 10^{-3}$	37 ± 1

Inhibición de la interacción de Ang2 humana a Tie2 humana

El bloqueo de la Ang2 humana que se une a su receptor Tie2 humana por un compuesto de la presente invención se puede medir en un ensayo ELISA *in vitro* de fase sólida. El ensayo *in vitro* basado en células mencionado anteriormente también se puede utilizar para establecer la actividad de bloqueo comparable de un compuesto de la presente para un anticuerpo de Ang2 con las mismas secuencias de HCDR y LCDR como la porción de polipéptido de scFv del compuesto.

Para el ensayo, las placas de ELISA de 96 cavidades de alta unión (Costar #2592) se pueden recubrir con 4 µg/ml (en 100 µl) de Tie2-Fc humana recombinante (R&D Systems #313-TI), durante la noche a temperatura ambiente. Las placas se

pueden lavar 3X con TBST (solución salina amortiguada con Tris que contiene 0.05% Tween 20) y luego se pueden bloquear con 300 µl por cavidad de amortiguador de bloqueo (0.5% BSA/D-PBS) (BSA: Jackson ImmunoResearch #001-000-162; libre de IgG, libre de proteasa) durante 1-2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital. Durante la etapa de bloqueo, en placas de cavidades múltiples de polipropileno separadas, 75 µl de 2X anticuerpos de prueba (diluidos en serie 1:3 en amortiguador de bloque) se pueden añadir con 75 µl de 2X Ang2 humana biotinilada (R&D Systems #BT623) (también diluida en amortiguador de bloqueo). Las mezclas anticuerpo/Ang2 biotinilada luego se pueden incubar durante 1 hora a 37°C (la concentración de Ang2 biotinilada final fue 100 ng/ml). La solución de bloqueo se puede remover de las placas de ELISA recubiertas con Tie2-Fc, después de lo cual se pueden añadir 50 µl por cavidad de las mezclas de anticuerpo/Ang2 biotinilada (en cavidades duplicadas). Las placas luego se pueden incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, se cubren con selladores de placa, en un agitador orbital. Las placas luego se pueden lavar 3X, después de lo cual se pueden añadir 100 µl por cavidad de estreptavidina-HRP (R&D Systems #DY998, se puede diluir 1:200 en amortiguador de bloqueo). Las placas luego se pueden incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente, se cubren con selladores de placa, en un agitador orbital. Las placas luego se pueden lavar de

nuevo 3X.

Las placas luego se pueden desarrollar añadiendo 100 μ l por cavidad de sustrato One Component TMB (se puede calentar a temperatura ambiente) (Surmodics/BioFX Labs #TMBW-
5 1000-01). El desarrollo se puede dejar progresar durante 10 minutos a temperatura ambiente (las placas se pueden cubrir con papel aluminio). El desarrollo se puede detener con 100 μ l por cavidad de solución de detención ácida (solución de detención TMB, Surmodics/BioFX Labs #LSTP-1000-01). Las
10 placas se pueden mezclar en un agitador orbital después de lo cual se pueden leer a 450 nm en un lector de ELISA (Molecular Devices SpectraMax 190), utilizando el software SOFTmax PRO 5.4.1 (Molecular Devices Corp.). Los valores de A450 reflejan la cantidad de Ang2 biotinilada que permanece unida a Tie-2-
15 Fc. La reducción de los valores de A450 refleja el bloqueo de la unión de Ang2 biotinilada a Tie-2-Fc.

Los valores de IC50 para la inhibición de la unión de Ang2 a Tie-2 se pueden calcular con GraphPad Prism 6, utilizando valores X transformados logarítmicamente. El
20 análisis de regresión no lineal (ajuste de curva) (respuesta de dosis sigmoidal, pendiente variable) se puede realizar en los datos transformados logarítmicamente para obtener los valores de IC50. Si un experimento se realiza más de una vez, se puede calcular el valor de IC50 medio geométrico (y 95% de
25 intervalo de confianza) entre los experimentos.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto F y un anticuerpo de Ang2 con las mismas HCDR y LCDR como la porción de polipéptido de scFv del Compuesto F dan como resultado valores de IC50 medios geométricos (n=2) de 0.034 nM y 0.027 nM respectivamente. La dosis del Compuesto F bloquea de manera dependiente la unión de Ang2 humana a Tie-2 humana comparativamente con el anticuerpo de Ang2 con las mismas HCDR y LCDR como la porción de polipéptido de scFv del Compuesto F. Estos datos indican que la porción de polipéptido de scFv de Ang2 del compuesto ha mantenido potencia en este ensayo que es comparable con la del anticuerpo de Ang2.

Neutralización de la fosforilación inducida por Ang2 de Tie2, pero no la fosforilación mediada por Ang1.

La inhibición *in vitro* basada en células de la Ang2 humana por un compuesto de la presente invención se puede medir en un ensayo basado en células donde la Ang1 y la Ang2 se unen a e inducen la fosforilación de de Tie2 humana en una manera dependiente de la dosis. El ensayo *in vitro* basado en células se puede utilizar para evaluar la capacidad de los compuestos de la presente invención para neutralizar selectivamente la fosforilación mediada por Ang2 y no mediada por Ang1 del receptor de Tie-2 en una manera dependiente de

la dosis. Un anticuerpo de Ang2, un anticuerpo de Ang1, y un anticuerpo de isotipo PAA de IgG4 humana de control se pueden incluir como controles positivo y negativo, respectivamente.

La línea celular de CHO-Tie2 se puede generar por transfección estable de un receptor de Tie2 humana de longitud completa (con una marca 3X FLAG en el C terminal). Las células CHO-Tie2 se pueden mantener en medio completo de Hams F-12 (CellGro/Mediatech #10-080-CV), 10% FBS inactivado con calor (Life Technologies/Invitrogen #10082-147), 1X antibiótico-antimicótico (Life Technologies/Invitrogen #15240-062), 1.25 mg/ml de G418 (Corning Cellgro #30-234-CI), 10 µg/ml de puromicina (Calbiochem #540411), y 0.078% bicarbonato de sodio (Thermo Hyclone #SH30033.01).

Para el ensayo, las células CHO-Tie2 se pueden resuspender a 10,000 células por cavidad (en 100 µl de medio de crecimiento), en las 60 cavidades internas de placas de 96 cavidades recubiertas con poli-lisina (BD Biocoat #356640). Se pueden colocar 200 µl de D-PBS en las cavidades de borde para reducir la evaporación. Las células se pueden incubar durante la noche a 37°C, 95% HR, 5% CO₂. Al siguiente día, las células se pueden lavar una vez y el medio se puede reemplazar con 100 µl de medio de crecimiento libre de suero que contiene 0.1% BSA (Sigma #A7979, baja endotoxina). Las células luego se pueden recolectar durante 7.5 a 24 horas en medio libre de suero a 37°C, 95% HR, 5% CO₂. Durante el

período de recolección, los compuestos (a 6X las concentraciones finales) se pueden diluir en serie 1:2 en placas de polipropileno en medio de crecimiento libre de suero que contiene 0.1% BSA. La Ang2 humana (R&D Systems #623-AN, reconstituida en D-PBS/0.1% BSA) y la Ang1 humana (R&D Systems #923-AN, reconstituida en D-PBS/0.1% BSA) también se pueden diluir a 6X la concentración final en medio de crecimiento libre de suero que contiene 0.1% BSA. Los compuestos y el ligando de Ang2 o Ang1 luego se pueden mezclar a una relación 1:1 en placas de polipropileno y se pueden incubar durante 1 hora a 37°C. Las mezclas de compuesto/ligando luego se pueden añadir a 50 µl por cavidad a las células (en cavidades triplicadas por tratamiento) y se pueden incubar durante 13 minutos a 21 horas a 37°C, 95% HR, 5% CO₂. El intervalo de concentración final de los compuestos puede ser 0.0625 - 283 nM, y la concentración final de la Ang2 humana y la Ang1 puede ser 0.3 µg/ml (aproximadamente 6 nM) y 0.5 µg/ml (aproximadamente 8.9 nM), respectivamente. Después del tiempo de incubación, el medio se puede remover rápida y completamente de las células, y las células se pueden someter a lisis en 60 µl por cavidad de 1X amortiguador de lisis Tris frío (Meso Scale Discovery #R60TX; NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1% Triton X-100) el cual puede contener inhibidores de proteasa y fosfatasa recién añadidos (1X cóctel de inhibidor de

proteasa, Sigma #P8340; 1X cóctel de inhibidor de fosfatasa 2, Sigma #P5726; 1X cóctel de inhibidor de fosfatasa 3, Sigma #P0044; ortovanadato de sodio activado final 1 mM (EMD Chemicals #567540)). Las placas luego se pueden colocar en
5 hielo durante 10 minutos, después de lo cual se pueden colocar en un agitador orbital a baja velocidad durante 25 minutos a 4°C. Las placas luego se pueden sellar y congelar a -80°C.

El día antes del análisis para fosfo-Tie2 (con un
10 kit de ELISA DuoSet de fosfo-Tie2 humana de R&D Systems, #DYC2720), las placas de ELISA de alta unión (Greiner BioOne, #655081) se pueden recubrir durante la noche a 4°C con 4 µg/ml de anticuerpo de captura de Tie2 total anti-humano de ratón en 1X amortiguador de recubrimiento de ELISA
15 (Surmodics/BioFX Labs #COAT-1000-01).

El día de la medición de fosfo-Tie2, las placas que contienen lisados se pueden descongelar en hielo. Las placas de ELISA recubiertas se pueden lavar con amortiguador de lavado (1X TBST que contiene 0.05% Tween 20) y bloquear con
20 300 µl por cavidad de amortiguador de bloqueo (1% BSA (Jackson ImmunoResearch #001-000-162; libre de IgG, libre de proteasa), 0.01% azida de sodio) por un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente en un agitador orbital (mientras se cubre con selladores de placas). Durante el bloqueo, los
25 lisados se pueden diluir 1:5 a 1:10 en placas de

polipropileno en amortiguador de lisis frío que contiene inhibidores de proteasa y fosfatasa. Las placas de ELISA se pueden bloquear y lavar 4X, y se pueden añadir 100 µl por cavidad de lisados diluidos (o estándares de ELISA de fosfo-Tie2) e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, se cubren con selladores, en un agitador orbital. Las placas se pueden lavar 4X y se pueden añadir 100 µl por cavidad de tirosina anti-fosfo de ratón conjugada con HRP (diluida como se recomienda en el vial, en TBST/0.1% BSA). Las placas luego se pueden cubrir con selladores, e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital. Las placas luego se pueden lavar 6X y se puede asegurar la remoción del líquido de las cavidades. Las placas luego se pueden desarrollar añadiendo 100 µl por cavidad de sustrato One Component TMB (Surmodics/BioFX Labs #TMBW-1000-01). Las placas se pueden dejar desarrollar durante 20 o 30 minutos a temperatura ambiente cubiertas con papel aluminio. El desarrollo se puede detener con 100 µl por cavidad de solución de detención ácida (solución de detención TMB, Surmodics/BioFX Labs #LSTP-1000-01). Las placas luego se pueden mezclar en un agitador orbital. Las placas de ELISA se pueden leer a 450 nm en un lector de ELISA (Molecular Devices SpectraMax 190), utilizando el software SOFTmax PRO 5.4.1 (Molecular Devices Corp.). Los valores de fosfo-Tie2 para las muestras se pueden obtener de la curva estándar (ajuste

logarítmico de 4 parámetros), y se pueden multiplicar por el factor de dilución de 5 o 10. El porcentaje de inhibición se puede calcular por la siguiente fórmula: (valor de pTie2 del tratamiento - valor de pTie2 medio de tratamiento solo con Ang2) / (valor medio de pTie2 solo de medio - valor medio de pTie2 de tratamiento solo con Ang2)*100.

Los valores de IC₅₀ para la inhibición de fosfo-Tie2 inducida por Ang2 se pueden calcular con GraphPad Prism 4, utilizando valores X transformados logarítmicamente. El análisis de regresión no lineal (ajuste de curva) (respuesta de dosis sigmoidal, pendiente variable) se puede realizar en los datos transformados logarítmicamente para obtener valores de IC₅₀. Si un experimento se realiza más de una vez, se puede calcular el valor de IC₅₀ medio geométrico (y 95% de intervalo de confianza) entre los experimentos.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto F neutraliza de manera dependiente de la dosis la fosfo-Tie2 inducida por Ang2 humana en células CHO-Tie2 con una IC₅₀ de 0.587 nM (n=3) mientras que un anticuerpo de Ang2 con las mismas HCDR y LCDR como la porción de polipéptido de scFv del Compuesto F tiene una IC₅₀ de 0.773 nM. Los resultados indican que el Compuesto F neutraliza la fosfo-Tie2 inducida por Ang2, pero no neutraliza la fosfo-Tie2 inducida por Ang1 humana en células CHO-Tie-2 en comparación con el anticuerpo de Ang1 de

control positivo. Además, estos datos indican que la porción de polipéptido de scFv de Ang2 del Compuesto F ha mantenido potencia en este ensayo que es comparable con la del anticuerpo de Ang2 con las mismas HCDR y LCDR como la porción
5 de polipéptido de scFv del Compuesto F.

Neutralización de la fosforilación inducida por VEGF165 del VEGFR2

La inhibición *in vitro* basada en células del VEGFR2 humano se puede medir en un ensayo basado en células donde la
10 unión de VEGF165 al VEGFR2 en una línea celular que expresa VEGFR2, induce la fosforilación de VEGFR2 en una manera dependiente de la dosis. El ensayo mencionado anteriormente se puede utilizar para evaluar la capacidad de un compuesto
15 de la presente invención para neutralizar selectivamente la fosforilación mediada por VEGF165 del receptor VEGFR2 en una manera dependiente de la dosis. Un anticuerpo de VEGFR2 y un isotipo PAA de IgG4 humana de anticuerpo irrelevante se puede incluir como un control positivo y negativo, respectivamente.

20 Para el ensayo, las ECFC (células endoteliales formadoras de colonias, derivadas de progenitores endoteliales de sangre de cordón umbilical) humanas que expresan VEGFR2 (Endgenitor Technologies, Lote 100506-14-P4, pasos 10-12) se pueden sembrar a 14,000 células por cavidad
25 (en 100 μ l de medio de crecimiento), en las 60 cavidades

internas de placas de 96 cavidades recubiertas con colágeno I (BD Biocoat #35-4407) en medio de crecimiento: EGM-2MV BulletKit (Lonza #CC-4147). Los componentes de la bolsa EGM-2MV Singlequot incluida se pueden añadir a 500 ml de medio basal EBM-2, ajustado a 10% de concentración de FBS final (Life Technologies/Invitrogen #10082-147, inactivado con calor). Se pueden colocar 250 μ l del medio de crecimiento en las cavidades de borde para reducir la evaporación. Las células se pueden incubar a 37°C, 95% HR, 5% CO₂. Al siguiente día, el medio se puede remover y remplazar con 100 μ l de medio basal de EBM-2 libre de suero que contiene 0.1% BSA (Sigma #A7979, baja endotoxina). Las células se pueden recolectar durante 6 ½ horas a 37°C, 95% HR, 5% CO₂. Durante el período de recolección, los compuestos (a 6X las concentraciones finales) se pueden diluir en serie 1:4 en placas de polipropileno en EBM-2/0.1% BSA. El VEGF165 humano se puede diluir a 6X la concentración final en EBM-2/ 0.1% BSA. Los compuestos (o medio solo EBM-2/0.1% BSA) se pueden añadir por triplicado a 25 μ l a las células, y las células se pueden incubar durante 45 minutos a 37°C, 95% HR, 5% CO₂. Las células se pueden tratar con 25 μ l de 6X VEGF165 durante 5 minutos a 37°C, 95% HR, 5% CO₂. (El intervalo de concentración final de los compuestos puede ser 0.018 - 300 nM, y la concentración final del VEGF165 humano puede ser 0.16 nM). El medio se puede remover de las células, y las

células se pueden someter a lisis en 60 µl por cavidad de 1X amortiguador de lisis Tris frío (Meso Scale Discovery #R60TX; NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1% Triton X-100) que contiene 1X inhibidores de proteasa y fosfatasa recién añadidos (incluidos en el kit de ensayo de fosfo-VEGFR2). Las placas se pueden colocar en hielo durante 10 minutos, luego en un agitador orbital a baja velocidad durante 20 minutos a 4°C. Las placas luego se pueden sellar y congelar a -80°C.

El día de la medición de fosfo-VEGFR2, las placas que contienen lisados se pueden descongelar en hielo. Los niveles de fosfo-VEGFR2 se pueden medir utilizando un kit de lisado de células completas de fosfo-VEGFR2 (Tyr1054), (Meso Scale Discovery #K151DJD). Las placas de ensayo Meso Scale, pre-recubiertas con un anticuerpo contra fosfo-VEGFR2, se pueden bloquear con 150 µl por cavidad de amortiguador de bloqueo (3% bloqueador A en TBST) durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente en un agitador orbital (mientras se cubre con selladores de placa). Las placas se pueden lavar 3X con 1X amortiguador de lavado Meso Scale, y 50 µl de lisados se pueden añadir por cavidad (se pueden incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, se cubren con selladores, en un agitador orbital). Las placas se pueden lavar, y se pueden añadir 3X, 25 µl por cavidad de 1X VEGFR2 anti-total conjugado con MSD SULFO-TAG™ (diluido en diluyente de

anticuerpo recomendado por el fabricante), y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente, se cubren con selladores, en un agitador orbital. Las placas se pueden lavar 3X y se puede asegurar la remoción de líquido de las cavidades. A las placas se pueden añadir 150 ul por cavidad de 1X Amortiguador de lectura T, y luego se pueden leer inmediatamente en un generador de imágenes Meso Scale Discovery SECTOR MA6000. El porcentaje de inhibición se puede calcular por la siguiente fórmula: (valor de señal del tratamiento - valor de señal medio del tratamiento de VEGF+huIgG) / (valor de señal solo de medio de inanición medio - valor de señal medio del tratamiento de VEGF+huIgG)*100.

Los valores de IC50 para la inhibición de fosfo-VEGFR2 inducida por VEGF165 se pueden calcular con GraphPad Prism 6, utilizando valores X transformados logarítmicamente. El análisis de regresión no lineal (ajuste de curva) (respuesta de dosis sigmoidal, pendiente variable) se puede realizar en los datos transformados logarítmicamente para obtener valores de IC50. Si un experimento se realiza más de una vez, se puede calcular el valor de IC50 medio geométrico (y 95% de intervalo de confianza) entre los experimentos.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, la dosis del Compuesto F neutraliza de manera dependiente la fosfo-VEGFR2 inducida por

VEGF165 humano con una media de IC50 de 0.83 nM (n=3),
mientras que IMC-1121B tiene una media de IC50 de 0.52 nM
(n=3). Esto indica que la porción de anticuerpo de VEGFR2 del
compuesto ha mantenido potencia en el Compuesto F que es
5 comparable con aquella de IMC-1121B en este ensayo basado en
células.

**Neutralización de la proliferación celular inducida por
VEGF165.**

10 La inhibición *in vitro* basada en células del VEGFR2
humano por un compuesto de la presente invención se puede
medir en un ensayo basado en células donde el VEGF165 induce
la proliferación de VEGFR2 humano en una manera dependiente
de la dosis. La capacidad de un compuesto de la presente
15 invención para neutralizar la proliferación inducida por
VEGF165 humano vía el VEGFR2 se puede medir en HMVEC-d
(células endoteliales microvasculares dérmicas) humanas. El
VEGFR2, Ang2, y anticuerpos PAA de IgG4 humana irrelevantes
se pueden incluir como controles positivos y negativos.

20 Las células endoteliales microvasculares dérmicas
humanas se pueden aislar de prepucio masculino de recién
nacido, y se pueden confirmar para la expresión de CD31,
VEGFR2, y LDL acetilado. Las HMVEC-d se pueden mantener en
medio de crecimiento completo MCDB131 (Mediatech #15-100-CV),
25 L-glutamina 2 mM (Thermo Scientific #SH30034.01), 1X

penicilina-estreptomicina (Life Technologies/Invitrogen #15140), suplemento MGVS (Life Technologies/Invitrogen #S-005-25) como se instruye para 500 ml de medio; el cual se puede suplementar para contener 4.9% FBS, 1 µg/ml de
5 hidrocortisona, 3ng/ml de FGF humano, 10 µg/ml de heparina, 1 ng/ml de EGF humano, y dibutiril cíclico AMP 0.08 mM.

Para el ensayo, las células HMVEC-d en el paso 5 se pueden lavar una vez en medio de crecimiento pre-calentado, y se pueden resuspender a 2,000 células por cavidad (en 100 µl
10 de medio de crecimiento), en las 60 cavidades internas de placas de 96 cavidades de fondo claro con pared blanca (BD #35-3377). Se pueden añadir 250 µl de medio libre de suplemento a las cavidades de borde para reducir la evaporación. Los compuestos y VEGF165 humano (Lote ALY-
15 BE01241-033) a 4X las concentraciones finales se pueden diluir en serie 1:4 en placas de polipropileno en medio libre de suplemento. Los compuestos (o medio libre de suplemento solo) se pueden añadir a las células por triplicado a 50 µl por cavidad, los cuales pueden ser seguidos por 50 µl por
20 cavidad del 4X VEGF165. Las placas luego se pueden incubar durante 5 días a 37°C, 95% HR, 5% CO₂. El intervalo de concentración final de los compuestos puede ser 0.012 - 800 nM, y la concentración final del VEGF165 humano puede ser 0.5 nM.

25 Después del período de incubación, las placas y

sustrato CellTiter Glo (Promega #G7571) se pueden equilibrar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se pueden añadir 100 μ l por cavidad de reactivo CellTiter Glo, y las placas se pueden colocar en un agitador orbital durante 2 minutos a
5 temperatura ambiente. Las placas se pueden incubar durante unos 10 minutos adicionales, luego la luminiscencia se puede registrar (tiempo de integración de 1 segundo) en un lector Perkin Elmer Wallac Victor 3 Modelo 1420.

Los valores de IC_{50} para la inhibición de la
10 proliferación inducida por VEGF165 se pueden calcular con GraphPad Prism 6, utilizando valores X transformados logarítmicamente. Los valores solos medios se pueden incluir como el punto más alto de las curvas; el valor X (concentración) para el medio solo se puede ajustar a 100X
15 mayor que el valor X más alto. Además, los valores solos de VEGF se pueden incluir como el punto más bajo de las curvas; la concentración para VEGF solo se pueden ajustar a 100X menor que el valor X más bajo. El análisis de regresión no lineal (ajuste de curva) (respuesta de dosis sigmoidal,
20 pendiente variable) se puede realizar en los datos transformados logarítmicamente para obtener valores de IC_{50} .

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, la dosis del Compuesto F neutraliza de manera dependiente la proliferación inducida
25 por VEGF165 humano de HMVEC-d de manera similar a IMC-1121B

con medias de IC₅₀ de 19.24 nM y 31.36 nM, respectivamente (n=2). Esto indica que la porción de anticuerpo de VEGFR2 del compuesto ha mantenido la potencia en el Compuesto F que es comparable con IMC-1121B en este ensayo basado en células.

5

Inhibición de la Formación de Cordón Inducida por VEGF165

La inhibición *in vitro* de la formación de cordón inducida por VEGF se puede medir en un sistema de co-cultivo *in vitro*. El ensayo mencionado anteriormente se puede
10 utilizar para medir la inhibición de la formación de cordón inducida por VEGF por un compuesto de la presente invención. Un anticuerpo de VEGFR2 se puede incluir como un control positivo.

Para este ensayo, las células madre derivadas de
15 tejido adiposo (ADSC; Lonza # PT5006, lote #OF4505-01) se pueden cultivar en matraces de cultivo Corning (Corning #431082) en medio EGM-2MV (Lonza # CC3202). Las células formadoras de colonias endoteliales (ECFC; Lonza, lote # EGT-ECFC100506r) se pueden cultivar en matraces recubiertos con
20 Colágeno I (BD Biosciences #356486) en medio EGM-2MV suplementado con 5% FBS inactivado con calor (Gibco # 10082-147). Las ADSC en los pasos 4-6 se pueden recolectar de los matraces de cultivo los cuales se pueden enjuagar con DPBS (Hyclone #SH30028.03) seguido por TrypLE Express (Gibco
25 #12605-010). Las células ADSC se pueden suspender en Medio

basal (MCDC-131 (Gibco #10372-019) suplementado con 10 µg/ml de insulina, dexametasona 1 µM, 30 µg/ml de ácido ascórbico, 10 µg/ml de transferrina humana y 50 µg/ml de tobramicina). El recuento de células viables se puede determinar y las

5 células se pueden sembrar placas negras de 96 cavidades de fondo claro (BD Falcon #353219) a 4×10^4 células por cavidad en 100 µl de medio basal. Las células se pueden incubar a 37°C en 5% CO₂ durante la noche para permitir la unión. Al siguiente día, las ECFC en los pasos 7-10 se pueden

10 recolectar en medio basal como anteriormente y el recuento de células viables se puede ajustar a 4×10^4 células por ml. El medio se puede remover de las células ADSC y se pueden añadir 100 µl de suspensión de células ECFC a cada cavidad. Las placas se pueden incubar a 37°C en 5% CO₂ durante 2-3 horas

15 para permitir que las células se asienten en la parte superior de la monocapa de ADSC. IMC-1121B y los compuestos de la presente invención se pueden diluir a 80 µg/ml en medio basal, y luego se pueden diluir en serie 1:3 con medio basal para producir una serie de respuesta a la dosis de nueve

20 puntos. Se pueden añadir 50 µl de cada dilución del compuesto al co-cultivo. Se pueden añadir 50 µl de una solución de 80 ng/ml de rhVEGF (R&D #293-VE/CF, 50 µg/ml en DPBS) preparada en medio basal a la combinación de co-cultivo + compuesto. Las concentraciones finales de los compuestos y rhVEGF pueden

25 ser 20 µg/ml y 20 ng/ml, respectivamente. El control positivo

para el ensayo puede incluir 20 ng/ml de rhVEGF en la ausencia del compuesto. El control negativo para el ensayo puede incluir medio basal sin rhVEGF. Las placas luego se pueden incubar a 37°C en 5% CO₂ durante 3 días para permitir
5 que se formen los cordones.

Al final del período de incubación, el medio se puede aspirar de cada cavidad y se pueden añadir cuidadosamente 100 µl de 80% etanol a temperatura ambiente. Las placas se pueden incubar a temperatura ambiente durante
10 20 minutos. La solución de etanol se puede aspirar y las cavidades se pueden lavar dos veces con 150 µl de DPBS. El Anti-huCD31 (IgG de oveja purificada con afinidad R&D #AF806, 200ug/ml) y MAB Anti-Actina, alfa-Músculo liso-Cy3 (Sigma #C6198) se pueden diluir cada uno 1:250 en 2.5% FBS/DPBS. Se
15 pueden añadir 100 µl de mezcla de anticuerpos a las cavidades y las placas se pueden incubar a 37°C en 5% CO₂ durante 2 horas. Las placas luego se pueden aspirar y las cavidades se pueden lavar dos veces con 150 µl de DPBS. IgG anti-oveja de mono Alexa Fluor 488 (H+L) (Life Technologies #A11015) se
20 puede diluir 1:400 y Hoescht 33342 (Life Technologies #H3570) se puede diluir 1:1000 en 2.5% FBS/DPBS y se pueden añadir 100 µl por cavidad a las placas. Las placas se pueden incubar a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 30 minutos. Las cavidades luego se pueden lavar dos veces con
25 150 µl de DPBS. Se pueden añadir 150 µl de DPBS a cada

cavidad y las placas se pueden sellar con sellos adhesivos negros (PerkinElmer #6050173).

Las placas se pueden leer en el lector ArrayScan VTI HCS (Cellomics-Thermo Fisher) utilizando la Bio-
5 aplicación de Formación de Tubos. Los datos de área de tubo total se pueden graficar contra las concentraciones de compuesto en nM en GraphPad Prism 6. Las concentraciones de compuesto se pueden transformar en datos logarítmicos y los valores de IC_{50} para la inhibición se pueden calcular por
10 regresión no lineal (respuesta de dosis sigmoidal, pendiente variable). Cada experimento puede representar la media de triplicados y los experimentos triplicados se pueden expresar como la media geométrica y se puede calcular el 95% de intervalos de confianza.

15 En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, la dosis del Compuesto F inhibe de manera dependiente la formación de cordón inducida por VEGF humano en el sistema de co-cultivo de ADSC/ECFC, comparativamente con IMC-1121B con IC_{50} media de 6.04 nM y 5.6
20 nM, respectivamente (n=3). Esto indica que la porción de anticuerpo de VEGFR2 del compuesto ha mantenido potencia en el Compuesto F que es comparable con IMC-1121B en este ensayo basado en células.

Represión del Desarrollo de Vasos Sanguíneos Inducido por Ang2.

La regresión *in vivo* de la angiogénesis fisiológica por un anticuerpo de Ang2 se puede medir en un modelo de desarrollo de vasos sanguíneos en la retina de ratones. El
5 ensayo mencionado anteriormente se puede utilizar para estudiar la capacidad de los compuestos de la presente invención para reprimir la angiogénesis fisiológica en la retina de ratones.

10 Para este ensayo, el día del suministro a la cría de ratón por las hembras preñadas se puede marcar como P0 (día postnatal 0). Después del suministro, en los días dos y cuatro (P2 y P4) las crías se pueden inyectar con control de vehículo (PBS) o 10 mg/kg de anticuerpo de Ang2 o 13.5 mg/kg
15 del compuesto para mantener comparables las cantidades molares de las moléculas. En P5 los ratones se pueden sacrificar y los ojos se pueden recolectar y se pueden fijar en formalina durante 5 horas y se pueden lavar con PBS.

Las retinas luego se pueden disecar, y se pueden
20 teñir con anti-CD31 diluido a 1:200 (BD Pharmingen; clon MEC 13.3; Catálogo 553370), y anti-SMA-FTIC diluido a 1:200 (Sigma; Clon 1A4 Catálogo F3777). Para las retinas tratadas con anti-CD31 se puede utilizar un Alexa-647 anti-rata diluido a 1:400 (Jackson Immuno Research; Catálogo 712-606-
25 153) como un anticuerpo secundario. La adquisición de las

retinas se puede hacer utilizando Nikon Ti, y las cuantificaciones de la progresión vascular, número de células de punto de brote, y densidad vascular de la reconstrucción del plexo se puede realizar utilizando software FIJI. Las
 5 imágenes de alta amplificación se pueden adquirir utilizando una Nikon A1 confocal.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto F y un Ab de Ang-2 con las mismas HCDR y LCDR como la porción de polipéptido de
 10 scFv del Compuesto F reprimen comparativamente la progresión vascular, reducen tanto el número de células de punta endoteliales como la densidad vascular, así como aumentan la cobertura de pericitos (Tabla 7). Estos resultados de este modelo *in vivo* indican que la porción de polipéptido de scFv
 15 de Ang2 del Compuesto F ha mantenido la función y potencia que es comparable con un anticuerpo de Ang2 con las mismas HCDR y LCDR como la porción de polipéptido de scFv del Compuesto F.

20 Tabla 7

Parámetros	Vehículo	mAb de Ang2	Compuesto F
Progresión vascular			
Media (%)	100	57.29	49.01
Error estándar de la media	2.956	4.296	3.679
Valor P (Vehículo contra Compuestos)		< 0.0001	< 0.0001

	(Prueba de Dunnett)			
	Valor P (mAb de Ang2 contra Compuesto F) (Prueba de Dunnett)			0.2543
	Número de células de punta			
	Media (%)	100	61.77	47.26
5	Error estándar de la media	6.749	6.658	4.719
	Valor P (Vehículo contra Compuestos) (Prueba de Dunnett)		< 0.0001	< 0.0001
	Valor P (MAb de Ang2 contra Compuesto F) (Prueba de Dunnett)			0.1354
10	Densidad vascular			
	Media (%)	100	60.52	62.97
	Error estándar de la media	5.728	2.178	2.935
	Valor P (Vehículo contra Compuestos) (Prueba de Dunnett)		< 0.0001	< 0.0001
15	Valor P (MAb de Ang2 contra Compuesto F) (Prueba de Dunnett)			0.9476

Estabilidad física, estabilidad química, y calidad del producto

Las calidades del producto, incluyendo el nivel de agregado, homogeneidad durante la expresión, estabilidad física, y estabilidad química, se evalúan para identificar cualquier problema y asegurar la adecuación para usos terapéuticos.

Mal apareamiento de cadena ligera libre

Durante la purificación y análisis del Compuesto A (dos primeros polipéptidos de SEC ID NO: 38 y dos segundos polipéptidos de SEC ID NO: 39), y del Compuesto B (dos primeros polipéptidos de SEC ID NO: 40 y dos segundos polipéptidos de SEC ID NO: 39), se detecta la presencia de cadenas ligeras no covalentes de la porción de anticuerpo del compuesto. La purificación para remover esta especie mal plegada resulta en pobre rendimiento final del compuesto deseado. Se encontró que la inestabilidad de la interfaz entre la VH y VL de la porción de anticuerpo del compuesto, y el plegamiento de los dominios del polipéptido de scFv, contribuyen al problema. Las mutaciones en el armazón de la porción de anticuerpo del compuesto se utilizan para eliminar este problema de mal apareamiento de cadena ligera, sin embargo, el problema sólo se redujo y no se resolvió. Se intenta un número de armazones de línea germinal en el polipéptido de scFv, pero los perfiles de expresión no se mejoran. La ingeniería genética de las CDR y armazones de la porción de anticuerpo del compuesto en combinación con la ingeniería genética de polipéptido de scFv se requiere para producir el resultado deseado de niveles aceptables de mal apareamiento de cadena ligera.

El análisis específico de masas confirma la existencia de LC libre asociada con el Compuesto A, ya sea

como asociación no covalentemente enlazada o como especie covalentemente enlazada. Para cuantificar adicionalmente el porcentaje de asociaciones de LC, se emplea un método de HIC-HPLC (TSKgel butilo-NPR 4.6mm ID x 10cm, 2.5um; TOSOH cat. # 42168). En este análisis, se inyecta una muestra de proteína sobre una columna de butilo-NPR y se eluye de acuerdo con su hidrofobicidad. Mediante la débil interacción hidrofóbica, el monómero, agregados y diversos estados de especies asociadas con LC se resuelven secuencialmente durante la elución. El método se desarrolla de modo que los artículos de prueba se preparan en 1 mg/ml de solución en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 6.7 y 50 µg de la muestra se inyectan en una columna TSKgel butilo-NPR a velocidad de flujo de 1 ml/min en el sistema Agilent LC 1260. Con un gradiente de sal de sulfato de amonio 1 M a cero en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6.7, tres picos de proteína se resuelven y fraccionan. Cada pico fraccionado se analiza por LCMS y se identifica como Mab-scFv de monómero, Mab-scFv bi-cisteinilado con una LC cisteinilada extra, y Mab-scFv cisteinilado con dos LC cisteiniladas extras. Con las asignaciones de pico confirmadas por LCMS, el cromatógrafo final (detección de A214) se integra para calcular el porcentaje total de asociación de LC.

En los experimentos realizados como se describe anteriormente, se encontró que el compuesto con una mutación

M111L del Compuesto B para fijar la oxidación exhibe 55% de asociación de LC. Mediante la ingeniería genética del dominio variable de VR2 y los armazones, se encontró que las moléculas finales del Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, y Compuesto F no exhiben asociación de LC detectable como se detecta por análisis de HIC-HPLC (Tabla 8).

Tabla 8

		LC%
10	Compuesto B con M111L	55
	Compuesto C	0
	Compuesto D	0
	Compuesto E	0
	Compuesto F	0

15 Formación de Mab-Diacuerpo

Para facilitar la medición de las relaciones de Mab-Diacuerpo/Mab-scFv en los compuestos de la presente invención, se realizan los siguientes tratamientos. Típicamente 20 µg del compuesto de la presente invención son intercambiados con amortiguador en fosfato de sodio 50 mM que contiene cloruro de sodio 150 mM, pH 6.6 utilizando un dispositivo de filtro centrífugo de 0.5 ml Amicon Ultra. Las muestras se concentran a aproximadamente 30 µl y luego se mezclan con 1 µl de enzima FABricator recién preparada (Genovis, Cat: A0-FR1-020; 2000 U disuelta en 30 µl de ddH₂O)

y se incuban a 37°C durante la noche. Las muestras digeridas (1 µl) se someten a análisis de LC/UV/MS utilizando Waters Acquity UPLC acoplada a un espectrómetro de masas Waters Xevo G2-S. Las muestras se cargan en una columna de fase inversa de 50x1.0mm, 1000 Å, 5µm PLRP-S (Proxeon, Cat: PL1312-1502) a una velocidad de flujo de 0.3 ml/min y temperatura de columna de 80°C. Las muestras se eluyen de la columna utilizando un gradiente de TFA en acetonitrilo. El eluido se analiza primero por UV a 214 nm con el flujo entonces dirigido al espectrómetro de masas para el análisis utilizando modo de sensibilidad, polaridad positiva con un intervalo de adquisición de 400-4000 m/z.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto B exhibe menos de 1% de Mab-Diacuerpo. El Compuesto C, Compuesto D, y Compuesto E, que incorporan todas las modificaciones hechas al Compuesto B para reducir los problemas de mal apareamiento de cadena ligera y oxidación, de manera sorprendente tuvieron aproximadamente 5-6% de Mab-Diacuerpo. Los cambios de secuencia incorporados en el Compuesto F tuvieron un porcentaje de Mab-Diacuerpo de menos de 1% de Mab-Diacuerpo lo cual es comparable con el Compuesto B.

Oxidación

La estabilidad química de los compuestos de la

presente invención se puede evaluar produciendo condiciones de formulación variadas las cuales se pueden someter a estrés de temperatura mantenida. Los cambios de la estabilidad química se pueden monitorear por técnicas de mapeo de péptido por LCMS establecidas. Brevemente, los artículos de prueba se pueden obtener y diluir a una concentración final de 1 mg/ml en los siguientes amortiguadores de formulación: Citrato 10mM, pH 5.0, Citrato 10mM, pH 6.5, 1X PBS, pH 7.4 y Tris 10mM, pH 8.0 y luego se someten a diálisis exhaustiva a 4°C en cada amortiguador respectivo para asegurar el intercambio completo del amortiguador. Las muestras de amortiguador intercambiado luego se pueden someter a incubación ya sea a 4°C o 40°C durante cuatro semanas, después de lo cual las muestras se pueden analizar por LCMS como sigue. El material estresado se puede intercambiar de amortiguador en guanidina 8 M para desnaturalización antes de la reducción con DTT seguida por alquilación subsiguiente por yodoacetamida. La proteína reducida y alquilada luego se puede intercambiar de amortiguador en Tris, pH 7.5 y se digiere con tripsina a una relación molar de 20:1 a 37°C durante cuatro horas. La digestión se puede apagar con la adición de 1 µL de ácido acético glacial. La separación de los fragmentos de péptido digeridos se puede lograr mediante la captura en una Zorbax de 1.8µm, C18 2.1mm x 50mm pre-equilibrada con 0.2% de ácido fórmico en agua y elución subsiguiente utilizando un

gradiente de 0.2% de ácido fórmico en acetonitrilo operado a 0.3 ml/min. Los péptidos eluidos se pueden analizar de manera inmediata utilizando un Agilent ESI-QTOF ajustado para escanear en modo de ion positivo desde 300m/z a 2000m/z a 1
5 escaneo/segundo. La fuente de ESI se puede establecer a 4000 V y la temperatura a 350°C, gas nebulizador a 40 psi y gas de cono a 12 psi. Se puede utilizar el software Agilent Mass Hunter Bio-confirm para alinear el espectro de masas de péptido triptico a la secuencia de proteína.

10 En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto B exhibe 14.2% de oxidación en la posición M111 en la cadena pesada de la porción de anticuerpo de VEGFR2 del compuesto cuando se somete a tensión de temperatura a 40°C a pH 8.0. Para evitar
15 los problemas relacionados con la oxidación en esta posición, se hace una mutación de punto único que cambia la metionina 111 a leucina en los Compuestos C, D, E, y F para eliminar la posibilidad de modificación química en esta posición.

20 **Farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) en plasma después de una dosis intravenosa única a monos cinomolgus machos**

La PK y PD de los compuestos de la presente invención se pueden medir en monos cinomolgus después de una dosis intravenosa única.

25 Los monos cinomolgus machos (n=2/grupo) se pueden

administrar con una dosis intravenosa única de un compuesto de la presente invención. La sangre se puede muestrear entre 2-672 horas posterior a la dosis y el plasma se aísla para cuantificar los niveles en plasma del compuesto utilizando
5 tres métodos de ELISA.

El método de IgG humana total puede utilizar un formato de ELIS para medir la concentración del compuesto de la presente invención (IgG humana total). Los estándares, controles, y muestras de prueba se pueden incubar con F(ab')₂
10 anti-humano de cabra el cual se ha inmovilizado en una placa de microtitulación. Después de la incubación, una IgG₄-HRP anti-humana de ratón (peroxidasa de rábano picante) se puede añadir a las cavidades. Una vez que la enzima no unida se quita, se puede añadir solución de sustrato SureBlue® TMB
15 (tetrametilbencidina) a las cavidades. El desarrollo de color se puede detener por la adición de una solución ácida y la densidad óptica se mide a 450 nm con corrección de longitud de onda ajustada a 630 nm. El intervalo de ensayo puede ser 30-700 ng/ml.

20 El método de captura de antígeno de VEGFR2 puede utilizar un formato de ELISA para medir la concentración de los compuestos de la presente invención (captura de antígeno de VEGFR2). Los estándares, controles y muestras de prueba se pueden incubar en una placa de microtitulación recubierta con
25 VEGFR2 humano. Después de la incubación, una IgG₄-HRP anti-

humana de ratón (peroxidasa de rábano picante) se puede añadir a las cavidades. Una vez que la enzima no unida se quita, se puede añadir solución de sustrato SureBlue® TMB (tetrametilbencidiae) a las cavidades. El desarrollo de color se puede detener por la adición de una solución ácida y la densidad óptica se mide a 450 nm con corrección de longitud de onda ajustada a 630 nm. El intervalo de ensayo puede ser 80-2000 ng/ml.

El método de captura de antígeno de Ang2 utiliza un formato de ELISA para medir la concentración de los compuestos de la presente invención (captura de antígeno de Ang2). Los estándares, controles y muestras de prueba se pueden incubar en una placa de microtitulación recubierta con Ang2. Después de la incubación, una IgG₄-HRP anti-humana de ratón (peroxidasa de rábano picante) se añade a las cavidades. Una vez que la enzima no unida se quita, se puede añadir solución de sustrato SureBlue® TMB (tetrametilbencidiae) a las cavidades. El desarrollo de color se puede detener por la adición de una solución ácida y la densidad óptica se mide a 450 nm con corrección de longitud de onda ajustada a 630 nm. El intervalo de ensayo puede ser 30-700 ng/ml.

El análisis no compartimental se puede realizar utilizando Phoenix WinNonlin 6.3. Las gráficas se pueden generar utilizando SigmaPlot v11, y el procesamiento de datos

se puede realizar utilizando Microsoft Excel 2010.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, la PK se mide para el Compuesto E y Compuesto F después de una dosis a 1, 10, y 25 mg/kg. Para el Compuesto E, la vida media terminal, como se mide en todos los tres ensayos, estuvo dentro del intervalo de 8.96-37.9 h dependiendo del grupo de dosis (Tabla 9), mientras que la vida media terminal para el Compuesto F estuvo dentro del intervalo de 18.6-79.5 h dependiendo del grupo de dosis (Tabla 10). Estos resultados de tres diferentes ensayos de unión, que miden cada uno diferentes partes del compuesto, demuestran cada uno una vida media terminal mayor para el Compuesto F en comparación con el Compuesto E.

Tabla 9

	Ensayo	Dosis	Media $t_{1/2}$ (n=2)
		(mg/kg)	(h)
20	Capt. de Ag de Ang2	1	8.96
		10	24.4
		25	35.9
	IgG humana total	1	35.8
		10	30.2
		25	36.7
	Captura de Ag de VEGFR2	1	15.6
		10	23.2
		25	37.9

Tabla 10

	Ensayo	Dosis	Media $t_{1/2}$ (n=2)
		(mg/kg)	(h)
5	Capt. de Ag de Ang2	1	20.1
		10	54.3
		25	75.2
	IgG humana total	1	18.6
		10	52.6
		25	79.5
	Captura de Ag de VEGFR2	1	27.5
		10	54.3
		25	71.2

10

Secuencias de aminoácidos y nucleótidos

SEC ID NO: 1 (HCVR de anticuerpo - Compuesto C)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTEAFDIWGQGLTVTVSS

15

SEC ID NO: 2 (HCVR de anticuerpo - Compuesto D)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMLWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYTYYA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDADFIDWGQGLTVTVSS

20 SEC ID NO: 3 (HCVR de anticuerpo - Compuesto E)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDADFIDWGQGLTVTVSS

25 SEC ID NO: 4 (HCVR de anticuerpo - Compuesto F)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMLWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDADFIDWGQGTLLTVSS

SEC ID NO: 5 (HC de anticuerpo - Compuesto C)

5 EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTEAFDIDWGQGTLLTVSSASTKGP
 SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVERESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 10 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEHA
 LHNHYTQKSLSLGLG

SEC ID NO: 6 (HC de anticuerpo - Compuesto D)

15 EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMLWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYTYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDADFIDWGQGTLLTVSSASTKGP
 SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVERESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 20 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEHA
 LHNHYTQKSLSLGLG

25 SEC ID NO: 7 (HC de anticuerpo - Compuesto E)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTLLTVSSASTKGP
 SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
 5 DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGLG

10 SEC ID NO: 8 (HC de anticuerpo - Compuesto F)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMLWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTLLTVSSASTKGP
 SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
 15 DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGLG

20 SEC ID NO: 9 (HC de anticuerpo/enlazante/polipéptido de
 scFv - Compuesto C)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTEAFDIWGQGTLLTVSSASTKGP
 SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 25 VVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK

DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGLGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDY
 5 NMVWVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV
 YYCARTRDRYDVWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP
 SSVSASVGDRVTITCKASQDVYIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRDTGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISSLQPEDFATYYCHQYSSYPPTFGCGTKVEIK

10 SEC ID NO: 10 (HC de anticuerpo/enlazante/polipéptido de
 scFv - Compuesto D)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMLWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYTYYA
 DSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTLVTVSSASTKGP
 SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

15 VVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLGLGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDY
 20 NMVWVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV
 YYCARTRDRYDVWYFDVWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP
 SSVSASVGDRVTITCKASQDVYIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRDTGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISSLQPEDFATYYCHQYSSYPPTFGCGTKVEIK

25 SEC ID NO: 11 (HC de anticuerpo/enlazante/polipéptido de

scFv - Compuesto E)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGP
 SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 5 VVTVPSSSLGKITYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSSLGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFY
 10 NMVWVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYNQKFEGRVTTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV
 YYCARTRDRYDVWFYFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSP
 SSVSASVGRVTITCKASQDVYIAVAWYQQKPKAPKLLIYWASTRDTGVPSTRFSGSGSGT
 DFTLTISSLQPEDFATYYCHQYSSYPPTFGCGTKVEIK

15 SEC ID NO: 12 (HC de anticuerpo/enlazante/polipéptido de
 scFv - Compuesto F)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMLWVRQAPGKGLEWVSAISSSSSYIYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGP
 SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 20 VVTVPSSSLGKITYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSSLGSGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVYIA
 25 VAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRDTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQYSS

YPPTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY
 SFTDYNMVWVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYNQKFEGRVTITADESTSTAYMELSSLRS
 EDTAVYYCARTRDYDVWYFDVWGQGTLVTVSS

- 5 SEC ID NO: 13 (LCVR de anticuerpo - Compuesto C y Compuesto F)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASRGIDNWLTYQQKPGKAPKLLIYEASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKAFPPTFGGGTKVDIK

- 10 SEC ID NO: 14 (LCVR de anticuerpo - Compuesto D)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIDNWLTYQQKPGKAPKLLIVEASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKRFPPTFGGGTKVDIK

SEC ID NO: 15 (LCVR de anticuerpo - Compuesto E)

- 15 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIDNWLTYQQKPGKAPKLLIVEASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKAFPPTFGGGTKVDIK

SEC ID NO: 16 (LC de anticuerpo - Compuesto C y Compuesto F)

- 20 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASRGIDNWLTYQQKPGKAPKLLIYEASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKAFPPTFGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- 25 SEC ID NO: 17 (LC de anticuerpo - Compuesto D)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIDNWLTYQQKPGKAPKLLIVEASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAARFPPTFGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEC ID NO: 18 (LC de anticuerpo - Compuesto E)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIDNWLTYQQKPGKAPKLLIVEASSLQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAARFPPTFGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEC ID NO: 19 (polipéptido de scFv - Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYN
 QKFEGRVITMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTRDRYDVWYFDVWGQGTILVTVSSG
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQDVYIAVAWYQ
 QKPGKAPKLLIYWASTRDTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYSSYPPTF
 GCGTKVEIK

15

SEC ID NO: 20 (polipéptido de scFv - Compuesto F)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVYIAVAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRDTGVPDR
 FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCHQYSSYPPTFGCGTKVEIKGGGSGGGSGGGSG
 GGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYNMVRQAPGQCLEWMGYIDPYNG
 GTGYNQKFEGRVITITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARTRDRYDVWYFDVWGQGTILV

25

TVSS

SEC ID NO: 21 (HCVR de polipéptido de scFv - Compuesto C,
Compuesto D, Compuesto E)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMVWVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYN
5 QKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTRDYDVWYFDVWGQGTLVTVSS

SEC ID NO: 22 (HCVR de polipéptido de scFv - Compuesto F)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYNMVWVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYN
QKFEGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARTRDYDVWYFDVWGQGTLVTVSS

10

SEC ID NO: 23 (LCVR de polipéptido de scFv - Compuesto C,
Compuesto D, Compuesto E)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQDVYIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRDTGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYSSYPPTFGCGTKVEIK

15

SEC ID NO: 24 (LCVR de polipéptido de scFv - Compuesto F)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVYIAVAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRDTGVDPDR
FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCHQYSSYPPTFGCGTKVEIK

20 SEC ID NO: 25 (ADN de HC de
anticuerpo/enlazante/polipéptido de scFv - Compuesto C)

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCC
AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTACGCA
25 GACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC

AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCACAGAGGC
 TTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACACTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCA
 TCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
 GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
 5 CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
 GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACA
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACC
 CTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC AAAACCCAAG
 GACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
 10 AAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
 CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGT
 CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACAC
 CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
 15 GGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAAC
 CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTGGCGGAGGCTCCGGGG
 GAGGGGGTAGCGGAGGAGGGGGATCCCAGGTTGAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAA
 20 GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGACTAC
 AACATGGTGTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAATGCCTTGAGTGGATGGGATATATTGATC
 CTTACAATGGTGGTACTGGCTACAACCAGAAGTTGAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGA
 CACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTG
 TATTACTGTGCGAGAACGAGGGATAGATACGACGTCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGG
 25 GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGGGGCAGCGGAGGAGG

CGGATCGGGCGGAGGAGGAAGTGGAGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCA
 TCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGCGACAGAGTCACCATCACTTGTAAGGCCAGTCAGGATG
 TGTATATTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
 TTGGGCATCCACCCGGGACACTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACA
 5 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCACC
 AATATAGCAGCTATCCTCCTACGTTTCGGCTGCGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

SEC ID NO: 26 (ADN de LC de anticuerpo- Compuesto C y
 Compuesto F)

10 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGTCTGGGCGAGTCGTGGTATTGACAACTGGTTAACGTGGTATCAGCAGAAACCAGG
 GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATTTACGAAGCATCCAGTTTGCAATCAGGGGTCCCATCAAGG
 TTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAG
 ATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAAGCTAAGGCTTTTCCTCCCACTTTTCGGCGGAGGGAC
 15 CAAGGTGGACATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 20 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEC ID NO: 27 (ADN de HC de
 anticuerpo/enlazante/polipéptido de scFv - Compuesto D)

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT
 25 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGCTTTGGGTCCGCCAGGCTCC

AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCCATTAGTAGTAGTAGTAGTTACACCTACTACGCA
GACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTACAGATGC
TTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACACTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCA
5 TCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACA
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACC
10 CTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC AAAACCCAAG
GACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
AAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGT
15 CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
20 CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTGGCGGAGGCTCCGGGG
GAGGGGGTAGCGGAGGAGGGGGATCCCAGGTTTCTGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAA
GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGACTAC
AACATGGTGTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAATGCCTTGAGTGGATGGGATATATTGATC
CTTACAATGGTGGTACTGGCTACAACCAGAAGTTTCGAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGA
25 CACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTG

TATTACTGTGCGAGAACGAGGGATAGATACGACGTCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGG
 GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGGGGCAGCGGAGGAGG
 CGGATCGGGCGGAGGAGGAAGTGGAGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCA
 TCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGCGACAGAGTCACCATCACTTGTAAGGCCAGTCAGGATG
 5 TGTATATTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
 TTGGGCATCCACCCGGGACACTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCACC
 AATATAGCAGCTATCCTCCTACGTTTCGGCTGCGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

10 SEC ID NO: 28 (ADN de LC de anticuerpo- Compuesto D)
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTGACAACCTGGTTAACGTGGTATCAGCAGAAACCAGG
 GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCGTCGAGGCATCCAGTTTGCAATCAGGGGTCCCATCAAGG
 TTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAG
 15 ATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAAGAGGTTTCCTCCCACTTTCGGCGGAGGGAC
 CAAGGTGGACATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
 20 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEC ID NO: 29 (ADN de HC de
 anticuerpo/enlazante/polipéptido de scFv - Compuesto E)

25 GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT

CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCC
AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCGATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTACGCA
GACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCACAGATGC
5 TTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACACTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACA
10 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACC
CTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAG
GACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
AAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
15 CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGT
CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAAC
20 CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTGGCGGAGGCTCCGGGG
GAGGGGGTAGCGGAGGAGGGGGATCCCAGGTTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAA
GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGACTAC
AACATGGTGTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAATGCCTTGAGTGGATGGGATATATTGATC
25 CTTACAATGGTGGTACTGGCTACAACCAGAAGTTTCGAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGA

CACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTG
 TATTACTGTGCGAGAACGAGGGATAGATACGACGTCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGG
 GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGGGGCAGCGGAGGAGG
 CGGATCGGGCGGAGGAGGAAGTGGAGGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCA
 5 TCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGCGACAGAGTCACCATCACTTGTAAGGCCAGTCAGGATG
 TGTATATTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTA
 TTGGGCATCCACCCGGGACACTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCACC
 AATATAGCAGCTATCCTCCTACGTTTCGGCTGCGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 10
 SEC ID NO: 30 (ADN de LC de anticuerpo- Compuesto E)
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCA
 TCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTGACAACCTGGTTAACGTGGTATCAGCAGAAACCAGG
 GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCGTCGAGGCATCCAGTTTGCAATCAGGGGTCCCATCAAGG
 15 TTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAG
 ATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAAGGCTTTTCCTCCCACTTTTCGGCGGAGGGAC
 CAAGGTGGACATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 20 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA
 GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

25 SEC ID NO: 31 (ADN de HC de

anticuerpo/enlazante/polipéptido de scFv - Compuesto F)

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGCTTTGGGTCCGCCAGGCTCC
 AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCCATTAGTAGTAGTAGTAGTTACATATACTACGCA
 5 GACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGC
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCAACAGATGC
 TTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACACTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCA
 TCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
 GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
 10 CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
 GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACA
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACC
 CTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC AAAACCCAAG
 GACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
 15 AAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
 CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGT
 CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACAC
 CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
 20 GGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAAC
 CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTGGCGGAGGCTCCGGGG
 GAGGGGGTAGCGGAGGAGGGGGATCCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGC
 25 TGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGTATATTGCT

GTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCCA
 CCCGGGACACTGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCT
 CACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCACCAATATAGCAGC
 TATCCTCCTACGTTTCGGCTGCGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGTGGCGGAGGATCTGGTG
 5 GAGGTGGCTCAGGAGGTGGCGGAAGCGGCGGAGGTGGAAGTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
 TGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTAC
 TCATTCACTGACTACAACATGGTGTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAATGCCTTGAGTGGA
 TGGGATATATTGATCCTTACAATGGTGGTACTGGCTACAACCAGAAGTTCGAGGGCAGAGT
 CACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT
 10 GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACGAGGGATAGGTACGACGTCTGGTACTTCG
 ATGTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEC ID NO: 32 (ECD de VEGFR2 humano)

ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLWLWPNNQSGSECRVEVTECS
 15 DGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITEN
 KNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEA
 KINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVGIDFNWEYP
 SSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRV
 HEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTII
 20 MEVSEKDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGTQTTLTCT
 VYAIPPPHHIHWWYQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSEDFQGGNKIEVNKNQFALI
 EGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDMPTEQESVS
 LWCTADRSTFENLTWYKLGPPPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSNSTNDILIMEL
 KNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTA
 25 SGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRVRKEDEGLYTCAQACSVLGCACVEAF

FIIEGAQEKTNLE

SEC ID NO: 33 (Ang2 humana)

YNNFRKSMDSIGKKQYQVQHGSCSYTFLLPEMDNCRSSSSPYVSNVQORDAPLEYDDSVQR
 5 LQVLENIMENNTQWLMKLENYIQDNMKKEMVEIQQNAVQNQTAVMIEIGTNLLNQTAEQTR
 KLTDVEAQVLNQTTRELEQLLEHSLSTNKLEKQILDQTSEINKLQDKNSFLEKKVLAMEDK
 HIIQLQSIKEEKDQLQVLVSKQNSIIEELEKKIVTATVNNSVLQKQQHDLMETVNNLLTMM
 STSNSAKDPTVAKEEQISFRDCAEVFKSGHTTNGIYTLTFPNSTEEIKAYCDMEAGGGGWT
 IIQRRREDGSVDFQRTWKEYKVGFGNPSGEYWLGNFVSQLTNQORYVLKIHLDWEGNEAY
 10 SLYEHFYLSSEELNYRIHLKGLTGTAGKISSISQPGNDFSTKDGDNKCKICKCSQMLTGGW
 WFDACGPSNLNGMYYPQRQNTNKFNGIKWYYWKGSGYSLKATTMMIRPADF

SEC ID NO: 34

GGGGSGGGGS
 15

SEC ID NO: 35

GGGGSGGGSGGGGS

SEC ID NO: 36

20 GGGGSGGGSGGGSGGGGS

SEC ID NO: 37

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

25 SEC ID NO: 38 (HC de anticuerpo/enlazante/polipéptido de

scFv - Compuesto A)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYA
 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGMVTVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 5 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
 HEALHNHYTQKSLSLSPGSGSGSGSGSGSGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSF
 10 TDYNMVWVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYNQKFEGRVMTTDTSTSTAYMELRSLRSD
 TAVYYCARTRDRYDVWYFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT
 QSPSSVSASVGDRVITITCKASQDVYIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRDTGVPSRFSGSG
 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYSSYPPTFGCGTKVEIK

15 SEC ID NO: 39 (LC de anticuerpo - Compuesto A y Compuesto
 B)

DIQMTQSPSSVSASIGDRVITICRASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLDTGVP
 FSGSGSGTYFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAKAFPTFGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
 20 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID NO: 40 (HC de anticuerpo/enlazante/polipéptido de
 scFv - Compuesto B)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYA
 25 DSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGMVTVSSASTKGP

SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
5 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTDY
NMVWVRQAPGQCLEWMGYIDPYNGGTGYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV
YYCARTRDRYDVWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP
SSVSASVGDRVTITCKASQDVYIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRDTGVPSRFSGSGSGT
10 DFTLTISSLQPEDFATYYCHQYSSYPPTFGCGTKVEIK

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, que comprende un anticuerpo fusionado por dos enlazantes a dos polipéptidos de fragmentos variables de cadena única (scFv), caracterizado porque:

- (a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas idénticas (HC) y dos cadenas ligeras idénticas (LC), en donde cada HC comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) cuya secuencia de aminoácidos se da en la SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, o SEC ID NO: 4, y en donde cada LC comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) cuya secuencia de aminoácidos se da en la SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, o SEC ID NO: 15,
- b) los dos polipéptidos de scFv son idénticos y cada uno comprende una HCVR operativamente enlazada a una LCVR, en donde cada HCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, o SEC ID NO: 22, y en donde cada LCVR tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23, o SEC ID NO: 24, y
- c) los dos enlazantes son enlazantes idénticos ricos en glicina que enlazan operativamente cada uno el carboxi terminal de una HC del

anticuerpo al amino terminal de uno de los polipéptidos de scFv.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los dos polipéptidos de scFv comprenden cada uno el carboxi terminal de la LCVR de un polipéptido de scFv operativamente enlazado al amino terminal de la HCVR de un polipéptido de scFv.

3. El compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 1, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 13, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23.

4. El compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 2, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 14, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23.

5. El compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 3, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 15, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 21, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 23.

10 6. El compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque cada HCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 4, cada LCVR del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 13, la HCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 22, y la LCVR de cada uno de los polipéptidos de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 24.

20 7. El compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC), en donde cada HC tiene la secuencia de aminoácidos dada en una de la SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, o SEC ID NO: 8, y cada LC tiene la secuencia de aminoácidos dada en una de la SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, o SEC ID NO: 18.

8. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 5, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 16.

9. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 6, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 17.

10. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 7, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 18.

11. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque cada HC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 8, y cada LC del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 16.

12. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o 7, caracterizado porque cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos idéntica dada en una de la SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 20.

13. El compuesto de conformidad con la

reivindicación 12, caracterizado porque cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 19.

14. El compuesto de conformidad con la
5 reivindicación 12, caracterizado porque cada polipéptido de scFv tiene la secuencia de aminoácidos dada en la SEC ID NO: 20.

15. Un compuesto, caracterizado porque comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos en
10 donde cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, o SEC ID NO: 12, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, o SEC ID NO: 18.

15 16. El compuesto de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16.

20 17. El compuesto de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 17.

25 18. El compuesto de conformidad con la

reivindicación 15, caracterizado porque cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 18.

5 19. El compuesto de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque cada uno de los primeros polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12, y cada uno de los segundos polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16.

10 20. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15-19, caracterizado porque cada uno de los primeros polipéptidos forma un enlace de disulfuro inter-cadena con cada uno de los segundos polipéptidos, y el primer polipéptido forma dos enlaces de disulfuro inter-cadena con
15 el otro primer polipéptido, y cada uno de los primeros polipéptidos forma un enlace de disulfuro intra-cadena.

21. Una célula de mamífero, caracterizada porque comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del
20 grupo que consiste de un polipéptido que consiste de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12 y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido que consiste de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18, en
25 donde la célula es capaz de expresar un compuesto que

comprende un primer polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12 y un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos
5 seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18.

22. Un proceso para producir un compuesto que comprende dos primeros polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11 y
10 SEC ID NO: 12 y dos segundos polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18, caracterizado porque comprende cultivar la célula de mamífero de conformidad con la reivindicación 21 bajo condiciones de modo que el compuesto se expresa, y recuperar
15 el compuesto expresado.

23. Un compuesto, caracterizado porque se puede obtener por el proceso de conformidad con la reivindicación 22.

24. Una composición farmacéutica, caracterizada
20 porque comprende el compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, y un portador, diluyente, o excipiente aceptable.

25. Un método para tratar cáncer, caracterizado porque comprende administrar a un paciente en necesidad del
25 mismo, una cantidad efectiva del compuesto de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 1-20.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del tracto biliar, o carcinoma hepatocelular.

27. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular.

28. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado para uso en terapia.

29. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, caracterizado para uso en el tratamiento de cáncer.

30. El compuesto para uso de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del tracto biliar, o carcinoma hepatocelular.

31. El compuesto para uso de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, o carcinoma hepatocelular.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos que se unen al receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGFR2) y angiopoyetina-2 humana (Ang2), y pueden ser útiles para el tratamiento de cáncer, especialmente tumores sólidos impulsados por VEGFR2 y Ang2, incluyendo cánceres gástrico, carcinoma hepatocelular, de ovarios, colorrectal, de pulmón de células no pequeñas, del tracto biliar, y de mama.

10

15

20

25