

ANTICUERPO QUE SE UNE A VEGF Y A IL-1BETA Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-VEGF/anti-IL-1beta y a métodos de utilización de estos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha informado anteriormente de un anticuerpo biespecífico de unión a IL-1beta y a VEGF y se ha propuesto para el tratamiento de enfermedades vasculares oculares (documento nº WO2016/075034, anticuerpo "0032"). El anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta 0032 es un anticuerpo de tipo IgG de longitud completa con un intercambio de dominios VH/VL en un brazo de unión (documento nº WO2009/080252, Schaefer, W. *et al.*, PNAS, 108:11187-11191, 2011), en el que el brazo de unión de la organización de dominios del anticuerpo de tipo salvaje se une específicamente a IL-1beta y el brazo de unión que comprende el cruce de dominios VH/VL se une específicamente a VEGF. El brazo de unión a VEGF comprende los dominios VH y VL del anticuerpo anti-VEGF ranibizumab.

Los anticuerpos multiespecíficos que comprenden dos parátomos en una pareja de un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena ligera (VL) se han descrito en los documentos nº WO2008/027236 y nº WO2010/108127 y en Bostrom J. *et al.*, Science 323:1610-1614, 2009, así como en el documento nº WO2012/163520.

El documento nº WO2012/163520 da a conocer anticuerpos biespecíficos que comprenden dos parátomos no solapantes en una pareja de dominios VH y VL ("DutaFab"). Cada parátomo del anticuerpo biespecífico del documento nº WO2012/163520 comprende aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de la cadena pesada y de la cadena ligera, en las que la CDR-H1 y CRD-H3 de la cadena pesada, así como la CDR-L2 de la cadena ligera contribuyen al primer parátomo y la CDR-L1 y CDR-L3 de la cadena ligera, así como la CDR-H2 de la cadena pesada contribuyen al segundo parátomo. Los

anticuerpos monoespecíficos que comprenden los parátomos individuales se aíslan independientemente de diferentes colecciones de Fab, que están diversificadas en el primer o en el segundo parátomo. Las secuencias de aminoácidos de dichos anticuerpos monoespecíficos se identifican y se fusionan en la pareja biparatómica de VH y VL. Un fragmento Fab de ejemplo de unión específica a VEGF e IL-6 se da a conocer en el documento nº WO2012/163520.

Existe una necesidad de anticuerpos terapéuticos mejorados que se unan a VEGF y a IL-1beta.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta y a métodos de utilización de estos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un parátomo para VEGF y un parátomo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) y un dominio variable de la cadena pesada (dominio VH), en el que el parátomo para VEGF comprende los residuos de aminoácido de CDR-H2, CDR-L1 y CDR-L3 del anticuerpo, en el que el parátomo IL-1beta comprende los residuos de aminoácido de CDR-H1, CDR-H3 y CDR-L2 del anticuerpo.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un parátomo para VEGF y un parátomo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio VL y un dominio VH, en el que la pareja de un dominio variable de la cadena ligera y un dominio variable de la cadena pesada se une simultáneamente a VEGF humano y IL-1beta humana.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un parátomo para VEGF y un parátomo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio VL y un dominio VH, en el que ninguno de los aminoácidos comprendidos en el parátomo para VEGF están comprendidos en el parátomo para IL-1beta.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a

IL-1beta humana, que comprende un parátipo para VEGF y un parátipo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio VL y un dominio VH, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo en VEGF humano y al mismo epítipo en IL-1beta humana que un anticuerpo con un dominio variable de la cadena pesada de SEC ID nº 11 y un dominio variable de la cadena ligera de SEC ID nº 12.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo de VEGF humano inhibe la unión de VEGF a VEGFR2 con una IC_{50} inferior a 50 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC_{50} inferior a 30 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) región de marco (FR, por sus siglas en inglés) 1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un parátipo para VEGF que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 y R83, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, E67, D68, Q69, R92, Y93, H94 e Y96, y un parátipo para IL-1beta que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 y D101, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57 e Y91.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, S67, H68, E69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL

es según el sistema de numeración de Kabat. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un parátipo para VEGF que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 y R83, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, S67, H68, E69, R92, Y93, H94 e Y96, y un parátipo para IL-1beta que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 y D101, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57 e Y91.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11, y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11, en la que el dominio VH comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, R66, R83 y K94, y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en la que el dominio VL comprende los residuos de aminoácido I2, Y49, G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos. En una forma de realización, el

anticuerpo comprende: (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, en la que las sustituciones de aminoácidos están localizadas en las posiciones 3 a 25, 36 a 49, 97 a 82c, 84 a 93 o 103 a 113 de SEC ID nº 11, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, en la que las sustituciones de aminoácidos están localizadas en las posiciones 1, 4, 6, 8 a 23, 35 a 48, 58 a 66, 70 a 88 o 98 a 107 de SEC ID nº 12, en la que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, y que comprende (a) un dominio VH que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende una secuencia VH de SEC ID nº 11 y una secuencia de VL de SEC ID nº 12.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID nº 20 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID nº 19.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID nº 18 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID nº 19.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C, según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC₅₀ inferior a 30 nM, según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

Una forma de realización de la invención se refiere a un fragmento de anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana. Una forma de realización de la invención se refiere a un fragmento de anticuerpo biespecífico que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana. En una forma de realización, el fragmento de anticuerpo se selecciona de Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ o anticuerpos de cadena sencilla derivados de estos. Una forma de realización de la invención se refiere a un fragmento Fab que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana. Una forma de realización de la invención se refiere a un fragmento Fv que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana.

Una forma de realización de la invención se refiere a un anticuerpo IgG de longitud completa que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana.

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado codificante del

anticuerpo de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona un método de producción de un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende cultivar la célula huésped de la invención de manera que se produzca el anticuerpo.

En un aspecto, la invención proporciona el anticuerpo producido mediante el método de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona el anticuerpo de la invención para su utilización como medicamento, en una forma de realización para su utilización en el tratamiento de una enfermedad vascular.

En un aspecto, la invención proporciona la utilización del anticuerpo de la invención o la composición farmacéutica de la invención en la preparación de un medicamento; en una forma de realización, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad vascular.

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad vascular, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de la invención o la composición farmacéutica de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la angiogénesis en un individuo, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de la invención o la composición farmacéutica de la invención a fin de inhibir la angiogénesis.

Según la invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico anti-VEGF/anti-IL-1beta que es capaz de unirse a sus antígenos diana simultáneamente, incluso en el caso de que se proporcione en forma de fragmento Fab biespecífico. Además, el anticuerpo de la

invención proporciona varias propiedades valiosas que permiten su aplicación terapéutica, tales como afinidad elevada, hidrofiliidad y estabilidad elevada. El anticuerpo de la invención puede proporcionarse en formulaciones líquidas de alta concentración con una viscosidad adecuada para la aplicación ocular. El anticuerpo de la invención resulta adecuado para el tratamiento de enfermedades vasculares oculares.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: ilustración esquemática del fragmento Fab de un anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta de la invención. Se muestra una vista superior de una pareja afín de VH/VL que incluye la organización de los aminoácidos de la CDR (imagen superior). Se indica el dominio VH en gris; el dominio VL se indica en blanco. Además, se indica la disposición espacial de las regiones CDR. Se destacan las regiones paratópicas de un anticuerpo de la invención (imagen inferior), en el que el parátipo para VEGF está dispuesto en las regiones H-CDR2, L-CDR1 y L-CDR2 y en el que el parátipo para IL-1beta está dispuesto en las regiones H-CDR1, H-CDR3 y L-CDR2.

Figura 2: secuencias de aminoácidos de los dominios VH de los anticuerpos anti-VEGF/anti-IL-1beta de ejemplo de la invención. Se indica la numeración de Kabat de la posición de los aminoácidos, así como de las regiones CDR y RM. Se destacan las posiciones de aminoácidos que contribuyen al parátipo para VEGF, así como del parátipo para IL-1beta tal como se identifica en el ejemplo 8.

Figura 3: secuencias de aminoácidos de los dominios VL de los anticuerpos anti-VEGF/anti-IL-1beta de ejemplo de la invención. Se indica la numeración de Kabat de la posición de los aminoácidos, así como de las regiones CDR y RM. Se destacan las posiciones de aminoácidos que contribuyen al parátipo para VEGF, así como del parátipo para IL-1beta tal como se identifica en el ejemplo 8.

Figura 4: unión a antígenos simultánea del anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL12.85 a VEGF y a IL-1beta según se evalúa mediante SPR de acuerdo con el ejemplo 5.

Figura 5: unión a antígenos simultánea del anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL12.85 a VEGF y a IL-1beta según se evalúa mediante SPR de acuerdo con el ejemplo 5.

Figura 6: unión a antígenos simultánea del anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 0032 del arte previo a VEGF y a IL-1beta según se evalúa mediante SPR de acuerdo con el ejemplo 5.

Figura 7A: inhibición de la unión de VEGF a VEGFR2_h en presencia del anticuerpo RO7200394 (fragmento Fab) según se evalúa en el ejemplo 6. Se evaluó la inhibición de la unión de receptores en presencia y en ausencia del otro antígeno diana del anticuerpo biespecífico, IL-1beta.

Figura 7B: inhibición de la unión de VEGF a VEGFR2_h en presencia del anticuerpo 0032 del arte previo (IgG de longitud completa) según se evalúa en el ejemplo 6. Se evaluó la inhibición de la unión de receptores en presencia y en ausencia del otro antígeno diana del anticuerpo biespecífico, IL-1beta.

Figura 8A: inhibición de la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 en presencia del anticuerpo RO7200394 (fragmento Fab) según se evalúa en el ejemplo 6. Se evaluó la inhibición de la unión de receptores en presencia y en ausencia del otro antígeno diana del anticuerpo biespecífico, VEGF.

Figura 8B: inhibición de la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 en presencia del anticuerpo 0032 del arte previo (IgG de longitud completa) según se evalúa en el ejemplo 6. Se evaluó la inhibición de la unión de receptores en presencia y en ausencia del otro antígeno diana del anticuerpo biespecífico, VEGF.

Figura 9: ELISA de competición que evalúa la unión de VEGF121 a VEGF-R1 en presencia de los anticuerpos indicados, según se evalúa en el ejemplo 6.

Figura 10: ELISA de competición que evalúa la unión de VEGF165 a VEGF-R1 en presencia de los anticuerpos indicados, según se evalúa en el ejemplo 6.

Figura 11: resultados de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés) de anticuerpos de la invención según se evalúa en el ejemplo 7.

Figura 12: resultados de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) del anticuerpo 0032 del arte previo (ejemplo 7).

Figura 13: viscosidad del anticuerpo 1HVL12.85 según se evalúa en el ejemplo 8.

Figura 14: viscosidad del anticuerpo RO7200394 según se evalúa en el ejemplo 8.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Definiciones

A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en relación a la presente invención presentarán los significados entendidos comúnmente por la persona con conocimientos básicos de la materia. Además, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos singulares incluirán los plurales, y los términos plurales incluirán los singulares. Los métodos y las técnicas de la presente divulgación generalmente se llevan a cabo según métodos convencionales bien conocidos de la técnica. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas con las técnicas de bioquímica, enzimología, biología celular y molecular, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente memoria son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica.

A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la expresión “que comprende” incluirá la expresión “que consiste en”.

El término “aproximadamente” tal como se utiliza en la presente memoria en relación a un valor específico (p.ej., temperatura, concentración, tiempo y otros) se referirá a una variación de $\pm 1\%$ del valor específico al que se refiere el término “aproximadamente”.

El término “anticuerpo” en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos (p.ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, con la condición de que muestren la actividad de unión al antígeno deseada.

Un anticuerpo “aislado” es uno que ha sido separado de un componente de su ambiente natural. En algunas formas de realización, se purifica un anticuerpo hasta una pureza superior a 95 % o 99 % según se determina mediante, por ejemplo, métodos de electroforesis (por ejemplo SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo de intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos ver, por ejemplo, Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87, 2007.

La expresión “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente

homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo que contienen mutaciones naturales o que aparecen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, en las que se encuentran presentes generalmente dichas variantes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante de un antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpo y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria para referirse a un anticuerpo que presenta una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo nativo o que presenta cadenas pesadas que contienen una región Fc tal como se ha definido en la presente memoria.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que presenta su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo es del isotipo IgG1. En determinadas formas de realización, el anticuerpo es del isotipo IgG1, con las mutaciones P329G, L234A y L235A para reducir la función efectora de la región Fc. En otras formas de realización, el anticuerpo es del isotipo IgG2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo es del isotipo IgG4, con la mutación S228P en la región bisagra para mejorar la estabilidad del anticuerpo IgG4. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. La cadena ligera de un anticuerpo puede ser de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

La expresión "región Fc" en la presente memoria se utiliza para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos parte de la región constante. La expresión incluye las regiones Fc de secuencia nativa y las

regiones Fc variantes. En una forma de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o en la región constante se lleva a cabo según el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

La expresión “funciones efectoras” se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo que varían con el isotipo del anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión de receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), fagocitosis, regulación negativa de los receptores de superficie celular (p.ej., receptores de linfocitos B) y activación de los linfocitos B.

La expresión “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente presentan estructuras similares, en el que cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR, por sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, Kindt *et al.*, *Kuby Immunology*, 6a ed., W.H. Freeman y colaboradores, página 91, 2007). En el anticuerpo de la invención, una única pareja de dominio VH y dominio VL, es decir, una pareja afín de VH/VL, se une específicamente a sus dos dianas: VEGF e IL-1beta.

Un “DutaFab” es un anticuerpo biespecífico tal como se da a conocer en el documento n° WO2012/163520. En un DutaFab, una única pareja de dominio VH y dominio VL se une específicamente a dos epítomos diferentes, en la que un parátipo comprende residuos de aminoácido de CDR-H2, CDR-L1 y CDR-L3 y el otro parátipo comprende residuos de aminoácido de CDR-H1, CDR-H3 y CDR-L2. Los DutaFab comprenden dos parátipos no solapantes dentro de una pareja afín de VH/VL y pueden unirse simultáneamente a los dos epítomos diferentes. Los DutaFab y los métodos para su generación mediante el cribado de colecciones que comprenden fragmentos Fab monoespecíficos se dan a conocer en el documento n° WO 2012/163520.

Un “anticuerpo humano” es uno que presenta una secuencia de aminoácidos que

corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza los repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Dicha definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Un “marco de consenso humano” es un marco que representa los residuos de aminoácido más comunes en una selección de secuencias de marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana procede de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD, 1991, vols. 1 a 3. En una forma de realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I tal como en Kabat *et al.*, *supra*. En una forma de realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III tal como en Kabat *et al.*, *supra*.

Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula diferente de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un “parátopo” o “sitio de unión al antígeno”, tal como se utilizan intercambiamente en la presente memoria, se refiere a una parte de un anticuerpo que reconoce y se une a un antígeno. Un parátopo está formado por varios residuos de aminoácido individuales de los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo dispuestos próximos espacialmente en la estructura terciaria de la región Fv. Los anticuerpos de la invención comprenden dos parátomos “no solapantes” en una pareja afín de VH/VL. La expresión “no solapantes” se refiere a que ninguno de los aminoácidos que están comprendidos en uno de los dos parátomos está comprendido en el otro parátomo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “parátomo para VEGF” es un parátomo o sitio de unión al antígeno que se une a VEGF. El parátomo para VEGF de un anticuerpo de la invención comprende residuos de aminoácido de CDR-H2, CDR-L1 y CDR-L3 del anticuerpo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "parátipo para IL-1beta" es un parátipo o sitio de unión al antígeno que se une a IL-1beta. El parátipo para IL-1beta de un anticuerpo de la invención comprende residuos de aminoácido de CDR-H1, CDR-H3 y CDR-L2 del anticuerpo.

El término "VEGF", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier VEGF nativo procedente de cualquier origen vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (p.ej., seres humanos) y roedores (p.ej., ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término comprende VEGF no procesado "de longitud completa", así como cualquier forma de VEGF que resulte del procesamiento en la célula. El término comprende además variantes naturales de VEGF, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un VEGF humano de ejemplo se muestra en SEC ID nº 26.

Las expresiones "anticuerpo anti-VEGF" y "un anticuerpo que se une a VEGF" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a VEGF con suficiente afinidad para que el anticuerpo resulte útil como agente diagnóstico y/o terapéutico con diana en VEGF. En una forma de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-VEGF a una proteína no VEGF no relacionada es inferior a aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo a VEGF según se mide mediante, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés). En determinadas formas de realización, un anticuerpo que se une a VEGF presenta una constante de disociación (K_D) ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM o $\leq 0,01$ nM. Se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a VEGF en el caso de que el anticuerpo presente una K_D de 1 μ M o inferior.

El término "IL-1beta", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier IL-1beta nativa procedente de cualquier origen vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (p.ej., seres humanos) y roedores (p.ej., ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término comprende IL-1beta no procesado "de longitud completa", así como cualquier forma de IL-1beta que resulte del procesamiento en la célula. El término comprende además variantes naturales de IL-1beta, p.ej., variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una IL-1beta humana de ejemplo se muestra en SEC ID nº 27.

Las expresiones "anticuerpo anti-IL-1beta" y "un anticuerpo que se une a anti-IL-1beta" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a anti-IL-1beta con suficiente afinidad para que el anticuerpo resulte útil como agente diagnóstico y/o terapéutico con diana en

anti-IL-1beta. En una forma de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-IL-1beta a una proteína no anti-IL-1beta no relacionada es inferior a aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo a anti-IL-1beta según se mide mediante, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial (SPR). En determinadas formas de realización, un anticuerpo que se une a IL-1beta presenta una constante de disociación (K_D) ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM o $\leq 0,03$ nM. Se dice que un anticuerpo “se une específicamente” a anti-IL-1beta en el caso de que el anticuerpo presente una K_D de 1 μ M o inferior.

Un anticuerpo de la invención “se une simultáneamente a VEGF humano y a IL-1beta humana”, que significa que (a) un fragmento Fab de anticuerpo de la invención que está unido a IL-1beta humana (también) se une específicamente a VEGF humano, y (b) un fragmento Fab de anticuerpo de la invención que está unido a VEGF humano (también) se une específicamente a IL-1beta humana. La unión simultánea puede evaluarse con métodos conocidos de la técnica, p.ej., mediante resonancia de plasmón superficial, tal como se indica en la presente memoria.

La expresión “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR” (por sus siglas en inglés), tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y contienen residuos de contacto con el antígeno. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis CDR, tres en el dominio VH (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) y tres en el dominio VL (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3). A menos que se indique lo contrario, los residuos de CDR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en la presente memoria según el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

“Marco” o “FR” tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a residuos de aminoácido de dominio variable diferentes de los residuos de CDR. El marco de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios de marco: FR1, FR2, FR3 y FR4. De acuerdo con lo anterior, las secuencias de CDR y de FR generalmente aparecen en la secuencia siguiente en (a) el dominio VH: FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4, y (b) en el dominio VL: FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4.

Según el sistema de numeración de Kabat, tal como se utiliza en la presente memoria, las regiones de marco y CDR se localizan en las regiones siguientes de los dominios

variables:

	FR1	CDR-1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VH	1-30	31-35b*	36-49	50-65	66-94	95-102	103-113
VL	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107

* en CDR-H1, pueden encontrarse presentes aminoácidos adicionales entre las posiciones 35b y 36, en la presente memoria denominados posiciones “35c”, “35d” y “35e”, tal como se ilustra en la **figura 2**.

Las posiciones de aminoácidos según el sistema de numeración de Kabat al que se hace referencia en la presente memoria se ilustran en la **figura 2** en una alineación con las secuencias de aminoácidos de anticuerpos de la invención. En la presente memoria se hacen referencias a aminoácidos en una posición determinada dentro de la secuencia de aminoácidos tal como es bien conocido en la técnica indicando el aminoácido respectivo y la posición del aminoácido, p.ej. “E2” se refiere a un residuo de ácido glutámico ubicado en la posición de Kabat nº 2 de la secuencia de aminoácidos del dominio de anticuerpo respectivo.

El término “afinidad” se refiere a la magnitud de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse de manera general con la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos de la técnica, incluyendo los indicados en la presente memoria. En la presente memoria se describen formas de realización ilustrativas y de ejemplo específicas para la medición de la afinidad de unión.

El término “epítipo” indica el sitio en un antígeno, proteico o no proteico, al que se une un anticuerpo. Los epítopos pueden formarse tanto de tramos de aminoácidos contiguos (epítipo lineal) como comprender aminoácidos no contiguos (epítipo conformacional),

p.ej., en proximidad espacial debido al pliegue del antígeno, es decir, por el pliegue terciario de un antígeno proteico. Los epítomos lineales típicamente todavía se encuentran unidos a un anticuerpo después de la exposición del antígeno proteico a agentes desnaturizantes, mientras que los epítomos conformacionales típicamente resultan destruidos por el tratamiento con agentes desnaturizantes. Un epítomo comprende por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial.

El cribado para anticuerpos de unión a un epítomo particular (es decir, los que se unen al mismo epítomo) puede llevarse a cabo utilizando métodos rutinarios de la técnica, tales como, p.ej., entre otros, el escaneo de alaninas, la transferencia de péptidos (ver Meth. Mol. Biol. 248:443-463, 2004), el análisis de la segmentación de péptidos, la excisión de epítomos, la extracción de epítomos, la modificación química de antígenos (ver Prot. Sci. 9:487-496, 2000) y el bloqueo cruzado (ver "Antibodies", Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY).

El perfilado de anticuerpos basado en la estructura de los antígenos (ASAP, por sus siglas en inglés), también conocido como perfilado asistido por modificaciones (MAP, por sus siglas en inglés) permite agrupar una multitud de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a VEGF o a IL-1beta basándose en los perfiles de unión de cada uno de los anticuerpos de la multitud a superficies de antígeno modificadas química o enzimáticamente (ver, p.ej., el documento nº US 2004/0101920). Los anticuerpos en cada agrupación se unen al mismo epítomo, que puede ser un epítomo único claramente diferente o que se solapa parcialmente con epítomos representados por otra agrupación.

También puede utilizarse la unión competitiva para determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítomo de VEGF o IL-1beta que un anticuerpo de referencia de la invención, o compite por la unión a este. Por ejemplo, un "anticuerpo que se une al mismo epítomo en VEGF e IL-1beta" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a sus antígenos en ensayos de competición respectivos en 50 % o más, y a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en ensayos de competición respectivos en 50 % o más. También, a título de ejemplo, para determinar si un anticuerpo se une al mismo epítomo que un anticuerpo de referencia, se deja que el anticuerpo de referencia se una a VEGF o a IL-1beta en condiciones de saturación. Tras la eliminación del exceso del anticuerpo de referencia, se evalúa la capacidad de un anticuerpo en cuestión de

unirse a VEGF o a IL-1beta. En el caso de que el anticuerpo en cuestión sea capaz de unirse a VEGF o a IL-1beta tras la unión de saturación del anticuerpo de referencia, podrá concluirse que el anticuerpo en cuestión se une a un epítipo diferente que el anticuerpo de referencia. Por el contrario, si el anticuerpo en cuestión no es capaz de unirse a VEGF o a IL-1beta tras la unión de saturación del anticuerpo de referencia, entonces el anticuerpo en cuestión podría unirse al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo de referencia. Con el fin de confirmar si el anticuerpo en cuestión se une al mismo epítipo o simplemente resulta dificultado en su unión por motivos estéricos, puede utilizarse la experimentación rutinaria (p.ej., la mutación de péptidos y análisis de unión utilizando ELISA, RIA, resonancia de plasmón superficial, citometría de flujo y cualquier otro ensayo de unión de anticuerpo cuantitativo o cualitativo disponible de la técnica). Dicho ensayo debería llevarse a cabo en dos configuraciones, es decir, ambos anticuerpos deberían ser el anticuerpo de saturación. Si en ambas configuraciones sólo el primer anticuerpo (de saturación) es capaz de unirse a VEGF o a IL-1beta, entonces puede concluirse que el anticuerpo en cuestión y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a VEGF o a IL-1beta.

En algunas formas de realización, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapante si un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en por lo menos 50 %, en por lo menos 75 %, en por lo menos 90 % o incluso en 99 % o más según se mide en un ensayo de unión competitiva (ver, p.ej., Junghans *et al.*, Cancer Res. 50:1495-1502, 1990).

En algunas formas de realización, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácido en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo también reducen o eliminan la unión del otro. Se considera que dos anticuerpos presentan “epitopos solapantes” si sólo un subgrupo de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia polipeptídica de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad

de secuencias para los fines de la alineación. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede realizarse de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo, utilizando *software* informático disponible públicamente, tal como el *software* BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) o el paquete del programa FASTA. El experto en la materia podrá determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Alternativamente, los valores de porcentaje de identidad pueden generarse utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El autor del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con la documentación para usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en donde se encuentra registrado con el nº TXU510087 de la U.S. Copyright Office, y se describe en el documento nº WO 2000/005319.

A menos que se indique lo contrario, para fines de la presente memoria, sin embargo, se generan valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos utilizando el programa ggsearch del paquete FASTA versión 36.3.8c o posterior con una matriz de comparaciones BLOSUM50. Los autores del paquete de programa FASTA son W. R. Pearson y D. J. Lipman, "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, 1988; W. R. Pearson, "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227-258, 1996, y Pearson *et al.*, Genomics 46:24-36, 1997, y se encuentra disponible públicamente en www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml o en www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta. Alternativamente, puede utilizarse un servidor público accesible en fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi para comparar las secuencias, utilizando el programa ggsearch (global protein:protein) y las opciones por defecto (BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup = 2) para garantizar que se lleva a cabo una alineación global, y no local. El porcentaje de identidad de aminoácidos se obtiene en el encabezamiento de la alineación de salida.

La expresión "molécula de ácidos nucleicos" o "polinucleótido" incluye cualquier compuesto y/o sustancia que comprende un polímero de nucleótidos. Cada nucleótido está compuesto por una base, específicamente una base purina o pirimidina (es decir, citosina (C), guanina (G), adenina (A), timina (T) o uracilo (U)), un sacárido (es decir, desoxirribosa o ribosa) y un grupo fosfato. Con frecuencia, la molécula de ácidos nucleicos se describe mediante la secuencia de bases, en donde dichas bases

representan la estructura primaria (estructura lineal) de una molécula de ácidos nucleicos. La secuencia de bases se representa típicamente de 5' a 3'. En la presente memoria, la expresión molécula de ácidos nucleicos comprende ácido desoxirribonucleico (ADN), incluyendo, p.ej., ADN complementario (ADNc) y ADN genómico, ácido ribonucleico (ARN), en particular ARN mensajero (ARNm), formas sintéticas de ADN o ARN, y polímeros mixtos que comprenden dos o más de dichas moléculas. La molécula de ácidos nucleicos puede ser lineal o circular. Además, la expresión molécula de ácidos nucleicos incluye ambas hebras, la codificante y la no codificante, así como formas de hebra sencilla y de doble hebra. Además, la molécula de ácidos nucleicos descrita en la presente memoria puede contener nucleótidos naturales o no naturales. Entre los ejemplos de nucleótidos no naturales se incluyen bases nucleótidas modificadas con sacáridos derivatizados o enlaces esqueléticos de fosfato o residuos químicamente modificados. Las moléculas de ácidos nucleicos comprenden además moléculas de ADN y ARN que resultan adecuadas como vector para dirigir la expresión de un anticuerpo de la invención *in vitro* y/o *in vivo*, p.ej., en un huésped o paciente. Dichos vectores de ADN (p.ej., de ADNc) o ARN (p.ej., de ARNm), pueden estar no modificados o estar modificados. Por ejemplo, el ARNm puede modificarse químicamente para potenciar la estabilidad del vector de ARN y/o la expresión de la molécula codificada de manera que el ARNm pueda inyectarse en un sujeto para generar el anticuerpo *in vivo* (ver, p.ej., Stadler *et al*, Nature Medicine 2017, publicado en línea el 12 de junio de 2017, doi:10.1038/nm.4356 o patente nº EP 2 101 823 B1).

Un ácido nucleico “aislado” se refiere a una molécula de ácidos nucleicos que ha sido separada de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácidos nucleicos contenida en células que habitualmente contienen la molécula de ácidos nucleicos, aunque la molécula de ácidos nucleicos se encuentra presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

La expresión “ácido nucleico aislado codificante” de un anticuerpo se refiere a una o más moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de estos), incluyendo una o más de dichas moléculas de ácidos nucleicos en un único vector o en vectores separados, y una o más de dichas moléculas de ácidos nucleicos presentes en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término “vector”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula

de ácidos nucleicos capaz de propagar otro ácido nucleico al que se encuentra unido. El término incluye el vector en forma de estructura de ácidos nucleicos autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que ha sido introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se encuentran ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión".

Las expresiones "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se utilizan intercambiamente y se refieren a células en las que se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluyendo la descendencia de dichas células. Entre las células huésped se incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de esta con independencia del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácidos nucleicos con respecto a una célula parental, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado o selección realizado en la célula originalmente transformada se encuentra incluida en la presente memoria.

Las expresiones "composición farmacéutica" o "formulación farmacéutica" se refieren a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en esta resulte eficaz, y que no contiene componentes adicionales que resulten inaceptablemente tóxicos para un sujeto en el que se administre la composición farmacéutica.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición o formulación farmacéutica, aparte de un ingrediente activo, que no resulta tóxico para el sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un amortiguador, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, de una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad que resulta eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, entre otros, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas formas de realización, el

individuo o sujeto es un ser humano.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “tratamiento” (y las variaciones gramaticales de este, tales como “tratar” o “que trata”) se refieren a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural de una enfermedad del individuo en tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o de la recurrencia de una enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas formas de realización, se utilizan anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para enlentecer el avance de esta.

La expresión “enfermedad ocular”, tal como se utiliza en la presente memoria, incluye cualquier enfermedad ocular asociada a angiogénesis patológica y/o atrofia. Una enfermedad ocular puede caracterizarse por una proliferación alterada o no regulada y/o la invasión de vasos sanguíneos nuevos en las estructuras de los tejidos oculares, tales como la retina o la córnea. Una enfermedad ocular puede caracterizarse por la atrofia del tejido retiniano (fotorreceptores y el epitelio pigmentario retiniano (EPR) subyacente y la lámina coriocapilar). Entre las enfermedades oculares no limitativas se incluyen, por ejemplo, DMAE (p.ej., la DMAE húmeda, la DMAE seca, la DMAE intermedia, la DMAE avanzada y la atrofia geográfica (AG)), degeneración macular, edema macular, EMD (p.ej., EMD no central focal y EMD difusa con afectación central), retinopatía, retinopatía diabética (RD) (p.ej., RD proliferativa (RDP), RD no proliferativa (RDNP) y RD a gran altura), otras retinopatías relacionadas con isquemia, ROP, oclusión de la vena de la retina (OVR) (p.ej., las formas central (OVRC) y ramificada (OVRR)), NVC (p.ej., NVC miópica), neovascularización corneal, enfermedades asociadas a la neovascularización corneal, neovascularización retiniana, enfermedades asociadas a la neovascularización retiniana/coroidal, retinopatía serosa central (RSC), miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis ocular, FEVR, enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, anomalías retinianas asociadas al síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (OPPG), hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomas retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (EMC), vasculitis,

papiloedema, retinitis, incluyendo, entre otras, la retinitis del CMV, melanoma ocular, blastoma retiniano, conjuntivitis (p.ej., conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (p.ej., alérgica)), amaurosis congénita Leber (también conocida como amaurosis congénita de Leber o ACL), uveítis (incluyendo uveítis infecciosa y no infecciosa), coroiditis (p.ej., coroiditis multifocal), histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, lesión ocular traumática, enfermedad de Sjögren y otras enfermedades oftalmológicas en las que la enfermedad o la enfermedad está asociada a neovascularización ocular, fuga vascular y/o edema retiniano o atrofia retiniana. Entre las enfermedades oculares de ejemplo adicionales se incluyen retinosis (escisión anormal de las capas neurosensoriales de la retina), enfermedades asociadas a la rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal del tejido fibrovascular o fibroso, incluyendo todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa. Entre las enfermedades de ejemplo asociadas a la neovascularización corneal se incluyen, entre otras, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, sobreuso de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis seca del pterigión, síndrome de Sjögren, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones por micobacterias, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simplex, infecciones por herpes zóster, infecciones por protozoos, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémica, poliarteritis, traumatismos, sarcoidosis de Wegener, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, queratotomía radial periférica y rechazo de injerto corneal. Entre las enfermedades de ejemplo asociadas a la neovascularización coroidal y los defectos en la vasculatura retiniana, incluyendo la fuga vascular incrementada, los aneurismas y pérdidas capilares se incluyen, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia de células falciformes, sarcoidosis, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de la carótida, uveítis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía del prematuro, edema retiniano (incluyendo edema macular), enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones causantes de retinitis o coroiditis (p.ej., coroiditis multifocal), histoplasmosis ocular presumida, enfermedad de Best (degeneración macular viteliforme), miopía, foveas ópticas, *pars planitis*, desprendimiento retiniano (p.ej., desprendimiento retiniano crónico), síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismos y complicaciones posláser. Entre las enfermedades de ejemplo asociadas a la atrofia de los tejidos retinianos (fotorreceptores

y el EPR subyacente) se incluyen, entre otras, DMAE atrófica o no exudativa (p.ej., atrofia geográfica o DMAE seca avanzada), atrofia macular (p.ej., atrofia asociada a neovascularización y/o atrofia geográfica), retinopatía diabética, enfermedad de Stargardt, distrofia de Sorsby del fondo, retinoesquiosis y retinitis pigmentaria.

La expresión “prospectos de envase” se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre indicaciones, uso, dosis, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias referentes a la utilización de dichos productos terapéuticos.

2. Descripción detallada de las formas de realización de la invención

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en la provisión de anticuerpos biespecíficos para la aplicación terapéutica. En determinados aspectos, se proporcionan anticuerpos que se unen a VEGF humano y a IL-1beta humana. Los anticuerpos de la invención resultan útiles, p.ej., para el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades vasculares, p.ej., enfermedades vasculares oculares.

A. Anticuerpos de ejemplo que se unen a VEGF humano e IL-1beta humana

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a VEGF humano y a IL-1beta humana. En un aspecto, se proporcionan anticuerpos aislados que se unen a VEGF humano y a IL-1beta humana. En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana.

En determinados aspectos, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un parátipo para VEGF (es decir, un sitio de unión al antígeno que se une a VEGF) y un parátipo para IL-1beta (es decir, un sitio de unión al antígeno que se une a IL-1beta) dentro de una pareja afín de un dominio VL y un dominio VH, en el que

- el parátipo para VEGF comprende residuos de aminoácido de CDR-H2, CDR-L1 y CDR-L3 del anticuerpo, en el que el parátipo para IL-1beta comprende residuos de aminoácido de CDR-H1, CDR-H3 y CDR-L2 del anticuerpo, y/o
- la pareja del dominio variable de la cadena ligera y del dominio variable de

la cadena pesada se une simultáneamente a VEGF humano e IL-1beta humana, y/o

- ninguno de los aminoácidos comprendidos en el parátipo para VEGF está comprendido en el parátipo para IL-1beta, y/o
- ninguno de los aminoácidos comprendidos en el parátipo para IL-1beta está comprendido en el parátipo para VEGF. y/o
- el anticuerpo se une al mismo epítipo en VEGF humano y al mismo epítipo en IL-1beta humana que un anticuerpo con un dominio variable de la cadena pesada de SEC ID nº 11 y un dominio variable de la cadena ligera de SEC ID nº 12, y/o
- un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o
- un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C, y/o
- un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C según se mide mediante dispersión de luz dinámica, y/o
- la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a VEGF humano inhibe la unión de VEGF a VEGFR2 con una IC_{50} inferior a 50 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC_{50} inferior a 30 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un parátipo para VEGF que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 y R83, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, E67, D68, Q69, R92, Y93, H94 e Y96, y un parátipo para IL-1beta que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 y D101, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57 e Y91.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8.

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11, en la que el dominio VH comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en la que el dominio VL comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en la que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que

comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11, en la que el dominio VH comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, R66, R83 y K94, y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en la que el dominio VL comprende los residuos de aminoácido I2, Y49, G57, E67, D68 y Q69, en la que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende: (a) un dominio

VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 sustituciones de aminoácidos.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 sustituciones de aminoácidos, en la que las sustituciones de aminoácidos están localizadas en las posiciones 3 a 25, 36 a 49, 97 a 82c, 84 a 93 o 103 a 113 de SEC ID nº 11, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 sustituciones de aminoácidos, en la que las sustituciones de aminoácidos están localizadas en las posiciones 1, 4, 6, 8 a 23, 35 a 48, 58 a 66, 70 a 88 o 98 a 107 de SEC ID nº 12, en la que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 sustituciones de aminoácidos.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco

de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, y que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 sustituciones de aminoácidos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VH que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11. En determinados aspectos, una secuencia de VH que presenta una identidad de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones respecto a la secuencia de referencia, aunque un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana que comprende dicha secuencia conserva la capacidad de unirse a VEGF humano y a IL-1beta humana. En determinados aspectos, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEC ID nº 11. En determinados aspectos, se producen sustituciones, inserciones o eliminaciones en regiones fuera de las CDR (es decir, en las FR). En un aspecto particular, la VH comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio VL que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12. En determinados aspectos, una secuencia de VL que presenta una identidad de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % contiene sustituciones (por ejemplo sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones respecto a la secuencia de referencia, aunque un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana que comprende dicha secuencia conserva la capacidad de unirse a VEGF humano y a IL-1beta humana. En determinados aspectos, se ha sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEC ID nº 12. En determinados aspectos, se producen sustituciones, inserciones o eliminaciones en regiones fuera de las

CDR (es decir, en las FR). En un aspecto particular, la VL comprende: (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (b) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, y (c) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH tal como en cualquiera de los aspectos proporcionados anteriormente y una secuencia de VL tal como en cualquiera de los aspectos proporcionados anteriormente. En un aspecto, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEC ID nº 11 y SEC ID nº 12, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccionales de dichas secuencias.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID nº 20 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID nº 19.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID nº 18 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID nº 19.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana según cualquiera de los aspectos anteriores es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

En un aspecto adicional, un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana según cualquiera de los aspectos anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, tal como se indica en las secciones 1 a 7, posteriormente:

1. Afinidad de anticuerpos

En determinadas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria se une a VEGF con una constante de disociación (K_D) ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM o $\leq 0,01$ nM. En determinadas formas de realización, un anticuerpo que se une a IL-1beta

presenta una constante de disociación (K_D) ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM o $\leq 0,03$ nM.

En un aspecto, se mide K_D utilizando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE®.

Por ejemplo, se midió la K_D del anticuerpo de unión a VEGF en un ensayo utilizando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) realizado a 25 °C con VEGF121 inmovilizado sobre chips C1 a ~10 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (1,2 nM a 100 nM) en HBS-P+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, tensioactivo P20 al 0,05 %) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 30 μ l/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (*software* de evaluación BIACORE®, versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y de disociación. La constante de disociación (K_D) de equilibrio se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Ver, p.ej., Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999.

Por ejemplo, se midió la K_D del anticuerpo de unión a IL-1beta en un ensayo utilizando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) realizado a 25 °C con anticuerpo biespecífico inmovilizado sobre chips C1 a ~20 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de IL-1beta humana (0,74 a 60 nM) en HBS-P+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, tensioactivo P20 al 0,05 %) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 30 μ l/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (*software* de evaluación BIACORE®, versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y de disociación. La constante de disociación (K_D) de equilibrio se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Ver, p.ej., Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados aspectos, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', Fab'-SH o F(ab')₂, en particular un fragmento Fab. La digestión con papaína de anticuerpos intactos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos denominados fragmentos "Fab" cada uno

de los cuales contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera (VH y VL, respectivamente) y también el dominio constante de la cadena ligera (CL) y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. De esta manera, la expresión "fragmento Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio CL, y un fragmento de la cadena pesada que comprende un dominio VH y un dominio CH1. Los "fragmentos Fab" difieren de los fragmentos Fab en la adición de residuos al extremo carboxilo del dominio CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH son fragmentos Fab' en los que el residuo o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que presenta dos sitios de unión al antígeno (dos fragmentos Fab) y una parte de la región Fc. Para un análisis sobre los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden residuos de epítipo ligante de receptor de rescate y que presentan una semivida *in vivo* incrementada, ver la patente US nº 5.869.046.

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción recombinante por parte de células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o CHO), tal como se indica en la presente memoria.

3. Estabilidad térmica

Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria muestran una estabilidad térmica superior. En determinadas formas de realización, un fragmento Fab de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C. En determinadas formas de realización, un fragmento Fab de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

4. Anticuerpos derivados de colección

En determinados aspectos, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria se obtiene a partir de una colección. Pueden aislarse anticuerpos de la invención mediante el cribado de colecciones combinatoriales para anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Los métodos para cribar las colecciones combinatoriales se revisan en, p.ej., Lerner *et al.*, Nature Reviews 16:498-508, 2016. Por ejemplo, una diversidad de métodos es conocida de la técnica para la generación de colecciones de

expresión fágica y el cribado de dichas colecciones para anticuerpos que presenten las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan en, p.ej., Frenzel *et al.*, *mAbs* 8:1177-1194, 2016; Bazan *et al.*, *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8:1817-1828, 2012, y Zhao *et al.*, *Critical Reviews in Biotechnology* 36:276-289, 2016, así como en Hoogenboom *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y en Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ., 2003).

En determinados métodos de expresión fágica, los repertorios de genes de VH y VL se clonan separadamente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones fágicas, que después pueden cribarse para fagos de unión al antígeno, tal como se indica en Winter *et al.*, *Annual Review of Immunology* 12: 433-455, 1994. Los fagos típicamente expresan fragmentos de anticuerpo, en forma de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o como fragmentos Fab. Las colecciones procedentes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio no sensibilizado puede clonarse (p.ej., a partir de seres humanos), proporcionando una fuente única de anticuerpos contra un amplio abanico de no autoantígenos y también autoantígenos sin ninguna inmunización, tal como indican Griffiths *et al.*, *EMBO Journal* 12: 725-734, 1993. Además, también pueden prepararse colecciones no sensibilizadas, sintéticamente mediante clonación de segmentos de gen V no reorganizados a partir de células madre, utilizando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria que codifica las regiones CDR3 altamente variables y que lleva a cabo la reorganización *in vitro*, tal como se indica en Hoogenboom y Winter, *Journal of Molecular Biology* 227: 381-388, 1992. Entre las publicaciones de patente que describen colecciones fágicas de anticuerpos humanos se incluyen, por ejemplo: las patentes US nº 5.750.373, nº 7.985.840, nº 7.785.903 y nº 8.679.490, así como las publicaciones de patente US nº 2005/0079574, nº 2007/0117126, nº 2007/0237764 y nº 2007/0292936.

Entre los ejemplos adicionales de métodos conocidos de la técnica para el cribado de colecciones combinatoriales para anticuerpos con una o más actividades deseadas se incluyen la expresión ribosómica y de ARNm, así como métodos para la expresión y selección de anticuerpos sobre bacterias, células de mamífero, células de insecto o células de levadura. Se proporciona una revisión de los métodos para la expresión en la superficie de levaduras en, p.ej., Scholler *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 503:135-56, 2012, y en Cherf *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 1319:155-175, 2015, así como

en Zhao *et al.*, Methods in Molecular Biology 889:73-84, 2012. Los métodos para la expresión ribosómica se describen en, p.ej., He *et al.*, Nucleic Acids Research 25:5132-5134, 1997, y en Hanes *et al.*, PNAS 94:4937-4942, 1997.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en la presente memoria.

5. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados aspectos, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo multiespecífico. Los “anticuerpos multiespecíficos” son anticuerpos monoclonales que presentan especificidades de unión para por lo menos dos sitios diferentes, es decir, diferentes epítomos en diferentes antígenos o diferentes epítomos en el mismo antígeno. En determinados aspectos, el anticuerpo multiespecífico presenta tres o más especificidades de unión.

Los anticuerpos multiespecíficos con tres o más especificidades de unión que comprenden anticuerpos proporcionados en la presente memoria pueden proporcionarse en forma asimétrica con un cruce de dominios en uno o más brazos de unión de la misma especificidad de antígeno, es decir, mediante intercambio de los dominios VH/VL (ver, p.ej. los documentos nº WO 2009/080252 y nº WO 2015/150447), los dominios CH1/CL (ver, p.ej., el documento nº WO 2009/080253) o los brazos Fab completos (ver, p.ej., los documentos nº WO 2009/080251 y nº WO 2016/016299; ver también Schaefer *et al.*, PNAS, 108:1187-1191, 2011, y Klein *et al.*, MAbs 8:1010-20, 2016). Se conocen de la técnica diversos formatos moleculares adicionales para anticuerpos multiespecíficos y se encuentran incluidos en la presente memoria (ver, p.ej., Spiess *et al.*, Mol. Immunol. 67:95-106, 2015).

6. Variantes de anticuerpo

En determinados aspectos, las variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se encuentran contempladas. Por ejemplo, puede resultar deseable alterar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos codificante del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Entre dichas

modificaciones se incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para conseguir el constructo final, con la condición de que el constructo final presente las características deseadas, por ejemplo, unión al antígeno.

En determinados aspectos, se proporcionan variantes del anticuerpo que presentan una o más sustituciones de aminoácidos. Entre los sitios de interés de la mutagénesis por sustitución se incluyen las CDR y las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla, a continuación, con el encabezamiento "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1, con el encabezamiento "sustituciones de ejemplo", y tal como se describe adicionalmente después en referencia a las clases de cadena lateral de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribarse los productos para una actividad deseada, por ejemplo, la unión conservada/mejorada al antígeno, una inmunogenicidad reducida o una ADCC o CDC mejorada.

TABLA

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferentes
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden clasificarse según propiedades de cadena lateral comunes:

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

Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un miembro de una de dichas clases por uno de otra clase.

Un tipo de variante por sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para el estudio adicional presentarán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, una afinidad incrementada, una inmunogenicidad reducida) respecto al anticuerpo parental y/o presentarán determinadas propiedades biológicas sustancialmente conservadas del anticuerpo parental. Una variante por sustitución de ejemplo es un anticuerpo de afinidad madurada, que puede generarse convenientemente, por ejemplo, utilizando técnicas de maduración de la afinidad basadas en la expresión fágica, tales como las descritas en la presente memoria. Brevemente, se mutan uno o más residuos de CDR y los anticuerpos variantes se expresan sobre el fago y se criban para una actividad biológica particular (p.ej., afinidad de unión).

Pueden realizarse alteraciones (p.ej., sustituciones) en las CDR, p.ej., para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones pueden llevarse a cabo en “puntos calientes” de CDR, es decir, residuos codificados por codones que experimentan mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, p.ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008, y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, sometiendo a ensayo la VH o VL variante resultante para afinidad de unión. La maduración de afinidad mediante la construcción y reelección a partir de colecciones secundarias ha sido descrita en, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). En algunos aspectos de la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para la maduración mediante cualquiera de entre una diversidad de métodos (por ejemplo, PCR con tendencia a errores, reorganización de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una colección secundaria. Seguidamente se criba la colección con el fin de identificar cualesquiera variantes de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a CDR, en los que se aleatorizan varios residuos de la CDR (por ejemplo, 4 a 6 residuos por vez). Los residuos de CDR que participan en la unión del antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, utilizando mutagénesis de escaneo de alaninas o el modelaje. En particular, con frecuencia son dianas CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados aspectos, pueden producirse sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o más CDR con la condición de que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden realizarse alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras tal como las proporcionadas en la presente memoria) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las CDR. Dichas alteraciones pueden encontrarse, por ejemplo, en el exterior de los residuos que entran en contacto con los antígenos en las CDR. En determinadas secuencias de VH y VL variante proporcionadas anteriormente, cada CDR se encuentra no alterada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser diana para la mutagénesis es el denominado “mutagénesis por escaneo de alaninas”, tal como se describe en Cunningham y Wells, *Science* 244:1081-1085, 1989. En este método, un residuo o grupo de residuos diana (p.ej., residuos con carga, tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y se sustituyen por un aminoácido neutro o con carga negativa (p.ej., alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno resulta afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácido, demostrando sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo puede utilizarse para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos pueden ser las dianas o ser eliminados como candidatos para la sustitución. Pueden cribarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Entre las inserciones de secuencia de aminoácidos se incluyen las fusiones del extremo amino y/o del extremo carboxilo de longitud comprendida entre un residuo y polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones dentro de una secuencia de un solo residuo o múltiples residuos de aminoácido. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo del extremo N. Entre otras variantes por inserción de la molécula de anticuerpo se incluyen la fusión con el extremo N o C del anticuerpo con un enzima (por ejemplo, para ADEPT, por sus siglas en inglés, terapia con profármacos enzimáticos dirigida por anticuerpos)) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

a) Variantes por glucosilación

En determinados aspectos, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria se

altera para incrementar o reducir el grado con el que se glucosila el anticuerpo. La adición o eliminación de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede llevarse a cabo convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que se genere o se elimine uno o más sitios de glucosilación.

En el caso de que el anticuerpo comprenda una región Fc, el oligosacárido unido a este puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por las células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente se une mediante un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright *et al.*, TIBTECH 15:26-32, 1997. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el “tallo” de la estructura oligosacárida biantenaria. En algunos aspectos, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un aspecto, se proporcionan variantes de anticuerpo que presentan un oligosacárido no fucosilado, es decir, una estructura de oligosacárido que no presenta fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dicho oligosacárido no fucosilado (también denominado oligosacárido “afucosilado”) particularmente es un oligosacárido unido a N que no presenta un residuo de fucosa unido al primer GlcNAc en el tallo de la estructura biantenaria del oligosacárido. En un aspecto, se proporcionan variantes de anticuerpo que presentan una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc, en comparación con un anticuerpo nativo o parental. Por ejemplo, la proporción de oligosacáridos no fucosilados puede ser de por lo menos aproximadamente 20 %, de por lo menos aproximadamente 40 %, de por lo menos aproximadamente 60 %, de por lo menos aproximadamente 80 %, o incluso de aproximadamente 100 % (es decir, no se encuentran presentes oligosacáridos fucosilados). El porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es la cantidad (promedio) de oligosacáridos que no presentan residuos de fucosa, respecto a la suma de todos los oligosacáridos unidos a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa), según medición realizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se describe en el documento nº WO 2006/082515, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar situado aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5 o en dirección 3 de la posición 297, es decir, entre las

posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de la secuencia en los anticuerpos. Dichos anticuerpos que presentan una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc pueden presentar una función de unión al receptor FcγRIIIa mejorada y/o una función efectora mejorada, en particular una función de ADCC mejorada. Ver, p.ej., los documentos n° US 2003/0157108 y n° US 2004/0093621.

Entre los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos con fucosilación reducida se incluyen las células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de las proteínas (Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545, 1986; documentos n° US 2003/0157108 y n° WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares inactivadas, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO inactivadas (ver, p.ej., Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87:614-622 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688, 2006, y el documento n° WO 2003/085107), o células con actividad reducida o anulada de una proteína de síntesis o transportadora de GDP-fucosa (ver, p.ej., los documentos n° US2004259150, n° US2005031613, n° US2004132140 y n° US2004110282).

En un aspecto adicional, se proporcionan variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se encuentra bisectado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden presentar un nivel reducido de fucosilación y/o una función ADCC mejorada, tal como se ha indicado anteriormente. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo en, p.ej., Umana *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 17, 176-180, 1999; Ferrara *et al.*, *Biotechn Bioeng* 93:851-861, 2006; documentos n° WO 99/54342, n° WO 2004/065540 y n° WO 2003/011878.

También se proporcionan variantes de anticuerpo con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden presentar una función CDC mejorada. Se describen tales variantes de anticuerpo en, por ejemplo, los documentos n° WO 1997/30087, n° WO 1998/58964 y n° WO 1999/22764.

b) Variantes de región Fc

En determinados aspectos, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria, generando de esta manera una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG₁,

IgG₂, IgG₃ o IgG₄ humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En determinados aspectos, la invención contempla una variante de anticuerpo que presenta algunas, aunque no todas, las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* resulta importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) resultan innecesarias o perjudiciales. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de las actividades de CDC y/o de ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión de receptor de Fc (FcR) con el fin de garantizar que el anticuerpo no presente unión a FcγR (por lo tanto, probablemente no presente actividad de ADCC), aunque conserve la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, únicamente expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR sobre las células hematopoyéticas se resume en la tabla 3, en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991. Los ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente US nº 5.500.362 (ver, p.ej., Hellstrom I. *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063, 1986, y Hellstrom I. *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); patente US nº 5.821.337 (ver Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361, 1987. Alternativamente, pueden utilizarse métodos de ensayo no radioactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc., Mountain View, CA, y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96®, Promega, Madison, WI). Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y los linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656, 1998. También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y que, por lo tanto, no presenta actividad de CDC. Ver, p.ej., el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos nº WO 2006/029879 y nº WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163, 1996; Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101:1045-1052, 2003, y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743, 2004). La unión a FcRn y las

determinaciones de eliminación/semivida *in vivo* también pueden llevarse a cabo utilizando métodos conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Petkova S.B. *et al.*, *Int. Immunol.* 18(12):1759-1769, 2006; documento nº WO 2013/120929 A1).

Entre los anticuerpos con una función efectora reducida se incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc nº 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente US nº 6.737.056). Entre dichos Fc mutantes se incluyen los Fc mutantes con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo la Fc mutante denominada "DANA", con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente US nº 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a FcR (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.737.056; el documento nº WO 2004/056312, y Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604, 2001).

En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a FcγR, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 234 y 235 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En un aspecto, las sustituciones son L234A y L235A (LALA). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende además D265A y/o P329G en una región Fc derivada de una región Fc de la IgG₁ humana. En un aspecto, las sustituciones son L234A, L235A y P329G (LALA-PG) en una región Fc derivada de una región Fc de la IgG₁ humana (ver, p.ej., el documento nº WO 2012/130831). En otro aspecto, las sustituciones son L234A, L235A y P329G (LALA-DA) en una región Fc derivada de una región Fc de la IgG₁ humana.

En algunos aspectos, se realizan alteraciones en la región Fc que provocan una unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir, mejorada o reducida), por ejemplo, tal como se indica en la patente US nº 6.194.551 y documento nº WO 99/51642, e Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184, 2000.

Los anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer

et al., *J. Immunol.* 117:587, 1976 y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249, 1994, se describen en el documento nº US2005/0014934 (Hinton *et al.*). Dichos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Entre dichas Fc variantes se incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 252, 254, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, p.ej., la sustitución del residuo de la región Fc 434 (ver, p.ej., la patente US nº 7.371.826; Dall'Acqua, W.F., *et al.* *J. Biol. Chem.* 281:23514-23524, 2006).

Los residuos de la región Fc críticos para la interacción entre la región Fc de ratón-FcRn de ratón han sido identificados mediante mutagénesis dirigida al sitio (ver, por ejemplo, Dall'Acqua W.F. *et al.*, *J. Immunol* 169:5171-5180, 2002). Los residuos I253, H310, H433, N434 y H435 (numeración según el índice EU) participan en la interacción (Medesan C. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 26:2533, 1996; Firan M. *et al.*, *Int. Immunol.* 13:993, 2001; Kim, J.K., *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:542, 1994). Se ha descubierto que los residuos I253, H310 y H435 resultan críticos para la interacción de la región Fc humana con el FcRn murino (Kim J.K. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 29:2819, 1999). Los estudios del complejo de región Fc humana-FcRn humano han demostrado que los residuos I253, S254, H435 e Y436 resultan cruciales para la interacción (Firan M. *et al.*, *Int. Immunol.* 13:993, 2001; Shields R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, 2001. En Yeung Y.A. *et al.* (*J. Immunol.* 182:7667-7671, 2009) se ha informado y han sido examinados diversos mutantes de los residuos 248 a 259 y 301 a 317 y 376 a 382 y 424 a 437.

En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos, que reducen la unión a FcRn, p.ej., sustituciones en las posiciones 253 y/o 310 y/o 435 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 253, 310 y 435. En un aspecto, las sustituciones son I253A, H310A y H435A en una región Fc derivada de una región Fc de la IgG₁ humana Ver, p.ej., Grevys A. *et al.*, *J. Immunol.* 194:5497-5508, 2015.

En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos, que reducen la unión a FcRn, p.ej., sustituciones en las posiciones 310 y/o 433 y/o 436 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 310, 433 y 436. En un aspecto, las

sustituciones son H310A, H433A e Y436A en una región Fc derivada de una región Fc de la IgG₁ humana (ver, p.ej., el documento nº WO 2014/177460 A1).

En determinados aspectos, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos, que incrementan la unión a FcRn, p.ej., sustituciones en las posiciones 252 y/o 254 y/o 256 de la región Fc (numeración EU de los residuos). En determinados aspectos, la variante de anticuerpo comprende una región Fc con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 252, 254 y 256. En un aspecto, las sustituciones son M252Y, S254T y T256E en una región Fc derivada de una región Fc de la IgG₁ humana Ver también Duncan y Winter, Nature 322:738-740, 1988, patentes US nº 5.648.260 y nº 5.624.821 y documento nº WO 94/29351 referentes a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

El extremo C de la cadena pesada del anticuerpo tal como se informa en la presente memoria puede ser un extremo C que finaliza con los residuos de aminoácido PGK. El extremo C de la cadena pesada puede ser un extremo C acortado en el que se han eliminado uno o dos de los residuos de aminoácido del extremo C. En un aspecto preferente, el extremo C de la cadena pesada es un extremo C acortado que finaliza en PG. En un aspecto de todos los aspectos informados en la presente memoria, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 del extremo C tal como se especifica en la presente memoria comprende el dipéptido glicina-lisina del extremo C (G446 y K447, numeración según el índice EU de Kabat de las posiciones de los aminoácidos). En un aspecto de todos los aspectos informados en la presente memoria, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 del extremo C tal como se especifica en la presente memoria comprende un residuo de glicina del extremo C (G446, numeración según el índice EU de Kabat de las posiciones de los aminoácidos).

c) Variantes de anticuerpo manipulados con cisteínas

En determinados aspectos, puede resultar deseable crear anticuerpos manipulados con cisteínas, por ejemplo, los anticuerpos THIOMAB™, en las que se han sustituido uno o más residuos de un anticuerpo por residuos de cisteína. En aspectos particulares, los residuos sustituidos se encuentran en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de aquellos residuos con cisteína, se sitúan los grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otros grupos, tales como grupos farmacológicos o grupos de molécula conectora-fármaco, con

el fin de crear un inmunoconjugado, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria. Pueden generarse anticuerpos manipulados con cisteínas tal como se indica en, por ejemplo, las patentes US nº 7.521.541, nº 8,30.930, nº 7.855.275, nº 9.000.130 o en el documento nº WO 2016040856.

7. Inmunoconjugados

La invención proporciona además inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana tal como se da a conocer en la presente memoria conjugado (unido químicamente) con uno o más agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas), o isótopos radioactivos.

En un aspecto, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) en el que se conjuga un anticuerpo con uno o más agentes terapéuticos mencionados anteriormente. El anticuerpo típicamente se conecta con uno o más de los agentes terapéuticos utilizando conectores. Se proporciona una visión general de la tecnología de los ADC, incluyendo ejemplos de agentes terapéuticos y fármacos y conectores, en Pharmacol. Review 68:3-19, 2016.

B. Métodos y composiciones recombinantes

Pueden producirse anticuerpos utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en la patente US nº 4.816.567. Para estos métodos, se proporciona uno o más ácidos nucleicos aislados codificantes de un anticuerpo.

En un aspecto, se proporcionan ácidos nucleicos aislados codificantes de un anticuerpo de la invención.

En un aspecto, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el método comprende cultivar una célula huésped que comprende uno o más ácidos nucleicos codificantes del anticuerpo, tal como se ha proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo a partir de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, se aíslan ácidos nucleicos codificantes del anticuerpo, por ejemplo, tal como se ha indicado anteriormente, y se insertan en uno o más vectores para la clonación adicional y/o la expresión en una célula huésped. Dichos ácidos nucleicos pueden aislarse fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo) o producirse mediante métodos recombinantes u obtenerse mediante síntesis química.

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores codificantes de anticuerpos se incluyen las células procariotas o eucariotas indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular en el caso de que la glucosilación y la función efectora de Fc no resulten necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.648.237, nº 5.789.199 y nº 5.840.523 (ver, además, Charlton K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C., ed., Humana Press, Totowa, NJ, páginas 245 a 254, 2003, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Tras la expresión, el anticuerpo puede aislarse a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

También pueden utilizarse células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden resultar útiles líneas celulares de mamífero adaptadas para el crecimiento en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7), la línea renal embrionaria humana (células 293 o 293T, tal como se describen en, por ejemplo, Graham F.L. *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36:59-74, 1977), células renales de hámster neonato (BHK, por sus siglas en inglés), células de Sertoli de ratón (células TM4, tal como se describen en, p.ej., Mather J.P., *Biol. Reprod.* 23:243-252, 1980), células renales de mono (CV1), células renales de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma cervical humano (HELA), células renales caninas (MDCK), células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A), células pulmonares humanas (W138), células hepáticas humanas (Hep G2), tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (tal como se describen en, por ejemplo, Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68, 1983; células MRC5 y células FS4. Entre otras líneas celulares huésped de mamífero útiles se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células CHO DHFR⁻ (Urlaub G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980) y

las líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, ver, p.ej., Yazaki P. y Wu A.M., *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, páginas 255 a 268, 2004.

En un aspecto, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (p.ej., una célula Y0, NS0 o Sp20).

C. Composiciones farmacéuticas

En un aspecto adicional, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria, por ejemplo, para su utilización en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente indicados. En un aspecto, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria y por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, tal como se indica posteriormente.

Las composiciones farmacéuticas de un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana tal como se indica en la presente memoria se preparan mediante la mezcla de dicho anticuerpo que presenta el grado de pureza deseado con uno o más portadores opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16a edición, Osol A. (editor), 1980, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables generalmente resultan no tóxicos para el receptor a las dosis y concentraciones utilizadas, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, amortiguadores, tales como histidina, fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metilparabeno o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos) proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o

sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Entre los portadores farmacéuticamente aceptables de ejemplo en la presente memoria se incluyen, además, agentes de dispersión de fármaco intersticial, tales como glucoproteínas hialuronidasa solubles (sHASEGP) activas a pH neutro, por ejemplo, las glucoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Halozyme, Inc.). Determinados sHASEGP de ejemplo y métodos de utilización, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente US nº 2005/0260186 y nº 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen composiciones liofilizadas de anticuerpo de ejemplo en la patente US nº 6.267.958. Entre las composiciones acuosas de anticuerpos se incluyen las indicadas en la patente US nº 6.171.586 y en el documento nº WO 2006/044908, en los que las últimas formulaciones incluyen un amortiguador de histidina-acetato.

La composición farmacéutica de la presente memoria puede contener, además, más de un ingrediente activo, según resulte necesario para la indicación particular en tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no presenten efectos mutuos adversos. Dichos ingredientes activos se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito previsto.

Los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración coloidal de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16a edición, Osol A., editor, 1980.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas para la liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las composiciones farmacéuticas que deben utilizarse para la administración *in vivo* son

generalmente estériles. La esterilidad puede alcanzarse fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estéril.

D. Métodos terapéuticos y vías de administración

Cualquiera de los anticuerpos que se unen a VEGF humano y a IL-1beta humana proporcionados en la presente memoria puede utilizarse en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana para su utilización como medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana para su utilización en el tratamiento de una enfermedad vascular. En determinados aspectos, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana para su utilización en un método de tratamiento. En determinados aspectos, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana para su utilización en un método de tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad vascular, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana. En uno de dichos aspectos, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional (p.ej., uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes terapéuticos adicionales), p.ej., tal como se describe posteriormente. En aspectos adicionales, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana para su utilización en la inhibición de la angiogénesis. En determinados aspectos, la invención proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana para su utilización en un método de inhibición de la angiogénesis en un individuo, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana a fin de inhibir la angiogénesis. Un "individuo" según cualquiera de los aspectos anteriormente indicados preferentemente es un ser humano.

En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana para su utilización en el tratamiento de una enfermedad ocular. En una forma de realización, la enfermedad ocular se selecciona de DMAE (en una realización, DMAE húmeda, DMAE seca, DMAE intermedia, DMAE avanzada y atrofia geográfica (AG)), degeneración macular, edema macular, EMD (en una forma de realización, EMD no central focal y EMD difusa con afectación central), retinopatía, retinopatía diabética (RD) (en una forma de realización, RD proliferativa (RDP), RD no proliferativa (RDNP) y

RD a gran altura), otras retinopatías relacionadas con isquemia, retinopatía del prematuro (RP), oclusión de la vena de la retina (OVR) (en una forma de realización, las formas central (OVRC) y ramificada (OVRR)), NVC (en una forma de realización, NVC miópica), neovascularización corneal, enfermedades asociadas a la neovascularización corneal, neovascularización retiniana, enfermedades asociadas a la neovascularización retiniana/coroidal, retinopatía serosa central (RSC), miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis ocular, vitreorretinopatía exudativa familiar (VREF), enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, anormalidades retinianas asociadas al síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (OPPG), hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomatosa retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (EMC), vasculitis, papiloedema, retinitis, incluyendo, entre otras, la retinitis del CMV, melanoma ocular, blastoma retiniano, conjuntivitis (en una forma de realización, conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (en una forma de realización, alérgica)), amaurosis congénita Leber (también conocida como amaurosis congénita de Leber o ACL), uveítis (incluyendo uveítis infecciosa y no infecciosa), coroiditis (en una forma de realización, coroiditis multifocal), histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, lesión ocular traumática, enfermedad de Sjögren y otras enfermedades oftalmológicas en las que la enfermedad está asociada a neovascularización ocular, fuga vascular y/o edema retiniano o atrofia retiniana. En una forma de realización, la enfermedad ocular se selecciona de DMAE (en una forma de realización, DMAE húmeda, DMAE seca, DMAE intermedia, DMAE avanzada y atrofia geográfica (AG)), degeneración macular, edema macular, EMD (en una forma de realización, EMD no céntrica focal y EMD difusa con afectación central), retinopatía, retinopatía diabética (RD) (en una forma de realización, RD proliferativa (RDP), RD no proliferativa (RDNP) y RD a gran altura.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la utilización de un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana en la fabricación o preparación de un medicamento. En un aspecto, el medicamento está destinado al tratamiento de una enfermedad vascular. En un aspecto adicional, el medicamento está destinado a su utilización en un método de tratamiento de una enfermedad vascular, que comprende administrar en un individuo que presenta una enfermedad vascular una cantidad eficaz del medicamento. En uno de dichos aspectos, el método comprende además administrar en el individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, p.ej.,

tal como se indica posteriormente.

En un aspecto, el medicamento está destinado al tratamiento de una enfermedad ocular. En un aspecto adicional, el medicamento está destinado a su utilización en un método de tratamiento de una enfermedad ocular, que comprende administrar en un individuo que presenta una enfermedad ocular una cantidad eficaz del medicamento. En uno de dichos aspectos, el método comprende además administrar en el individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, p.ej., tal como se indica posteriormente.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad vascular. En un aspecto, el método comprende administrar en un individuo que presenta dicha enfermedad vascular una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana. En uno de dichos aspectos, el método comprende además administrar en el individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, tal como se indica posteriormente.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad ocular. En un aspecto, el método comprende administrar en un individuo que presenta dicha enfermedad ocular una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana. En uno de dichos aspectos, el método comprende además administrar en el individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, tal como se indica posteriormente.

Un "individuo" según cualquiera de los aspectos anteriormente indicados puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos que se unen a VEGF humano y a IL-1beta humana proporcionados en la presente memoria, p.ej. para su utilización en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente indicados. En un aspecto, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos que se unen a VEGF humano y a IL-1beta humana proporcionados en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos que se unen a VEGF humano y a IL-1beta humana proporcionados en la presente memoria y por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, tal como se indica posteriormente.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o utilizarse en una politerapia. Por ejemplo, la politerapia incluye administrar un anticuerpo de la invención y la administración de por lo menos un agente terapéutico adicional (p.ej., uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes terapéuticos adicionales).

Por ejemplo, en determinadas formas de realización, cualquiera de los métodos anteriores comprende además la administración de uno o más compuestos adicionales. En determinadas formas de realización, el anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana proporcionado en la presente memoria se administra simultáneamente con el compuesto o los compuestos adicionales. En determinadas formas de realización, el anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana se administra antes o después del compuesto o los compuestos adicionales. En determinadas formas de realización, el compuesto adicional se une a una segunda molécula biológica seleccionada del grupo que consiste en IL-6, IL-6R, IL-13, IL-13R, PDGF, angiopoyetina, Ang2, Tie2, S1P, integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ y $\alpha5\beta1$, betacelulina, apelin/APJ, eritropoyetina, factor del complemento D, TNF α , HtrA1, un receptor de VEGF, receptor de ST-2 y proteínas genéticamente asociadas al riesgo de DMAE, tales como los componentes de la ruta del complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a, HtrA1, ARMS2, TIMP3, HLA, interleuquina-8 (IL-8), CX3CR1, TLR3, TLR4, CETP, LPC, COL10A1 y TNFRSF10A. En determinadas formas de realización, el compuesto adicional es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

En determinadas formas de realización según (o aplicadas a) cualquiera de las formas de realización anteriores, el trastorno ocular es una enfermedad neovascular intraocular seleccionada del grupo que consiste en retinopatías proliferativas, neovascularización coroidal (NVC), degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatías diabéticas y otras relacionadas con isquemia, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión de la vena de la retina (OVR), incluyendo la OVRC y la OVRR, neovascularización corneal, neovascularización retiniana y retinopatía del prematuro (RP).

En algunos casos, un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana proporcionado en la presente memoria puede administrarse en combinación con por lo menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno ocular, por ejemplo, un trastorno ocular indicado en la presente memoria (p.ej., DMAE (p.ej., DMAE húmeda), EMD, RD, OVR o AG). Entre los agentes terapéuticos adicionales de ejemplo

para la politerapia para el tratamiento de trastornos oculares se incluyen, entre otros, agentes antiangiogénicos, tales como antagonistas de VEGF, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF (p.ej., el Fab anti-VEGF LUCENTIS® (ranibizumab)), proteínas de fusión de receptor soluble (p.ej., la proteína de fusión de receptor soluble recombinante EYLEA® (aflibercept, también conocido como VEGF Trap Eye; Regeneron/Aventis)), aptámeros (p.ej., el aptámero pegilado anti-VEGF MACUGEN® (pegaptanib sodio; NeXstar Pharmaceuticals/OSI Pharmaceuticals)) y los inhibidores de tirosina quinasa de VEGFR (p.ej., 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidín-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidín-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171), vatalanib (PTK787), semaxaminib (SU5416; SUGEN) y SUTENT® (sunitinib)); triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS), escualamina, RETAANE® (acetato de anecortave para suspensión de depósito, Alcon, Inc.), profármaco combretastatina A4 (CA4P); MIFEPREX® (mifepristona-ru486); acetónido de triamcinolona subtenoniana, acetónido de triamcinolona cristalina intravítrea, inhibidores de metaloproteinasa matricial (p.ej., Prinomastat (AG3340; Pfizer)), acetónido de fluocinolona (incluyendo el implante intraocular de fluocinolona, Bausch & Lomb/Control Delivery Systems), linomida, inhibidores de la función de la integrina $\beta 3$, angiostatina y combinaciones de estos. Estos y otros agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1 β humana de la invención se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente US nº 2014/0017244, que se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria.

Entre los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos adicionales que pueden utilizarse en combinación con un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1 β humana proporcionados en la presente memoria para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG) se incluyen, entre otros, VISUDYNE® (verteporfina, un fármaco activado por luz que se utiliza típicamente junto con la terapia fotodinámica con un láser no térmico), PKC412, Endovion (NS 3728; NeuroSearch A/S), factores neurotróficos (p.ej., el factor neurotrófico derivado de la glía (FNDG) y el factor neurotrófico ciliar (FNTC)), diltiazem, dorzolamida, PHOTOTROP®, 9-cis-retinal, medicación ocular (p.ej., yoduro de fosfolina, ecotiofato o inhibidores de la anhidrasa carbónica), veovastat (AE-941; AEterna Laboratories, Inc.), Sima-027 (AGF-745; Sima Therapeutics, Inc.), neurotrofinas (incluyendo, únicamente a título de ejemplo, NT-4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), antagonistas de integrina (incluyendo los obtenidos de Jerini AG y de Abbott Laboratories), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), talidomida (tal

como la utiliza, por ejemplo, EntreMed, Inc.), cardiotrofina-1 (Genentech), 2-metoxiestradiol (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), tetratiomolibdato (University of Michigan), LYN-002 (Lynkeus Biotech), compuesto microalgal (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group plc), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-beta 2 (Genzyme/Celtrix), inhibidores de tirosina quinasa (p.ej., los de Allergan, SUGEN, o Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), neuroprotectores de células de los ganglios retinianos (Cogent Neurosciences), derivados de N-nitropirazol (Texas A&M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), ciclosporina A, agentes terapéuticos utilizados en la terapia fotodinámica (p.ej., VISUDYNE®; PDT con diana en receptores, Bristol-Myers Squibb, Co.; porfímero sódico para la inyección con PDT, verteporfina, QLT Inc., rostoporfina con PDT, Miravent Medical Technologies, talaporfina sódica con PDT, Nippon Petroleum, y motexafina lutecio, Pharmacyclics, Inc.), oligonucleótidos no codificantes (incluyendo, a título de ejemplo, los productos sometidos a ensayo por Novagali Pharma SA e ISIS-13650, Ionis Pharmaceuticals), y combinaciones de estos.

Un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana tal como se proporciona en la presente memoria puede administrarse en combinación con una terapia o un procedimiento quirúrgico para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG), incluyendo, por ejemplo, fotocoagulación por láser (p.ej., la fotocoagulación panretiniana (FCP)), tratamiento con láser de las drusas, cirugía de perforación macular, cirugía de traslocación macular, telescopio en miniatura implantable, angiografía "PHI-motion" (también conocida como terapia microláser y tratamiento de vasos alimentadores), terapia de haz de protones, terapia de microestimulación, desprendimiento retiniano y cirugía vítrea, cierre esclerótico, cirugía submacular, termoterapia transpupilar, terapia del fotosistema I, utilización de la interferencia de ARN (ARNi), reoféresis extracorpórea (también conocida como filtración diferencial de membrana y reoterapia), implantación de microchip, terapia de células madre, terapia de sustitución génica, terapia de genes de ribozima (incluyendo la terapia génica para el elemento de respuesta a la hipoxia, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix, y terapia del gen de PDEF, GenVec), trasplante de células fotorreceptoras/retinianas (incluyendo células epiteliales retinianas trasplantables, Diacrin, Inc.; trasplante de células retinianas, p.ej., Astellas Pharma US, Inc., ReNeuron, CHA Biotech), acupuntura, y combinaciones de estos.

En algunos casos, un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana puede administrarse en combinación con un agente antiangiogénico para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG). Puede utilizarse cualquier agente antiangiogénico adecuado en combinación con un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención, incluyendo, entre otros, los indicados en Carmeliet *et al.*, *Nature* 407:249-257, 2000. En algunas formas de realización, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF, incluyendo, entre otros, un anticuerpo anti-VEGF (p.ej., el Fab anti-VEGF LUCENTIS® (ranibizumab), RTH-258 (anteriormente ESBA-1008, un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla anti-VEGF, Novartis) o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF (p.ej., un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-angiopoyetina 2, tal como faricimab; Roche)), una proteína de fusión de receptor recombinante soluble (p.ej., EYLEA® (aflibercept)), una variante de VEGF, un fragmento soluble de VEGFR, un aptámero capaz de bloquear VEGF (p.ej., pegaptanib) o VEGFR, un anticuerpo anti-VEGFR neutralizador, un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa de VEGFR, un anti-VEGF DARPIn® (p.ej., abicipar pegol, Molecular Partners AG/Allergan), un ARN interferente pequeño que inhibe la expresión de VEGF o VEGFR, un inhibidor de tirosina quinasa de VEGFR (p.ej., 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidín-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidín-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171), vatalanib (PTK787), semaxaminib (SU5416; SUGEN) y SUTENT® (sunitinib)), y combinaciones de estos.

Entre otros agentes antiangiogénicos adecuados que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana tal como se proporcionan en la presente memoria para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG) se incluyen corticoesteroides, esteroides angiostáticos, acetato de anecortave, angiostatina, endostatina, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de metaloproteinasas matriciales (MMP), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP3, por sus siglas en inglés), antagonistas del factor derivado del estroma (SDF-1) (p.ej., anticuerpos anti-SDF-1), factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), gamma-secretasa, ligando 4 similar a Delta, antagonistas de integrina, antagonistas del factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α , antagonistas de la proteína quinasa CK2, agentes que inhiben el direccionamiento de las células madre (p.ej., células progenitoras endoteliales) hacia el sitio de neovascularización (p.ej., un anticuerpo anti-cadherina endotelial vascular (CD-144) y/o un anticuerpo anti-SDF-1), y combinaciones de estos.

En un ejemplo adicional, en algunos casos, un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana y/o una formulación polimérica de estos puede administrarse en combinación con un agente que presenta actividad contra la neovascularización para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG), tal como un fármaco antiinflamatorio, una diana de mamífero del inhibidor de la rapamicina (mTOR) (p.ej., rapamicina, AFINITOR® (everolimus), y TORISEL® (temsirolimus)), ciclosporina, un antagonista del factor de necrosis tumoral (TNF) (p.ej., un anticuerpo anti-TNFα o un fragmento de unión al antígeno de este (p.ej., infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y golimumab) o una proteína de fusión de receptor soluble (p.ej., etanercept)), un agente anticomplemento, un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE), o combinaciones de estos.

En un ejemplo todavía adicional, en algunos casos, un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana puede administrarse en combinación con un agente que es neuroprotector y puede reducir potencialmente la progresión de DMAE seca a DMAE húmeda, tal como la clase de fármacos denominados “neuroesteroides”, que incluyen fármacos tales como la deshidroepiandrosterona (DHEA) (nombres comerciales: PRASTERA™ y FIDELIN®), sulfato de deshidroepiandrosterona y sulfato de pregnenolona.

Puede administrarse cualquier agente terapéutico de DMAE adecuado a modo de agente terapéutico adicional en combinación con un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana tal como se proporcionan en la presente memoria para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG), incluyendo, entre otros, un antagonista de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF (p.ej., LUCENTIS® (ranibizumab), RTH-258 (anteriormente ESBA-1008, un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla anti-VEGF; Novartis), o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF (p.ej., un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-angiopoyetina 2, tal como faricimab; Roche)), una proteína de fusión soluble de receptor de VEGF (p.ej., EYLEA® (aflibercept)), un anti-VEGF DARPIn® (e.g., abicipar pegol; Molecular Partners AG/Allergan), o un aptámero anti-VEGF (p.ej., MACUGEN® (pegaptanib sodio)), un antagonista de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGF, un anticuerpo anti-PDGFR (p.ej., REGN2176-3), un aptámero pegilado anti-PDGF-BB (p.ej., FOVISTA®; Ophthotech/Novartis), una proteína de fusión soluble de receptor PDGFR, o un antagonista dual de PDGF/VEGF (p.ej., un inhibidor de molécula pequeña (p.ej., DE-120 (Santen) o X-82 (TyrogeneX)) o un anticuerpo

biespecífico anti-PDGF/anti-VEGF)); VISUDYNE® (verteporfina) en combinación con terapia fotodinámica, un antioxidante, un antagonista del sistema del complemento, por ejemplo, un antagonista del factor del complemento C5 (p.ej., un inhibidor de molécula pequeña (p.ej., ARC-1905; Ophtotech) o un anticuerpo anti-C5 (p.ej., LFG-316; Novartis), un antagonista de properdina (p.ej., un anticuerpo anti-properdina, p.ej., CLG-561, Alcon), o un antagonista del factor del complemento D (p.ej., un anticuerpo anti-factor del complemento D, p.ej., lampalizumab; Roche)); un péptido de bloqueo C3 (p.ej., APL-2, Appellis), un modificador del ciclo visual (p.ej., hidrocloreto de emixustat), escualamina (p.ej., OHR-102; Ohr Pharmaceutical), complementos de vitaminas y minerales (p.ej., los indicados en el Estudio 1 de enfermedad ocular asociada a la edad (AREDS1, por sus siglas en inglés, cinc y/o antioxidantes) y en el Estudio 2 (AREDS2; cinc, antioxidantes, luteína, zeaxantina y/o ácidos grasos omega 3)), una terapia de base celular, por ejemplo, NT-501 (Renexus); PH-05206388 (Pfizer), trasplante de células huCNS-SC (StemCells), CNTO-2476 (línea de células madre del cordón umbilical, Janssen), OpRegen (suspensión de células del EPR; Cell Cure Neurosciences), o trasplante de células MA09-hRPE (Ocata Therapeutics), un antagonista de factor tisular (p.ej., hI-con1; Iconic Therapeutics), un agonista de receptor alfa-adrenérgico (p.ej., tartrato de brimonidina, Allergan), una vacuna peptídica (p.ej., S-646240; Shionogi), un antagonista de amiloide beta (p.ej., un anticuerpo monoclonal anti-amiloide beta, p.ej., GSK-933776), un antagonista de S1P (p.ej., un anticuerpo anti-S1P, p.ej., iSONEP™; Lpath Inc), un antagonista de ROBO4 (p.ej., un anticuerpo anti-ROBO4, p.ej., DS-7080a; Daiichi Sankyo), un vector lentivírico que expresa endostatina y angiostatina (p.ej., RetinoStat), y cualquier combinación de estos. En algunos casos, los agentes terapéuticos de la DMAE (incluyendo cualquiera de los agentes terapéuticos de la DMAE anteriores) pueden coformularse. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PDGFR REGN2176-3 puede coformularse con aflibercept (EYLEA®). En algunos casos, dicha coformulación puede administrarse en combinación con un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención. En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda).

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con LUCENTIS® (ranibizumab) para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG). En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda). En algunos casos, el trastorno ocular es AG.

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con EYLEA® (aflibercept) para el tratamiento de un trastorno

ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG). En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda). En algunos casos, el trastorno ocular es AG.

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con MACUGEN® (pegaptanib sodio) para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG). En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda). En algunos casos, el trastorno ocular es AG.

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con VISUDYNE® (verteporfina) en combinación con terapia fotodinámica para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG). En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda). En algunos casos, el trastorno ocular es AG.

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con un antagonista de PDGF para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG). Entre los antagonistas de PDGF de ejemplo que pueden utilizarse en combinación con un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención se incluyen un anticuerpo anti-PDGF, un anticuerpo anti-PDGFR, un inhibidor de molécula pequeña (p.ej., escualamina), un aptámero pegilado anti-PDGF-B, tal como FOVISTA® (E10030; Ophthotech/Novartis), o un antagonista dual de PDGF/VEGF (p.ej., un inhibidor de molécula pequeña (p.ej., DE-120 (Santen) o X-82 (TyrogeneX)) o un anticuerpo biespecífico anti-PDGF/anti-VEGF). Por ejemplo, puede administrarse FOVISTA® como terapia complementaria a un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención. Puede administrarse OHR-102 en combinación con antagonistas de VEGF, tales como LUCENTIS® o EYLEA®. En algunas formas de realización, puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con OHR-102, LUCENTIS® y/o EYLEA®. En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda). En algunos casos, el trastorno ocular es AG.

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con RTH-258 para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG). RTH-258 puede administrarse, por ejemplo, mediante inyección intravítrea o infusión ocular. En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda). En algunos casos, el trastorno ocular es AG.

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con abicipar pegol para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG). En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda). En algunos casos, el trastorno ocular es AG.

Puede administrarse cualquier agente terapéutico adecuado de EMD y/o RD en combinación con un anticuerpo que se une a VEGF humano y IL-1beta humana de la invención para el tratamiento de un trastorno ocular (p.ej., DMAE, EMD, RD, OVR o AG), incluyendo, entre otros, un antagonista de VEGF (p.ej., LUCENTIS® o EYLEA®), un corticosteroide (p.ej., un implante de corticosteroide (p.ej., OZURDEX® (implante intravítreo de dexametasona) o ILUVIEN® (implante intravítreo de acetónido de fluocinolona) o un corticoesteroide formulado para su administración mediante inyección intravítrea (p.ej., acetónido de triamcinolona), o combinaciones de estos. En algunos casos, el trastorno ocular es EMD y/o RD.

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con LUCENTIS® (ranibizumab) para el tratamiento de EMD y/o RD (p.ej., RDNP o RDP).

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con EYLEA® (aflibercept) para el tratamiento de EMD y/o RD (p.ej., RDNP o RDP).

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con OZURDEX® (implante intravítreo de dexametasona) para el tratamiento de EMD y/o RD.

Puede administrarse un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención en combinación con ILUVIEN® (implante intravítreo de dexametasona) para el tratamiento de EMD y/o RD.

En algunos casos, el régimen de tratamiento de TAO/PRN o el régimen de tratamiento de TAE puede utilizarse para administrar un agente terapéutico de DMAE (p.ej., ranibizumab o aflibercept) en combinación con un anticuerpo que se une al VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención, y/o una formulación polimérica de este. En algunos casos, el trastorno ocular es DMAE (p.ej., DMAE húmeda). En algunos casos, el trastorno ocular es AG.

Dichas politerapias indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención puede realizarse antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o los agentes terapéuticos adicionales. En una forma de realización, la administración del anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana de la invención y la administración de un agente terapéutico adicional se producen separados por un periodo aproximado de un, dos, tres, cuatro o cinco meses, o separados por aproximadamente una, dos o tres semanas, o separados por aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluye la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La administración puede realizarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como las inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es durante un período breve o crónica. Se encuentran contempladas dentro de la presente memoria diversos programas de dosificación, que incluyen, entre otras, las administraciones individuales o múltiples en diversos puntos temporales, la administración en bolo y la infusión de pulsos.

Los anticuerpos de la invención pueden formularse, dosificarse y administrarse de un modo consistente con la buena práctica médica. Entre los factores por considerar en el presente contexto se incluyen el trastorno particular en tratamiento, el mamífero particular en tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por el profesional médico. El anticuerpo opcionalmente, pero no necesariamente, se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la composición farmacéutica, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores comentados anteriormente. Estos generalmente se utilizan en las mismas dosis y por vías de administración tales como las indicadas en la presente memoria, o entre aproximadamente 1 % y 99 % de las dosis

indicadas en la presente memoria, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que resulte apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (utilizado solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales diferentes) dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis candidata inicial puede ser de entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ y 15 mg/kg (por ejemplo, de entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg) para su administración en el paciente mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante la infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendría hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis del anticuerpo de ejemplo se encontraría comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. De esta manera, pueden administrarse en el paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte, o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis inferiores. Se realiza fácilmente un seguimiento del avance de dicha terapia utilizando técnicas y ensayos convencionales.

E. Artículos fabricados

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo fabricado que contiene materiales que resultan útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos indicados anteriormente. El artículo fabricado comprende un envase y una etiqueta o un prospecto de envase o asociado a este. Entre los envases adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases

pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que resulta, por sí misma o en combinación contra composición, efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición y que puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el prospecto de envase indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición de elección. Además, el artículo fabricado puede comprender: (a) un primer envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende un complejo de la invención, y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende un agente adicional citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo fabricado en el presente aspecto de la invención puede comprender además un prospecto de envase que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una condición particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

3. Formas de realización específicas de la invención

En las formas de realización específicas siguientes de la invención se lista:

1. Un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un parátipo para VEGF y un parátipo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) y un dominio variable de la cadena pesada (dominio VH), en el que el parátipo para VEGF comprende los residuos de aminoácido de CDR-H2, CDR-L1 y CDR-L3 del anticuerpo, en el que el parátipo IL-1beta comprende los residuos de aminoácido de CDR-H1, CDR-H3 y CDR-L2 del anticuerpo.
2. Un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un parátipo para VEGF y un parátipo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) y un dominio variable de la cadena pesada (dominio VH), en el que la pareja de un dominio

variable de la cadena ligera y un dominio variable de la cadena pesada se une simultáneamente a VEGF humano y a IL-1beta humana.

3. Un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un parátipo para VEGF y un parátipo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) y un dominio variable de la cadena pesada (dominio VH), en el que ninguno de los aminoácidos comprendidos en el parátipo para VEGF están comprendidos en el parátipo para IL-1beta.

4. Un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un parátipo para VEGF y un parátipo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) y un dominio variable de la cadena pesada (dominio VH), en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo en VEGF humano y al mismo epítipo en IL-1beta humana que un anticuerpo con un dominio variable de la cadena pesada de SEC ID nº 11 y un dominio variable de la cadena ligera de SEC ID nº 12.

5. Un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende un parátipo para VEGF y un parátipo para IL-1beta dentro de una pareja afín de un dominio variable de la cadena ligera (dominio VL) y un dominio variable de la cadena pesada (dominio VH), en el que

- el parátipo para VEGF comprende residuos de aminoácido de CDR-H2, CDR-L1 y CDR-L3 del anticuerpo, en el que el parátipo para IL-1beta comprende residuos de aminoácido de CDR-H1, CDR-H3 y CDR-L2 del anticuerpo, y/o
- la pareja de un dominio variable de la cadena ligera y un dominio variable de la cadena pesada se une simultáneamente a VEGF humano e IL-1beta humana, y/o
- ninguno de los aminoácidos comprendidos en el parátipo para VEGF está comprendido en el parátipo para IL-1beta, y/o
- el anticuerpo se une al mismo epítipo en VEGF humano y al mismo epítipo en IL-1beta humana que un anticuerpo con un dominio variable de la cadena pesada de SEC ID nº 11 y un dominio variable de la cadena

ligera de SEC ID nº 12, y/o

- un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o
- un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C, y/o
- un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C según se mide mediante dispersión de luz dinámica, y/o
- la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a VEGF humano inhibe la unión de VEGF a VEGFR2 con una IC_{50} inferior a 50 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC_{50} inferior a 30 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

6. El anticuerpo de una de las formas de realización anteriores, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8.

7. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC

ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8.

8. El anticuerpo de una de las formas de realización anteriores, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

9. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

10. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que

comprende un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

11. El anticuerpo de la forma de realización 10, que comprende:

- un parátipo para VEGF que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 y R83, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, E67, D68, Q69, R92, Y93, H94 e Y96, y
- un parátipo para IL-1beta que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 y D101, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57 e Y91.

12. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende dentro de una pareja de dominio VL y dominio VH: (i) un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y (ii) un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

13. El anticuerpo de la forma de realización 12, que comprende:

- un parátipo para VEGF que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66 y R83, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL: I2, Y27, W27a, S27c, S27d, E67, D68, Q69, R92, Y93, H94 e Y96, y
- un parátipo para IL-1beta que comprende los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VH: E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, K94, D95, V96, F98 y D101, y los residuos de aminoácido siguientes en el dominio VL:

L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57 e Y91.

14. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11, y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

15. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11, en la que el dominio VH comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en la que el dominio VL comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en la que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

16. Un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

17. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta

humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11, en la que el dominio VH comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, R66, R83 y K94, y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en la que el dominio VL comprende los residuos de aminoácido I2, Y49, G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

18. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la

secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12.

19. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos.

20. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende: (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, en la que las sustituciones de aminoácidos están localizadas en las posiciones 3 a 25, 36 a 49, 97 a 82c, 84 a 93 o 103 a 113 de SEC ID nº 11, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, en la que las sustituciones de aminoácidos están localizadas en las posiciones 1, 4, 6, 8 a 23, 35 a 48, 58 a 66, 70 a 88 o 98 a 107 de SEC ID nº 12, en la que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat.

21. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos.

22. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la

cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, y que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos, y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12 con hasta 15 sustituciones de aminoácidos.

23. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una secuencia de VH de SEC ID nº 11 y una secuencia de VL de SEC ID nº 12.

24. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende una secuencia de VH de SEC ID nº 11 y una secuencia de VL de SEC ID nº 12.

25. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID nº 20 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID nº 19.

26. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID nº 20 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID nº 19.

27. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID nº 18 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID nº 19.

28. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta

humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEC ID nº 18 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEC ID nº 19.

29. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

30. Un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

31. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

32. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

33. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende dentro de una pareja de dominio VL y dominio VH: (i) un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y (ii) un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

34. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende

una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo se une (i) a VEGF121 humano con una K_D inferior a 10 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y (ii) a IL-1beta humana con una K_D inferior a 30 pM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

35. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C.

36. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C.

37. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C.

38. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera

humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C.

39. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende dentro de una pareja de dominio VL y dominio VH: (i) un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y (ii) un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C.

40. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de inicio de agregación superior a 70 °C.

41. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de

fusión superior a 80 °C según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

42. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

43. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C, según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

44. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C, según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

45. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta

humana, que comprende dentro de una pareja de dominio VL y dominio VH: (i) un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y (ii) un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C, según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

46. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un (dominio VL) que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, en el que un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo muestra una temperatura de fusión superior a 80 °C, según se mide mediante dispersión de luz dinámica.

47. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a VEGF humano inhibe la unión de VEGF a VEGFR2 con una IC₅₀ inferior a 50 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC₅₀ inferior a 30 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

48. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a

VEGF humano inhibe la unión de VEGF a VEGFR2 con una IC_{50} inferior a 50 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC_{50} inferior a 30 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

49. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC_{50} inferior a 30 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

50. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14, (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, (d) un marco de la cadena pesada humana con (i) FR1 que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28 y K30, (ii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido R66, R83 y K94, y un dominio VL que comprende (e) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (f) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17, (g) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, y (h) un marco de la cadena ligera humana con (i) FR1 que comprende el residuo de aminoácido I2, (ii) FR2 que comprende el residuo de aminoácido Y49, (iii) FR3 que comprende los residuos de aminoácido G57, E67, D68 y Q69, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC_{50} inferior a 30 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

51. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende dentro de una pareja de dominio VL y dominio VH: (i) un dominio VH que comprende los residuos de aminoácido E2, G26, V28, K30, W31, N35b, D35c, K52a, D55, H56, Y58, T61, K62, F63, I64, R66, R83, K94, D95, V96, F98 y D101, y (ii) un dominio VL que comprende los residuos de aminoácido I2, Y27, W27a, S27c, S27d, L32, Y49, D50, Y53, K54, L56, G57, E67, D68, Q69, Y91, R92, Y93, H94 e Y96, en el que la numeración de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC_{50} inferior a 30 nM según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

52. Un anticuerpo que se une específicamente a VEGF humano y a IL-1beta humana, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende: (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 y (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15, y un dominio VL que comprende (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 16, (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 17 y (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, y en el que la unión de un fragmento Fab de anticuerpo del anticuerpo a IL-1beta humana inhibe la unión de IL-1beta a IL-1betaR1 con una IC_{50} inferior a 30 nM, según se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

53. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que es un anticuerpo monoclonal.

54. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, que es un fragmento de anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana.

55. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el anticuerpo es biespecífico.

56. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el anticuerpo es un fragmento Fab.
57. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
58. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.
59. Un ácido nucleico aislado codificante del anticuerpo según cualquiera de las formas de realización 1 a 58.
60. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la forma de realización 59.
61. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la forma de realización 61.
62. Un método para producir un anticuerpo que se une a VEGF humano y a IL-1beta humana, que comprende cultivar la célula huésped de la forma de realización 60 de manera que se produzca el anticuerpo.
63. El método según la forma de realización 62, que comprende además recuperar el anticuerpo a partir de la célula huésped.
64. Un anticuerpo producido mediante el método de las formas de realización 62 o 63.
65. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 1 a 58 y un portador farmacéuticamente aceptable.
66. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 1 a 58 para su utilización como medicamento.
67. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 1 a 58 para su utilización en el tratamiento de una enfermedad vascular.
68. El anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 1 a 58 para su utilización en el tratamiento de una enfermedad vascular ocular.

69. Utilización del anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 1 a 58 o la composición farmacéutica de la forma de realización 65 para la preparación de un medicamento.

70. Utilización del anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 1 a 58 o la composición farmacéutica de la forma de realización 65 en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis.

71. Un método de tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad vascular, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de una de las formas de realización 1 a 58 o la composición farmacéutica de la forma de realización 65.

72. Un método de tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad vascular ocular, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de una de las formas de realización 1 a 58 o la composición farmacéutica de la forma de realización 65.

73. Un método de inhibición de la angiogénesis en un individuo, que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de cualquiera de las formas de realización 1 a 58 o la composición farmacéutica de la forma de realización 65 para inhibir la angiogénesis.

Descripción de las secuencias de aminoácidos

SEC ID nº 1	Dominio VH de 1HVL2.3 EQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGMVFSWNAMSWVRQAPG KGLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDIGFFDVWGQGTLVTVSS
SEC ID nº 2	Dominio VL de 1HVL2.3 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSNYLAWYQQKPGKA PKLLIYDASYRIIGVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYC QQYRYHPYTFGHGKVEIKR
SEC ID nº 3	H-CDR1 de 1HVL2.3 WNAMS
SEC ID nº 4	H-CDR2 de 1HVL2.3 SISPKGDHKYLNTKFIG
SEC ID nº 5	H-CDR3 de 1HVL2.3 DIGFFDV
SEC ID nº 6	L-CDR1 de 1HVL2.3 HGSYWLSNYLA
SEC ID nº 7	L-CDR2 de 1HVL2.3 DASYRII
SEC ID nº 8	L-CDR3 de 1HVL2.3, 1HVL12.85, 1HVL5.15 y RO7200394 QQYRYHPYT

SEC ID nº 9	Cadena pesada de fragmento Fab de 1HVL2.3 EQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGMVFSWNAMSWVRQAPG KGLEWVGSISPKGDHKYLNTKFIGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKDIGFFDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSV VTPSSSLG TKTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHT
SEC ID nº 10	Cadena ligera de fragmento Fab de 1HVL2.3 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSNYLAWYQQKPGKA PKLLIYDASYRIIGVPSRFSGSGSHEDYLT ISSLQPEDFATYYC QQYRYHPYTFGHG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEC ID nº 11	Dominio VH de 1HVL12.85 y RO7200394 DEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAEGMVFKWNDMSWVRQAP GKGLEWVGSISKKG DHKYLNTKFIGRFTISRDN EKD TLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDVGF DIWGQGT LVT VSS
SEC ID nº 12	Dominio VL de 1HVL12.85 y RO7200394 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSSLVAWYQQKPGKA PKLLIYDAKYKHLGVPSRFSGSKEDQEFTLT ISSLQPEDFATYYC QQYRYHPYTFGHG TKVEIK
SEC ID nº 13	H-CDR1 de 1HVL12.85, 1HVL5.15 y RO7200394 WNDMS
SEC ID nº 14	H-CDR2 de 1HVL12.85, 1HVL5.15 y RO7200394 SISKKG DHKYLNTKFIG

SEC ID nº 15	H-CDR3 de 1HVL12.85, 1HVL5.15 y RO7200394 DVGFFDI
SEC ID nº 16	L-CDR1 de 1HVL12.85 y RO7200394 HGSYWLSSLVA
SEC ID nº 17	L-CDR2 de 1HVL12.85, 1HVL5.15 y RO7200394 DAKYKHL
SEC ID nº 18	Cadena pesada de fragmento Fab de 1HVL12.85 DEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAEGMVFKWNDMSWVRQAP GKGLEWVGSISKGDHKYLN TKFIGRFTISRDN EKD TLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDVGFFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTV PSSSLG TKTYICNVNHKPSNTKV DKKVE PKSCDKTHT
SEC ID nº 19	Cadena ligera de 1HVL12.85 y fragmento Fab de RO7200394 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSSLVAWYQQKPGKA PKLLIYDAKYKHLGVPSRFSGSKEDQEFTLTISSLQPEDFATYYC QQYRYHPYTFGHG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEC ID nº 20	Cadena pesada de fragmento Fab de RO7200394 (SEC ID nº 19 con mutación K196Q) DEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAEGMVFKWNDMSWVRQAP GKGLEWVGSISKGDHKYLN TKFIGRFTISRDN EKD TLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDVGFFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTV PSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKV DKKVE PKSCDKTHT

SEC ID nº 21	Dominio VH de 1HVL5.15 DETLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAEGMVFKNWDMMSWVRQAP GKGLEWVGSISKKGDKHKLNTKFIGRFTISRDNEDTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDVGGFDIWGQGTLVTVSS
SEC ID nº 22	Dominio VL de 1HVL5.15 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSSLMAWYQQKPGKA PKLLIYDAKYKHLGVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYC QQYRYHPYTFGHGKVEIK
SEC ID nº 23	L-CDR1 de 1HVL5.15 HGSYWLSSLMA
SEC ID nº 24	Cadena pesada de fragmento Fab de 1HVL5.15 DETLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAEGMVFKNWDMMSWVRQAP GKGLEWVGSISKKGDKHKLNTKFIGRFTISRDNEDTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDVGGFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHT
SEC ID nº 25	Cadena ligera de fragmento Fab de 1HVL5.15 AIYMHQEPSSLSASVGDRVTITCHGSYWLSSLMAWYQQKPGKA PKLLIYDAKYKHLGVPSRFSGSGSHEDYTLTISSLQPEDFATYYC QQYRYHPYTFGHGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID nº 26	VEGF humano MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVK FMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRGGC CNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCE CRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGAR CCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSR CKARQLELNERTCRCDKPRR
SEC ID nº 27	IL1beta humana MAEVPELASEMMAYYSGNEDDLFFEADGPKQMKCSFQDL DLC PLDGGIQLRISDHHYSKGFRQAASVVVAMDKLRKMLVPCPQTF QENDLSTFFPFIFEEPIFFDTWDNE

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplo 1:

Generación de fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta

Se generó un fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta mediante cribado independiente de anticuerpos monoespecíficos que se unen a VEGF y a IL-1beta con parátomos no solapantes y posterior fusión de la secuencia de aminoácidos en una pareja de VH/VL biparatópica que se une a VEGF y a IL-1beta, mediante un método descrito anteriormente, p.ej., en el documento nº WO2012/163520.

Se utilizaron dos colecciones de expresión fágica distintas de fragmentos Fab sintéticos, en las que, en la primera colección de expresión fágica, se diversificaron residuos dentro de las regiones CDR-H1, CDR-H3 y CDR-L2 de los fragmentos Fab, y en la que, en la segunda colección de expresión fágica, se diversificaron residuos dentro de las regiones CDR-L1, CDR-L3 y CDR-H2 de los fragmentos Fab. En cada colección, se mantuvieron

sin diversificar las otras tres regiones CDR a modo de secuencia simulada invariante. En ambas colecciones, el dominio CH1 de los fragmentos Fab se fusionó mediante un conector con una proteína de gen III truncado para facilitar la expresión fágica.

La primera colección se enriqueció para ligantes contra IL-1beta humana y la segunda colección se enriqueció para ligantes contra VEGF-A humano, mediante un procedimiento de purificación denominado *panning* de las colecciones fágicas. Tras el procedimiento de purificación por *panning*, se generaron minipreparaciones de plásmidos para ambos grupos enriquecidos de vectores fagémidos. Las minipreparaciones se digirieron con un enzima de restricción a fin de extraer la región codificante de la proteína de gen III truncado y se recircularizaron mediante ligación para obtener grupos de vectores de expresión codificantes de fragmentos Fab solubles que estaban enriquecidos en ligantes de IL-1beta o en ligantes de VEGF-A, respectivamente. Estos grupos de vectores se transformaron en células de *E. coli* TG1 y se recolectaron las colonias individuales y se cultivaron para la expresión soluble de clones de Fab individuales en placas de microtitulación. Los sobrenadantes que comprendían fragmentos Fab solubles se cribaron para la unión a IL-1beta o VEGF-A utilizando métodos de ELISA estándares y los clones TG1 productores de ligantes específicos se sometieron a preparación de plásmidos de ADN y secuenciación a fin de obtener parejas de secuencias de VH y VL de unión específica a IL-1beta o a VEGF-A, respectivamente.

Se diseñó *in silico* una pareja de secuencias de VH y VL biespecíficas anti-VEGF/anti-IL-1beta mediante (1) sustitución de los residuos de VH irrelevantes 52b a 65 en la secuencia de VH de un Fab específico de IL-1beta por los residuos de VH seleccionados 52b a 65 de un Fab específico de VEGF-A, sustituyendo de esta manera los residuos de CDR-H2 potencialmente parte del parátipo específico de VEGF-A en la cadena pesada del ligante de IL-1beta, y (2) sustitución de los residuos de VL irrelevantes 49 a 57 en la secuencia de VL de un Fab específico de VEGF-A por los residuos de VL seleccionados 49 a 57 de un Fab específico de IL-1beta, sustituyendo de esta manera los residuos de CDR-L2 potencialmente parte del parátipo específico de IL-1beta en la cadena ligera del ligante de VEGF-A.

Ejemplo 2:

Expresión del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL2.3

La pareja diseñada resultante de secuencias de VH y VL biespecíficas anti-VEGF/anti-IL-

1beta se sintetizó y clonó en un vector de expresión *E. coli* en marco con las secuencias génicas codificantes de los dominios CH1 y Ckappa. El vector se transformó en células de *E. coli* TG1 y se cultivó una colonia individual para la expresión soluble del fragmento Fab del anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico se purificó a partir del sobrenadante del cultivo de TG1 mediante cromatografía de afinidad y se verificó la unión específica tanto a IL-1beta como a VEGF-A.

Se seleccionó el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta "1HVL2.3" y se caracterizó como una cadena pesada de SEC ID nº 9 y una cadena ligera de SEC ID nº 10.

Para análisis adicionales, se transformaron los anticuerpos anti-VEGF/anti-IL-1beta de la invención y se expresaron a partir de células HEK293 mediante métodos recombinantes estándares.

Ejemplo 3:

Caracterización del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL2.3

Se evaluó la afinidad de unión, hidrofiliicidad y estabilidad térmica del anticuerpo biespecífico 1HVL2.3 de la manera siguiente:

Cinética de la unión de VEGF evaluada mediante resonancia de plasmón superficial (SPR):

Se inmovilizó un anticuerpo de captura anti-His (GE Healthcare 28995056) en un chip sensor C1 de serie S (GE Healthcare 29104990) utilizando química estándar de acoplamiento de aminas, lo que da como resultado una densidad superficial de aproximadamente 500 unidades de resonancia (UR). Como amortiguador de migración y dilución, se utilizó HBS-P+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, tensioactivo P20 al 0,05 %). Se capturó VEGF121-His humano en la superficie con densidades de ligando resultantes de aproximadamente 10 y 20 UR, respectivamente. Se inyectó sucesivamente una serie de dilución del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta (1,2-100 nM, dilución 1:3) durante 90 s cada vez; se monitorizó la disociación durante 3600 s a un caudal de 30 µl/min (cinética de un solo ciclo). Se regeneró la superficie mediante la inyección de glicina 10 mM, pH 1,5, durante 60 s. Las diferencias de índice de refracción volumétrico se corrigieron restando las inyecciones en blanco y restando la respuesta obtenida de la celda de flujo de control sin VEGF121 humano capturado. El ajuste de la

curva se llevó a cabo utilizando el modelo de unión 1:1 de Langmuir con el *software* de evaluación Biacore. Para proporcionar un ajuste más robusto, se seleccionó la opción de $R_{\max}$ múltiple para el ajuste global utilizando las densidades de ambos ligandos.

Cinética de la unión de IL-1b evaluada mediante resonancia de plasmón superficial (SPR):

Se inmovilizó un anticuerpo de captura anti-Fab (GE Healthcare 28958325) en un chip sensor C1 de serie S (GE Healthcare 29104990) utilizando química estándar de acoplamiento de aminas, lo que da como resultado una densidad superficial de aproximadamente 500 unidades de resonancia (UR). El fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta se capturó en la superficie, con niveles de captura resultantes de aproximadamente 20 UR. Una serie de dilución entre 0,74 y 60 nM (dilución 1:3) de IL-1beta humana (PreproTech 200-01B) o IL-1beta de macaco cangrejero (Sino Biological 90010-CNAE) se inyectó durante 90 s; se monitorizó la disociación durante como mínimo 600 s a un caudal de 30 μ l/min. Se regeneró la superficie mediante dos inyecciones consecutivas de glicina 10 mM, pH 2,1, durante 60 s cada vez. Las diferencias de índice de refracción volumétrico se corrigieron restando las inyecciones en blanco y restando la respuesta obtenida de la celda de flujo de control sin el fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta capturado. El ajuste de la curva se llevó a cabo utilizando el modelo de unión 1:1 de Langmuir con el *software* de evaluación Biacore.

Cromatografía de integración hidrófoba (HIC):

Se determinó la hidrofobicidad aparente mediante la inyección de 20 μ g del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta en una columna HIC-Ether-5PW (Tosoh) equilibrada con fosfato de Na 25 mM, sulfato amónico 1,5 M, pH 7,0. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 0 % a 100 % de amortiguador B (fosfato de Na 25 mM, pH 7,0) en 60 minutos. Se compararon los tiempos de retención con estándares de proteínas de hidrofobicidad conocida.

Estabilidad térmica:

Se prepararon muestras del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta a una concentración de 1 mg/ml en histidina/cloruro de histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, y se transfirieron a una placa óptica de 384 pocillos mediante centrifugación a través de una placa de filtración de 0,4 μ m y se recubrieron con aceite de parafina. Se midió el

radio hidrodinámico repetidamente mediante dispersión de luz dinámica en un lector de placas DynaPro (Wyatt) mientras se calentaban las muestras a una velocidad de 0,05 °C/min de 25 °C a 80 °C. Alternativamente, las muestras se transfirieron a una matriz de microcubetas de 10 µl y se registraron datos de dispersión de luz estática además de datos de fluorescencia tras la excitación con un láser de 266 nm, utilizando un instrumento Optim1000 (Avacta Inc.), mientras se calentaban a una velocidad de 0,1 °C/min. de 25 °C a 90 °C.

La temperatura de inicio de agregación se define como la temperatura a la que empieza a incrementarse el radio hidrodinámico (dispersión dinámica de luz, DDL) o la intensidad de la luz dispersada (Optim100). La temperatura de fusión se define como el punto de inflexión en el gráfico de intensidad de fluorescencia frente a longitud de onda.

Se muestran los resultados en las **tablas 1 y 2**.

Tabla 1: cinética de unión de VEGF e IL-1beta de 1HVL2.3 evaluada mediante SPR

IL-1beta humana				VEGF 121 humano			
ka [1/Ms]	kd [1/s]	t _{1/2} [min]	K _D [pM]	ka [1/Ms]	kd [1/s]	t _{1/2} [min]	K _D [pM]
5,61E+06	2,56E-02	0,5	4565	1,75E+06	1,45E-05	796	8

Tabla 2: estabilidad térmica e hidrofobicidad de 1HVL2.3

T _{ag} (°C)	T _m (°C) DLS	HIC (tiempo de retención relativo)
75 (+/-1)	87 (+/-1)	0,58

Ejemplo 4:

Mejora del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL2.3

Tal como se ha ilustrado anteriormente, el fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL2.3, aunque es altamente estable, muestra una afinidad para IL-1beta en el

intervalo nanomolar, así como una hidrofobicidad significativa. Para el tratamiento de enfermedades vasculares oculares, que requieren la inyección del terapéutico en el ojo, resulta deseable proporcionar el terapéutico con una elevada afinidad para el antígeno diana y a concentraciones muy elevadas a fin de incrementar la durabilidad del efecto terapéutico y minimizar las incomodidades para el paciente. Para el propósito deseado, por lo tanto, se desea incrementar la afinidad y reducir la hidrofobicidad del anticuerpo para garantizar la solubilidad en amortiguador isotónico a concentraciones elevadas.

En consecuencia, para la aplicación clínica, el anticuerpo requirió una mejora adicional, p.ej., con respecto a la unión de IL-1beta (particularmente mediante la mejora de la tasa de disociación) y la reducción de la hidrofobicidad. Se llevaron a cabo varias rondas de maduraciones mediante la introducción de diferentes sustituciones de aminoácidos en los dominios VH y VL. Durante las maduraciones, se cribaron los anticuerpos candidatos derivados del anticuerpo 1HVL2.3 y se seleccionaron basándose en sus propiedades deseadas con respecto a rendimiento, afinidad, unión simultánea a antígenos, hidrofiliidad, estabilidad, viscosidad y otros parámetros.

Los anticuerpos candidatos mejorados 1HVL5.15, 1HVL12.85 y RO7200394 se seleccionaron de entre una pluralidad de moléculas de anticuerpo candidato sometidas a ensayo. Las secuencias de aminoácidos de dichos fragmentos Fab biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta se identifican en la **tabla 3**.

Tabla 3: secuencias de aminoácidos de fragmentos Fab biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL2.3, 1HVL5.15, 1HVL12.85 y RO7200394 (los números se refieren a las SEC ID n° tal como se utilizan en la presente memoria).

	VH	VL	cadena pesada	cadena ligera
1HVL2.3	1	2	9	10
1HVL5.15	21	22	24	25
1HVL12.85	11	12	18	19
RO7200394	11	12	20	19

Las **figuras 2 y 3** ilustran una alineación de dominios variables de la cadena pesada y

dominios variables de la cadena ligera de los fragmentos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta generados. La numeración de las posiciones de aminoácidos dentro de los dominios VH y VL es según el sistema de numeración de Kabat. En aras de la simplicidad, la numeración se incluye en la figura, ilustrando adicionalmente las posiciones de los aminoácidos de marco y de CDR.

Ejemplo 5:

Cinética de unión al antígeno de fragmentos Fab biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta mejorados

Se evaluó la cinética de unión a VEGF y a IL-1beta de los anticuerpos candidatos tal como se indica en el ejemplo 3, utilizando los fragmentos Fab biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta indicados (secuencia de aminoácidos ilustrada en la **tabla 3**). A título de comparación, se ilustra la cinética de unión al antígeno del anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 0032 del arte previo, un anticuerpo IgG de longitud completa, tal como se da a conocer en el documento n° WO2016/075034.

Los resultados de la cinética de unión de IL-1beta se muestran en las **tablas 4 y 5**.

Tabla 4: cinética de unión de IL-1beta humana de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta según evaluación mediante SPR (datos del anticuerpo 0032 del arte previo procedentes del documento n° WO2016/075034)

Anticuerpo		IL-1beta humana			
		ka [1/Ms]	kd [1/s]	t _{1/2} [min]	K _D [pM]
0032	IgG	2,49E+06	3,05E-04	38	120
1HVL2.3	Fab	5,61E+06	2,56E-02	0,5	4565
1HVL5.15	Fab	1,66E+06	1,07E-04	109 ± 13*	59 ± 8*
1HVL12.85	Fab	4,76E+06	1,35E-04	86	28
RO7200394	Fab	4,73E+06	1,02E-04	114	21

*n=4

Tabla 5: cinética de unión de IL-1beta de macaco cangrejero a anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta según evaluación mediante SPR

		IL-1beta de macaco cangrejero			
anticuerpo		ka [1/Ms]	kd [1/s]	t _{1/2} [min]	K _D [pM]
1HVL2.3	Fab	3,14E+06	1,82E-02	0,6	5794
1HVL5.15	Fab	2,60E+06	1,18E-04	98	45
1HVL12.85	Fab	3,34E+06	6,54E-05	177	20
RO7200394	Fab	2,97E+06	7,94E-05	146	27

Se evaluó la cinética de unión a IL-1beta de otras especies y proteínas relacionadas para los anticuerpos 1HVL5.15 y 1HVL12.85 mediante SPR utilizando el mismo diseño experimental que el descrito en el ejemplo 3. No se observó unión a IL-1beta de rata, IL-1beta de cerdo, IL-1alfa humana e IL-1RA humana. Se observó unión débil a IL-1beta murina y de conejo.

Los resultados de la cinética de unión de VEGF se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 6: cinética de unión de VEGF121 humano de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta según evaluación mediante SPR (datos del anticuerpo 0032 del arte previo procedentes del documento nº WO2016/075034)

		VEGF121 humano			
anticuerpo		ka [1/Ms]	kd [1/s]	t _{1/2} [min]	K _D [pM]
0032	IgG	2,77E+04	<1E-06		<100
1HVL2.3	Fab	1,75E+06	1,45E-05	796	8

1HVL5.15	Fab	1,53E+06	1,47E-05	789	10
1HVL12.85	Fab	2,50E+06	1,51E-05	764	6
RO7200394	Fab	2,85E+06	1,63E-05	707	6

La unión simultánea de antígenos de los anticuerpos candidatos a VEGF y a IL-1beta se evaluó de la manera siguiente:

Se inmovilizó un anticuerpo de captura anti-His (GE Healthcare 28995056) en un chip sensor C1 de serie S (GE Healthcare 29104990) utilizando química estándar de acoplamiento de aminas, lo que da como resultado una densidad superficial de aproximadamente 500 unidades de resonancia (UR). Como amortiguador de migración y dilución, se utilizó HBS-P+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, tensioactivo P20 al 0,05 %). Se capturó VEGF121-His humano en la superficie seguido de inyecciones consecutivas de los anticuerpos candidatos e IL-1beta. Se regeneró la superficie mediante la inyección de glicina 10 mM, pH 1,5, durante 60 s. Las diferencias de índice de refracción volumétrico se corrigieron restando las inyecciones en blanco y restando la respuesta obtenida de la celda de flujo de control sin VEGF121 humano capturado.

Se confirmó la unión simultánea de los anticuerpos candidatos a VEGF e IL-1beta para todos los fragmentos Fab biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta mejorados, es decir, 1HVL5.15, 1HVL12.85 y RO7200394. La **figura 4** ilustra la unión simultánea del anticuerpo 1HVL12.85 anti-VEGF/anti-IL-1beta. La **figura 5** ilustra la unión simultánea del anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta RO7200394.

También se evaluó la unión simultánea de antígenos del anticuerpo IgG de longitud completa 0032 del arte previo (documento nº WO2016/070534) utilizando el mismo diseño experimental. Se muestran los resultados en la **figura 6**.

Ejemplo 6:**Inhibición de la unión de VEGF e IL-1beta a los receptores respectivos*****Ensayo de inhibición de receptores***

La inhibición de la unión de VEGF e IL-1beta a sus receptores respectivos, VEGFR2_h e IL-1betaR1, en presencia del anticuerpo candidato RO7200394 (fragmento Fab) se evaluó tal como se indica a continuación. A título de comparación, también se evaluó la cinética del anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 0032 del arte previo (IgG de longitud completa), tal como se da a conocer en el documento n° WO2016/075034.

Se inmovilizó VEGFR2_h (R&D Systems 357-KD) e IL-1bR1 (Sino Biological Inc. 10126-H02H) sobre diferentes celdas de flujo en un chip sensor CM5 de serie S (GE Healthcare 29104988) utilizando química estándar de acoplamiento de aminas, lo que da como resultado densidades superficiales de aproximadamente 8000 y 20.000 unidades de resonancia (UR), respectivamente. Como amortiguador de migración y dilución, se utilizó HBS-P+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, tensioactivo P20 al 0,05 %).

Para evaluar la inhibición de la unión de receptor de VEGF, se preincubó una concentración final de 200 nM de RO7200394 o de 400 nM de anticuerpo 0032 con 50 nM de VEGF121. Para evaluar la inhibición de la unión de receptor de IL-1beta, se preincubó una concentración final de 200 nM de RO7200394 o de 200 nM de anticuerpo 0032 con 50 nM de IL-1beta. Las muestras se diluyeron (1:2) en la solución correspondiente 50 nM de VEGF121 o IL-1beta.

Las muestras de anticuerpo/ligando se inyectaron en la superficie de VEGFR2 o IL-1R1 durante 60 s a un caudal de 5 µl/min. Tras una etapa de disociación de 60 s, se regeneró la superficie de VEGFR2 mediante la inyección de NaOH 5 mM durante 60 s, mientras que la superficie de IL-1R1 se regeneró mediante la inyección de glicina 10 mM, pH 3,0, seguido de NaOH 5 mM durante 60 s cada vez. Las diferencias de índice de refracción volumétrico se corrigieron restando las inyecciones en blanco y restando la respuesta obtenida de la celda de flujo de control en blanco. Para la evaluación, se obtuvo la respuesta de unión 5 segundos después del final de la inyección. La respuesta derivada en UR se transformó en una respuesta de unión respecto a la señal inicial correspondiente al ligando o los ligandos sin anticuerpo. Se calcularon los valores de IC₅₀ utilizando un modelo logístico de 4 parámetros (XLfit, ID Business Solutions Ltd.).

Se muestran los resultados en la **tabla 7** y en la **tabla 8**, y en la **figura 7A** (inhibición de VEGFR2 en presencia del anticuerpo RO7200394), la **figura 7B** (inhibición de VEGFR2 en presencia de anticuerpo 0032), la **figura 8A** (inhibición de IL-1R1 en presencia del anticuerpo RO7200394) y la **figura 8B** (inhibición de IL-1R1 en presencia del anticuerpo 0032).

Tabla 7: inhibición de la unión de VEGFR2 de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta sin (- IL-1beta) o en presencia de IL-1beta (+ IL-1beta)

anticuerpo		IC ₅₀	IC ₅₀
		(-IL-1beta)	(+IL-1beta)
0032	IgG	67 nM	62 nM
RO7200394	Fab	44 nM	39 nM

Tabla 8: inhibición de la unión de IL-1betaR1 de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta sin (- VEGF) o en presencia de VEGF (+ VEGF)

anticuerpo		IC ₅₀	IC ₅₀
		(-VEGF)	(+VEGF)
0032	IgG	34 nM	34 nM
RO7200394	Fab	22 nM	24 nM

Se demuestra que la unión de IL-1beta al fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta de la invención no interfiere con la inhibición de la interacción VEGF/VEGFR2. Además, la unión de VEGF al fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta de la invención no interfiere con la inhibición de la interacción IL-1beta/IL-1betaR1.

ELISA de competición de VEGF

Se utilizaron los amortiguadores siguientes: PBS (1x PBS, pH 7,4), PBST (1x PBS complementado con Tween-20 al 0,1 % v/v); PBST BSA al 1 % (PBST complementado

con BSA al 1 % (solución de albúmina sérica bovina al 30 % de Sigma-Aldrich, A0336)); NaHCO_3 (solución de NaHCO_3 , pH 9,4, preparada por BupH Buffer Packs (ThermoScientific, 28382)); MPBST al 2 % (PBST complementado con leche desnatada en polvo al 2 % (p/v) (Carl Roth, T145.3)).

Se recubrieron placas de 96 pocillos (Maxisorp Nunc-Immoplates) con 50 μl /pocillo de VEGFR-1_{rh}-Fc (R&D n° 321-FL-050) a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ en NaHCO_3 200 mM, pH 9,4 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Simultáneamente, se preincubaron fragmentos Fab de anticuerpo de diferentes concentraciones con VEGF procedentes de una premezcla de Fab de anticuerpo-VEGF, de la manera siguiente: se preparó una serie de dilución de fragmento Fab de anticuerpo mediante la adición de 280 μl de una solución de fragmentos Fab de anticuerpo (409,6 nM de anticuerpo en PBST-BSA al 1 %) en los pocillos de la primera columna de una placa PS de 96 pocillos de fondo redondo. Los pocillos individuales de las columnas 2-12 de la misma placa se llenaron con 140 μl de PBST-BSA al 1 %. A continuación, se llevaron a cabo diluciones 1:2 mediante la transferencia de 140 μl de la solución de anticuerpo a la columna siguiente, mezclando a fondo y procediendo con la transferencia de 140 μl de dicha solución diluida de anticuerpo a la columna siguiente. Se repitió dicha operación hasta llegar a la columna 11. Se descartó el exceso de 140 μl de manera que todos los pocillos comprendiesen 140 μl . La columna 12 sirvió de control (blanco). Para la preincubación con VEGF, se prellenaron placas PS de 96 pocillos de fondo redondo con 50 μl /pocillo de VEGF121 2 nM (Humanzyme, HZ-1206, lote n° 0614-01) o una solución 2 nM de VEGF165 (Humanzyme, HZ-1153, lote n° 0716-01) en PBST-BSA al 1 %. Se añadieron 50 μl de la serie de dilución del fragmento Fab de anticuerpo respectivo a VEGF121 o VEGF165, respectivamente; se mezcló a fondo y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

Las placas recubiertas con VEGFR-1_{rh}--Fc se lavaron dos veces con PBST y se bloquearon durante 45 min con 200 μl de MPBST al 2 %. Tras lavar dos veces la solución de MPBST utilizando PBST, se añadieron 50 μl de la premezcla de Fab de anticuerpo-VEGF a la placa y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, las placas se lavaron dos veces con PBST. A continuación, se añadieron 50 μl de una solución que comprendía anticuerpo anti-VEGF biotinilado (R&D, BAF293, dilución 1:2000 en PBST) y SA-HRP (KPL, 14-30-00, dilución 1:2000 en PBST) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Tras 6x lavados con PBST, se añadieron 50 μl

de solución de sustrato TMB (sustrato HRP de dos componentes (KPL, 34021); utilizado a temperatura ambiente) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de H₂SO₄ 1 N y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Se muestran los resultados en las **figuras 9 y 10** e ilustran la mejora de la inhibición de la unión de VEGF-R1 de 1HVL12.85 y RO7200394 respecto a 1HVL2.3.

Ejemplo 7:

Propiedades biofísicas de fragmentos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta mejorados (estabilidad e hidrofobicidad)

Se evaluaron las propiedades biofísicas indicadas de los anticuerpos candidatos tal como se ha indicado en el ejemplo 3, utilizando los fragmentos Fab biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta indicados (secuencia de aminoácidos tal como se ilustra en la **tabla 3**).

La **tabla 9** ilustra la estabilidad térmica y la hidrofobicidad de los anticuerpos analizados. A título de comparación, se incluye la estabilidad térmica del anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 0032 del arte previo, un anticuerpo IgG de longitud completa, tal como se da a conocer en el documento nº WO2016/075034. Los cromatogramas de la HIC se muestran en la **figura 11** para los fragmentos Fab biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta, y en la **figura 12** para el anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 0032 del arte previo.

Tabla 9: estabilidad térmica e hidrofobicidad de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta (datos del anticuerpo 0032 del arte previo procedentes del documento nº WO2016/075034)

anticuerpo		T _{ag} (°C)	T _m (°C) DLS	HIC (tiempo de retención relativo)
0032	IgG	55	62,5	0,81
1HVL2.3	Fab	75 (+/-1)	87 (+/-1)	0,58
1HVL12.85	Fab	73 (+/-1)	85 (+/-1)	0,03

RO7200394	Fab	73 (+/-1)	85 (+/-1)	0,04
------------------	-----	-----------	-----------	------

Ejemplo 8:

Propiedades biofísicas de fragmentos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta mejorados (viscosidad dinámica)

Se evaluó la viscosidad de los anticuerpos candidatos tal como se indica a continuación, utilizando los fragmentos Fab biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta indicados (secuencia de aminoácidos tal como se ilustra en la **tabla 3**).

Se midió la viscosidad con el método DLS de perlas de látex tal como se ha descrito anteriormente (He F. *et al.*, Anal. Biochem. 399(1):141-3, 1 de abril, 2010). Brevemente, se concentraron las muestras a >200 mg/ml (según la disponibilidad de material) con dispositivos de concentración centrífuga, p.ej., filtros centrífugos de 0,5 ml Amicon Ultra, Ultracel -10K, nº de cat. UFC501096.

Se preparó una serie de dilución de aproximadamente 10 mg/ml hasta la concentración máxima viable y se añadió polisorbato-20 y perlas (estándares de tamaño de nanoesfera, diam. nom.: 300nm, 1 % de sólidos, ThermoFisher nº de cat. 3300A) hasta una concentración final de 0,02 % (PS20) y de 0,03 % (p/p, perlas), respectivamente.

Una pequeña alícuota de dichas muestras se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad antes de determinar la concentración de proteínas mediante absorción de UV280.

La muestra restante se transfirió a una placa óptica de 384 pocillos, se cubrió con una capa de aceite de parafina para evitar la evaporación y se registraron los datos de DLS a la temperatura indicada. A partir de los datos de DLS para el radio hidrodinámico aparente de las perlas de látex, se calculó la viscosidad de la solución tal como se indica en He F. *et al.*, *supra*. La viscosidad a la concentración más alta medida se proporciona en la **tabla 10**. Los resultados también se muestran en la **figura 13** (1HVL12.85) y en la **figura 14** (RO7200394).

Tabla 10: viscosidad de anticuerpos biespecíficos anti-VEGF/anti-IL-1beta a 15 °C

anticuerpo		viscosidad
1HVL12.85	Fab	18,4 cP @ 195 mg/ml
RO7200394	Fab	14,6 cP @ 210 mg/ml

Los resultados indican que los anticuerpos de la invención pueden formularse a altas concentraciones que comprenden una viscosidad inferior al límite de viscosidad aceptable para la jeringabilidad, que es hasta 30 cP. Aunque ambos ensayos demostraron que los anticuerpos eran altamente concentrables, el efecto era más notable en el anticuerpo RO7200394.

En consecuencia, los anticuerpos de la invención resultan altamente adecuados para la aplicación ocular, ya que permite la provisión de una dosis molar elevada en un volumen de inyección limitado, que en combinación con una potencia elevada da como resultado una elevada durabilidad y, en consecuencia, una frecuencia de administración reducida, que resulta deseable para reducir las dificultades para el paciente.

Ejemplo 9:

Estabilidad química del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta mejorado

Ensayo de degradación química:

Se formularon muestras de anticuerpos en His/HisCl 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, y se dividieron en tres alícuotas: una alícuota se amortiguó nuevamente en PBS, respectivamente, y dos alícuotas se mantuvieron con la formulación original. La alícuota de PBS y una alícuota de His/HisCl se incubaron durante 2 semanas (2 sem.) a 40 °C (His/NaCl) o 37 °C (PBS) en 1 mg/ml; la muestra de PBS se incubó adicionalmente durante un total de 4 semanas (4 sem.). La tercera alícuota de muestra de control se almacenó a -80 °C. Tras acabar la incubación, las muestras se analizaron para la concentración activa relativa (Biacore, se normaliza la concentración activa de ambas

alícuotas estresadas de cada ligante a la alícuota no estresada a 4 °C), agregación (SEC) y fragmentación (electroforesis capilar o SDS-PAGE) y se compararon con el control no tratado.

La actividad de unión tras el estrés se evaluó de la manera siguiente:

Se inmovilizó un anticuerpo de captura anti-Fab (GE Healthcare 28958325) en un chip sensor C1 de serie S (GE Healthcare 29104988) utilizando química estándar de acoplamiento de aminas, lo que da como resultado una densidad superficial de aproximadamente 4000 a 6000 unidades de resonancia (UR). Como amortiguador de migración y dilución, se utilizó HBS-P+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, tensioactivo P20 al 0,05 %). El anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL12.85 con una concentración de 2 µg/ml se inyectó durante 60 s a un caudal de 5 µg/min. Se inyectó VEGF121_hu (preparación del propio laboratorio) o IL-1beta_hu (Preprotech 200-01B) a una concentración de 2 µg/ml cada uno durante 60 s; se monitorizó la disociación durante 60 s a un caudal de 5 µl/min. Se regeneró la superficie mediante dos inyecciones consecutivas de glicina 10 mM, pH 2,1, durante 60 s cada vez. Las diferencias de índice de refracción volumétrico se corrigieron restando las inyecciones en blanco y restando la respuesta obtenida de la celda de flujo de control en blanco. Para la evaluación, se obtuvo la respuesta de unión 5 segundos después del final de la inyección. Para normalizar la señal de unión, la respuesta de unión de VEGF o IL-1beta se dividió por la respuesta de anti-Fab. Se calculó la concentración activa relativa referenciando cada muestra térmicamente estresada con la muestra no estresada correspondiente.

Se muestran los resultados en las tablas 11 y 12.

Tabla 11: actividad de unión tras estrés para el anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL12.85 (para la secuencia de aminoácidos, ver la **tabla 3**)

condiciones de estrés	actividad de unión tras estrés - IL-1beta [% de unión]	actividad de unión tras estrés - VEGF [% de unión]
2 sem./40 °C/pH 6,0	98	98
2 sem./37 °C/pH 7,4	98	96

4 sem./40 °C/pH 6,0	97	95
4 sem./37 °C/pH 7,4	97	94

Tabla 12: integridad molecular tras estrés para el anticuerpo anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL12.85 (para la secuencia de aminoácidos, ver la **tabla 3**)

Condiciones de estrés	Agregación [% de agregados en SEC]	Fragmentación [% de fragmentos en CE-SDS]
2 sem./40 °C/pH 6,0	0,98	1,68
2 sem./37 °C/pH 7,4	1,94	3,39

Ejemplo 10:

Análisis estructural del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta mejorado 1HVL5.15

Se llevó a cabo el análisis estructural del fragmento Fab anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL5.15 mediante cristalografía de rayos X de la manera siguiente:

Formación de complejo y cristalización del complejo ternario IL1 β -VEGF121 - Fab 1HVL5.15

Para la formación de complejo, se mezcló el fragmento Fab del anticuerpo 1HVL5.15 e IL1 β humana (Preprotech) en una proporción molar de 1:1,1. Tras incubar durante 16 horas durante la noche a 4 °C, se añadió VEGF121 humano (preparación del propio laboratorio) para obtener un complejo ternario que se concentró hasta 10 mg/ml. Se llevaron a cabo pruebas de cristalización inicial en configuración de difusión de vapor en gota a 21 °C. Los primeros microcristales aparecieron en 4 días a partir de malonato

sódico 1,4 M. A partir de experimentos de siembra posteriores se obtuvieron cristales de cacodilato sódico 0,1 M, pH 5,5, acetato cálcico 0,1 M, PEG8000 al 12 %. Los cristales se recolectaron directamente de la placa de cribado sin ninguna etapa adicional de optimización.

Recolección de datos y determinación de la estructura

Para la recolección de datos, los cristales se enfriaron instantáneamente a 100°K en solución precipitante con adición de etilenglicol al 15 % como crioprotector. Se recogieron los datos de difracción a una longitud de onda de 1.0000 Å utilizando un detector PILATUS 6M en la línea de haz X10SA de la Swiss Light Source (Villigen, Suiza). Los datos han sido procesados con XDS (Kabsch, W. *Acta Cryst.* **D66**, 133-144, 2010) y escalados con SADABS (Bruker). Los cristales pertenecen al grupo espacial C222₁ con ejes de celda de a= 177,97 Å, b= 286,70 Å, c= 105,39 Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ y se difractan a una resolución de 2,97Å. Se determinó la estructura mediante sustitución molecular con PHASER (McCoy A.J. *et al.*, *J. Appl. Cryst.* **40**:658-674, 2007) utilizando las coordenadas de estructuras del propio laboratorio relacionadas de un fragmento Fab, IL1 β y entrada 1MKK del PDB para VEGF como modelos de búsqueda. Se han utilizado programas del grupo CCP4 (Collaborative Computational Project, número 4, *Acta Cryst.* **D50**:760-763, 1994) y Buster (Bricogne G. *et al.*, 2011). Buster versión 2.9.5 Cambridge, Reino Unido: Global Phasing Ltd) para afinar la estructura. La reconstrucción manual de la proteína utilizando las diferencias de electrodensidad se llevó a cabo con COOT (Emsley P. *et al.*, *Acta Cryst.* **D66**, 486-501, 2010). La recolección de datos y estadísticas de afinado se resumen en la **tabla 13**. Todas las presentaciones gráficas se prepararon con PYMOL (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, 2002). La estructura se analizó con el programa CONTACT, del grupo CCP4 (Collaborative Computational Project, número 4 *Acta Cryst.* **D50**, 760-763, 1994) para identificar los residuos de parátomos y epítomos utilizando una distancia máxima de contacto de 4 Å.

Tabla 13: recolección de datos y estadísticas de afinado de estructuras (cristalografía de rayos X)

Datos recolectados	
Longitud de onda (Å)	1,0
Resolución ¹ (Å)	49,76 - 2,97 (3,07 - 2,97)
Grupo espacial	C222 ₁
Celda unidad (Å, °)	177,97, 286,70, 105,39, 90°
Reflexiones únicas	55924 (5206)
Multiplicidad	7,60 (7,76)
Compleitud (%)	99,9 (99,9)
Media I/σ (I)	6,53 (0,84)
Media R	0,25 (0,93)
CC1/2	0,999 (0,297)
Afinado	
Resolución ¹ (Å)	49,76 - 2,97 (3,02 - 2,97)
Reflexiones utilizadas en el afinado	55851 (2753)
Reflexiones utilizadas para R libre	2595 (109)
R-work ³	0,204 (0,262)
R libre ⁴	0,252 (0,287)
Número de átomos	10540

Datos recolectados	
Residuos de proteína	577
Enlaces RMS (Å)	0,010
Ángulos RMS (°)	1,40
Ramachandran - favorecidos (%)	95,32
Ramachandran - atípicos (%)	0,15
Rotámero - atípicos (%)	0,84
Índice 'Clashscore'	9,03
Factor B medio (Å ²)	72,98
proteína	72,98

¹ Los valores entre paréntesis se refieren a los grupos de resolución más alta.

² $R_{\text{fusión}} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$ donde I es intensidad.

³ $R_{\text{work}} = \frac{\sum |F_o - \langle F_c \rangle|}{\sum F_o}$ donde F_o es el factor de amplitud observado y F_c es el factor de amplitud de la estructura calculada.

⁴ R_{libre} se calculó basándose en 5 % de los datos totales omitidos durante el afinado.

Los residuos de aminoácido en contacto con los antígenos respectivos, VEGF e IL-1beta, se identificaron a partir de la estructura cristalina del fragmento Fab biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL5.15 en el complejo. Se ilustra en las **figuras 2 y 3** una ilustración de la posición de los residuos de aminoácido paratópicos dentro de los dominios VH y VL.

Los aminoácidos de CDR1 y CDR3 de la cadena ligera, así como CDR2 de la cadena pesada, contribuyen al parátipo para VEGF. El parátipo para VEGF no comprende aminoácidos de CDR2 de la cadena ligera, CDR1 de la cadena pesada y CDR3 de la cadena pesada. El parátipo para IL-1beta no comprende aminoácidos de CDR2 de la

cadena ligera.

Los residuos de aminoácido que se ha identificado que contribuyen a la unión de antígenos se identifican en la **tabla 14** (para los residuos de aminoácido del dominio variable de la cadena pesada) y en la **tabla 15** (para los residuos de aminoácido del dominio variable de la cadena ligera). Las posiciones de los aminoácidos están numeradas según el sistema de numeración de Kabat (la misma numeración utilizada en las **figuras 2 y 3**). Las posiciones de los aminoácidos implicados en la unión de antígenos se identifican mediante su posición de Kabat en el dominio VH o VL (ver también la numeración en las **figuras 2 y 3**).

Tabla 14: residuos de aminoácido del dominio variable de la cadena pesada que participan en la unión de antígeno identificados mediante el análisis de la estructura cristalina del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL5.15

VH	VEGF	IL-1beta
FR1	-	2, 26, 28, 30
H-CDR1	-	31, 35b, 35c
FR2	-	-
H-CDR2	55, 56, 58, 61, 62, 63, 64	52a
FR3	66, 83	94
H-CDR3	-	95, 96, 98, 101
FR4	-	-

Tabla 15: residuos de aminoácido del dominio variable de la cadena ligera que participan en la unión de antígeno identificados mediante el análisis de la estructura cristalina del anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-IL-1beta 1HVL5.15

VL	VEGF	IL-1beta
FR1	2	-
L-CDR1	27, 27a, 27c, 27d	32
FR2	-	49
L-CDR2	-	50, 53, 54, 56
FR3	67, 68, 69	57
L-CDR3	92, 93, 94, 96	91
FR4	-	-