

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 323**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22	(2006.01) A61P 37/02	(2006.01)
A61P 11/06	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
C07K 16/32	(2006.01) A61P 19/02	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01) C07K 16/28	(2006.01)
A61P 17/00	(2006.01)	
A61P 17/06	(2006.01)	
A61P 27/02	(2006.01)	
A61P 29/00	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 35/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2021** **E 22152931 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023** **EP 4047018**

54 Título: **Anticuerpo biespecífico tetraivalente frente a PD-1 y VEGF, método de preparación para el mismo y uso del mismo**

30 Prioridad:

29.04.2020 CN 202010357134

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

26.06.2024

73 Titular/es:

**SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL
(SHANGHAI) CO., LTD. (100.0%)
No. 399 Libing Road
Pilot Free Trade Zone CHINA
(SHANGHAI)Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**ZHAO, JIE;
HUANG, HAOMIN y
ZHU, ZHENPING**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 974 323 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF, método de preparación para el mismo y uso del mismo

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos. Más particularmente, la presente invención se refiere a una clase de anticuerpos biespecíficos tetravalentes, a un método de preparación para los mismos y al uso de los mismos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Un anticuerpo biespecífico se refiere a una molécula de anticuerpo que puede unirse específicamente a dos antígenos o dos epítopos simultáneamente. Según la simetría, los anticuerpos biespecíficos pueden dividirse en moléculas estructuralmente simétricas y asimétricas. Según el número de sitios de unión, los anticuerpos biespecíficos pueden dividirse en moléculas bivalentes, trivalentes, tetravalentes y multivalentes.

20 Un ScFv consiste en una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), estando conectadas VH y VL mediante un ligador peptídico flexible. En el ScFv, el orden de los dominios puede ser VH-ligador-VL o VL-ligador-VH. Se han notificado diversos ligadores para conectar VH y VL, tal como ligadores de alanina cortos, ligadores ricos en glicina-serina, ligadores en conformación helicoidal y ligadores derivados de diversas moléculas de inmunoglobulina y no de inmunoglobulina (Ahmad Z A, Yeap S K, Ali A M, *et al.* scFv antibody: principles and clinical application[J]. Clinical and developmental immunology, 2012, 2012:980250.). Un ScFv representa habitualmente el sitio de unión más pequeño de un anticuerpo. Un anticuerpo biespecífico puede construirse conectando dos ScFv a través de un ligador. La molécula de anticuerpo biespecífico así construida es bivalente, teniendo un sitio de unión para cada antígeno, con un peso molecular habitualmente de aproximadamente 50-60 kDa. Dos fragmentos ScFv en tándem se plegarán independientemente y formarán su propio sitio de unión a antígeno. El formato de scFv en tándem biespecífico se ha usado ampliamente en la inmunoterapia contra el cáncer para redirigir células T a células tumorales o células asociadas a tumor en el microentorno tumoral. Esta forma constituye la base molecular del acoplador de células T biespecífico (BiTE). La primera molécula BiTE aprobada para su comercialización es blinatumomab (Huehls A M, Coupet T A, Sentman C L. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy[J]. Immunology and cell biology, 2015, 93(3): 290-296.).

35 El diacuerpo (Db) es una molécula bivalente compuesta de dos cadenas, cada una de las cuales contiene un dominio VH y uno VL, derivados del mismo o de diferentes anticuerpos. En un diacuerpo, los dos dominios variables están conectados mediante un ligador corto, habitualmente 5 residuos de aminoácido, tal como GGGGS. Dado que el ligador es significativamente más corto que la longitud requerida para permitir el ensamblaje intracatenario, esto provocará que las dos cadenas de ScFv se dimericen en un sentido de cabeza a cola, dando como resultado una molécula de diacuerpo empaquetada estrechamente con un peso molecular comparable al de los ScFv en tándem (Wu C. Diabodies: molecular engineering and therapeutic applications[J]. Drug News Perspect, 2009, 22(8): 453.). Cuando las dos cadenas de diacuerpo diferentes se expresan en las células, se producirá un emparejamiento erróneo de dominios variables. Además, dado que no hay ningún enlace no covalente entre las dos cadenas, el diacuerpo no es estable (Kipriyanov S M, Moldenhauer G, Braunagel M, *et al.* Effect of domain order on the activity of bacterially produced bispecific single-chain Fv antibodies[J]. Journal of molecular biology, 2003, 330(1): 99-111.).

45 El diacuerpo puede fusionarse con Fc humano para producir una molécula similar a IgG, denominada di-diacuerpo (Lu D, Zhang H, Koo H, *et al.* A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(20): 19665-19672.). Dos ScFv en tándem puede fusionarse también con Fc humano para producir una molécula similar a IgG, denominada TaFv-Fc (Chen Z, Xie W, Acheampong D O, *et al.* A human IgG-like bispecific antibody co-targeting epidermal growth factor receptor and the vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced antitumor activity[J]. Cancer biology & therapy, 2016, 17(2): 139-150.).

50 Además del di-diacuerpo y del TaFv-Fc descritos anteriormente, los anticuerpos biespecíficos tetravalentes estructuralmente simétricos incluyen también (pero no se limitan a) los siguientes tipos:

55 El extremo N-terminal o extremo C-terminal de la cadena pesada o cadena ligera de IgG natural está conectado al ScFv a través de un ligador polipeptídico, de modo que pueden formarse anticuerpos biespecíficos en el formato IgG-ScFv (Coloma M J, Morrison S L. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies[J]. Nature biotechnology, 1997, 15(2): 159.).

60 El extremo N-terminal de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo natural están conectados a la VL y la VH de otro anticuerpo, respectivamente a través de un ligador polipeptídico, de modo que pueden formarse anticuerpos biespecíficos en el formato DVD-Ig (Wu C, Ying H, Grinnell C, *et al.* Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin[J]. Nature biotechnology, 2007, 25(11): 1290.).

65

CrossMAB es una tecnología para el intercambio de regiones funcionales de brazos Fab de anticuerpo y es una plataforma de tecnología desarrollada por Roche. Esta tecnología soluciona el problema del ensamblaje correcto de cadenas ligeras y pesadas homólogas, y mejora además la tasa de éxito del ensamblaje. Se han publicado diversas formas de anticuerpos biespecíficos basándose en CrossMAB (Klein C, Schaefer W, Regula J T. The use of CrossMAB technology for the generation of bi- and multispecific antibodies[C]/MAbs. Taylor & Francis, 2016, 8(6): 1010-1020.).

El extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo natural está conectado a la cadena ligera de otro anticuerpo a través de un ligador polipeptídico y entonces se usa VH+CH1 como cadena corta independiente para emparejarse con la cadena ligera conectada al extremo N-terminal, de modo que pueden formarse anticuerpos biespecíficos en el formato FIT-IgG (documento US 10266608 B2).

IgG-TCR mejora la eficiencia de emparejamiento de la cadena pesada y la cadena ligera relacionadas reemplazando el CH1 de la cadena pesada y la CL de la cadena ligera con las regiones constantes de las cadenas α y β de receptores de células T (TCR) (Wu X, Sereno A J, Huang F, *et al.* Protein design of IgG/TCR chimeras for the co-expression of Fab-like moieties within bispecific antibodies[C]/MAbs. Taylor & Francis, 2015, 7(2): 364-376.). WuXiBody se ha mejorado en base a IgG-TCR, que añade un enlace disulfuro modificado mediante ingeniería entre las regiones constantes de las cadenas α y β , y mejora además la eficiencia del emparejamiento de cadena pesada y cadena ligera relacionadas, así como la estabilidad de moléculas de anticuerpo biespecífico (documento WO 2019/057122 A1).

Recientemente se ha notificado un método para construir anticuerpos biespecíficos tetravalentes. Este método diseña artificialmente la interfaz entre las cadenas pesadas y las cadenas ligeras del Fab basándose en la estructura cristalina y filtra una interfaz de Fab ortogonal a través de métodos experimentales. Las cadenas pesadas y cadenas ligeras del Fab ortogonal pueden emparejarse específicamente sin emparejamiento erróneo con cadenas pesadas y cadenas ligeras de tipo silvestre (Lewis S M, Wu X, Pustilnik A, *et al.* Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface[J]. Nature biotechnology, 2014, 32(2): 191.; Wu X, Sereno A J, Huang F, *et al.* Fab-based bispecific antibody formats with robust biophysical properties and biological activity[C]/MAbs. Taylor & Francis, 2015, 7(3): 470-482.). El documento CN 110 330 566 A (NANJING HUAYAN BIOTECHNOLOGY CO LTD), ejemplo 6, describe la construcción, expresión y caracterización de anticuerpos biespecíficos tetravalentes que reconocen VEGF y PD-1. El documento CN 110 272 495 A (NANJING HUAYAN BIOTECHNOLOGY CO LTD), ejemplo 4, describe también la construcción, expresión y caracterización de anticuerpos biespecíficos tetravalentes que reconocen PD-1 y VEGF.

Además, los anticuerpos biespecíficos con estructuras asimétricas pueden adoptar las siguientes estructuras (pero no están limitados a las mismas):

La función principal de la estructura de botón en ojal (KIH) es fomentar la heterodimerización de las dos cadenas pesadas diferentes de un anticuerpo biespecífico. Las características estructurales son tal como sigue: la región CH3 de una cadena pesada del anticuerpo biespecífico se muta para formar una estructura "botón" sobresaliente, y la región CH3 de la otra cadena pesada se muta para formar una estructura "de ojal" rebajada, y el diseño de botón en ojal (KIH) facilita el ensamblaje correcto de las cadenas pesadas de los dos anticuerpos heterólogos (Merchant A M, Zhu Z, Yuan J Q, *et al.* An efficient route to human bispecific IgG[J]. Nature biotechnology, 1998, 16(7): 677.). DuetMab usa tecnología KIH para la heterodimerización de 2 cadenas pesadas distintas y aumenta la eficiencia del emparejamiento de cadena pesada y cadena ligera relacionadas reemplazando el enlace disulfuro nativo en una de las interfaces CH1-CL con un enlace disulfuro modificado mediante ingeniería (Mazor Y, Oganesy V, Yang C, *et al.* Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design[C]/MAbs. Taylor & Francis, 2015, 7(2): 377-389.).

Otro método para potenciar la heterodimerización de cadenas pesadas diferentes es la técnica de mutación por direccionamiento electrostático, que se basa en residuos cargados con interacciones electrostáticas. Este método elige cambiar la polaridad de la carga en la interfaz CH3, de modo que el dominio Fc electrostáticamente coincidente facilita la formación de heterodímeros debido al efecto de atracción de cargas favorable, mientras que el efecto de repulsión de cargas desfavorable inhibe la homodimerización (documento US 10011858 B2; Gunasekaran K, Pentony M, Shen M, *et al.* Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects applications to bispecific molecules and monovalent IgG[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(25): 19637-19646).

A menudo se usa una cadena ligera común en la construcción de anticuerpos biespecíficos. La cadena ligera común puede reducir la producción de subproductos provocados por el emparejamiento erróneo de cadenas pesadas y cadenas ligeras, y aumentar el rendimiento de anticuerpos biespecíficos (Brinkmann U, Kontermann R E. The making of bispecific antibodies[C]/MAbs. Taylor & Francis, 2017, 9(2): 182-212.). En circunstancias normales, es necesario filtrar la cadena ligera común mediante métodos experimentales, que pueden obtenerse generalmente mediante tecnología de presentación en fago o hibridoma. En circunstancias normales, se requiere un examen de alto rendimiento de bibliotecas de anticuerpos para anticuerpos anti-A y anticuerpos anti-B, lo que requiere que la capacidad de las dos bibliotecas de anticuerpos no sea demasiado pequeña (Sampei Z, Igawa T, Soeda T, *et al.* Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity[J]. PloS one, 2013, 8(2): e57479.; documento US 9657102 B2).

Los anticuerpos biespecíficos están volviéndose gradualmente una nueva clase de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse para tratar diversas enfermedades inflamatorias, cánceres y otras enfermedades. Aunque recientemente se han

5 notificado un gran número de nuevas estructuras de anticuerpo biespecífico, la dificultad técnica principal a la hora de producir anticuerpos biespecíficos radica en obtener las moléculas emparejadas correctamente. Las formas de anticuerpo biespecífico anteriores tienen todas el problema del emparejamiento erróneo, así que se producirán uno o más subproductos o agregados provocados por el emparejamiento erróneo, lo que afectará al rendimiento, a la pureza y a la estabilidad física y química de los anticuerpos biespecíficos de interés, y afectará adicionalmente a la seguridad y la eficacia de los anticuerpos biespecíficos en el cuerpo.

SUMARIO DE LA INVENCION

10 La presente invención describe un anticuerpo biespecífico tetravalente estructuralmente simétrico a base de una cadena ligera común así como un método de construcción para el mismo. En circunstancias normales, habrá emparejamiento erróneo entre cadenas pesadas y cadenas ligeras, así como emparejamiento erróneo entre cadenas pesadas y cadenas pesadas de anticuerpos biespecíficos. Cuanto mayor sea la eficiencia de ensamblaje correcto, menor será el grado de emparejamiento erróneo. En este caso, la presente invención soluciona el problema de emparejamiento erróneo entre
 15 cadenas pesadas y cadenas ligeras usando una cadena ligera común, y conecta la región variable de cadena pesada VH-B de un anticuerpo a CH1, y entonces lo conecta a la región variable de cadena pesada VH-A de otro anticuerpo a través de un péptido ligador, y entonces lo conecta a la región constante de cadena pesada CH1-CH2-CH3 para formar una cadena pesada larga. Cuando los genes de la cadena pesada larga y la cadena ligera común se expresan en las mismas células, cada cadena pesada larga se emparejará con dos cadenas ligeras comunes y no habrá ningún emparejamiento
 20 erróneo entre la cadena pesada larga y la cadena ligera común, porque las dos cadenas ligeras emparejadas con cada cadena pesada larga son iguales; las cadenas pesadas largas experimentarán homodimerización en lugar de heterodimerización, así que no habrá ningún emparejamiento erróneo entre las cadenas pesadas largas. El anticuerpo biespecífico tetravalente de la presente invención no requiere modificación de Fc, tiene un método de preparación simple y tiene una actividad biológica y propiedades físicas y químicas similares o incluso mejores que las de los anticuerpos monoclonales.

Además, los inventores de la presente solicitud descubrieron inesperadamente durante el estudio a largo plazo del anticuerpo biespecífico tetravalente anterior que el anticuerpo anti-PD-1 humano Acm1-25-Hu (609) se une a la molécula de PD-1 principalmente a través de la cadena pesada, pero es menos dependiente de la cadena ligera. Por tanto, la región variable de cadena pesada/cadena pesada de 609 puede combinarse con la región variable de cadena pesada/cadena pesada y la región variable de cadena ligera/cadena ligera (como cadena ligera común) de otros anticuerpos diana para construir un anticuerpo biespecífico que se une a PD-1 y otras dianas, y puede aplicarse a, incluyendo pero sin limitarse a, la estructura de anticuerpo biespecífico tetravalente de la presente invención u otras formas de estructura de anticuerpo biespecífico que contienen una cadena ligera común conocida en la técnica.

35 Por tanto, el primer objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo biespecífico tetravalente.

El segundo objeto de la presente invención es proporcionar un nucleótido aislado que codifica el anticuerpo biespecífico tetravalente.

40 El tercer objeto de la presente invención es proporcionar un vector de expresión que comprende el nucleótido.

El cuarto objeto de la presente invención es proporcionar una célula huésped que comprende el vector de expresión.

45 El quinto objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar el anticuerpo biespecífico tetravalente.

El sexto objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico tetravalente.

50 El séptimo objeto de la presente invención es proporcionar el uso del anticuerpo biespecífico tetravalente o de la composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos.

El octavo objeto de la presente invención es proporcionar un método para construir un anticuerpo biespecífico tetravalente.

55 El noveno objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo biespecífico que comprende la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:83.

60 El décimo objeto de la presente invención es proporcionar el uso de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 83 para la construcción de un anticuerpo biespecífico.

Con el fin de conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona las siguientes soluciones técnicas.

65 El primer aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico tetravalente, comprendiendo el anticuerpo biespecífico tetravalente:

dos cadenas polipeptídicas, la cadena polipeptídica que comprende VH-B-CH1-péptido ligador-VH-A-CH1-CH2-CH3 desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, siendo la VH-A una región variable de cadena pesada de un primer anticuerpo, siendo la VH-B una región variable de cadena pesada de un segundo anticuerpo, siendo el CH1 un primer dominio de la región constante de cadena pesada, siendo el CH2 un segundo dominio de la región constante de cadena pesada, siendo el CH3 un tercer dominio de la región constante de cadena pesada, uniéndose el primer anticuerpo específicamente a un primer antígeno, uniéndose el segundo anticuerpo específicamente a un segundo antígeno;

cuatro cadenas ligeras comunes, la cadena ligera común que comprende VL-CL desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, siendo la VL la región variable de cadena ligera, siendo la CL la región constante de cadena ligera, y emparejándose el VH-A-CH1 de la cadena polipeptídica y el VH-B-CH1 de la cadena polipeptídica con la VL-CL de la cadena ligera común, respectivamente, formando la VH-A y la VL un primer sitio de unión a antígeno, y formando la VH-B y la VL un segundo sitio de unión a antígeno.

La estructura del anticuerpo biespecífico de la presente invención se muestra en la Fig. 1.

Según la presente invención, la cadena ligera común se selecciona y se obtiene mediante el siguiente método:

intercambiar la cadena pesada y la cadena ligera del primer anticuerpo y del segundo anticuerpo, respectivamente, para obtener un anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera del segundo anticuerpo, y un anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera del primer anticuerpo, y:

(a) seleccionar la cadena ligera del segundo anticuerpo como la cadena ligera común, si el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera del segundo anticuerpo puede unirse específicamente al primer antígeno;

(b) seleccionar la cadena ligera del primer anticuerpo como la cadena ligera común, si el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera del primer anticuerpo puede unirse específicamente al segundo antígeno;

(c) retromutar la cadena ligera del primer anticuerpo de modo que el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera mutante del primer anticuerpo puede unirse específicamente al segundo antígeno, y entonces seleccionar la cadena ligera mutante del primer anticuerpo como la cadena ligera común, si el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera del segundo anticuerpo no puede unirse específicamente al primer antígeno, y el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera del primer anticuerpo no puede unirse específicamente al segundo antígeno; o

(d) retromutar la cadena ligera del segundo anticuerpo de modo que el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera mutante del segundo anticuerpo puedan unirse específicamente al primer antígeno, y entonces seleccionar la cadena ligera mutante del segundo anticuerpo como la cadena ligera común, si el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera del segundo anticuerpo no puede unirse específicamente al primer antígeno, y el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera del primer anticuerpo no puede unirse específicamente al segundo antígeno.

Para los casos anteriores de (a) y (b), cuando el anticuerpo híbrido puede unirse específicamente al antígeno, como realización preferida, la cadena ligera puede retromutarse también para mejorar adicionalmente la afinidad de unión del anticuerpo híbrido con respecto al antígeno. Por tanto, además, la cadena ligera común se selecciona y se obtiene mediante el siguiente método:

intercambiar la cadena pesada y la cadena ligera del primer anticuerpo y del segundo anticuerpo, respectivamente, para obtener un anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera del segundo anticuerpo, y un anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera del primer anticuerpo, y

(a') retromutar la cadena ligera del segundo anticuerpo de modo que la afinidad de unión del anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera mutante del segundo anticuerpo con respecto al primer antígeno es mejor que la afinidad de unión del anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera del segundo anticuerpo con respecto al primer antígeno, y seleccionar la cadena ligera mutante del segundo anticuerpo como la cadena ligera común, si el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del primer anticuerpo y la cadena ligera del segundo anticuerpo puede unirse específicamente al primer antígeno;

(b') retromutar la cadena ligera del primer anticuerpo de modo que la afinidad de unión del anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera mutante del primer anticuerpo con respecto al segundo antígeno es mejor que la afinidad de unión del anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera del primer anticuerpo con respecto al segundo antígeno, y entonces seleccionar la cadena ligera mutante del primer anticuerpo como la cadena ligera común, si el anticuerpo híbrido formado por la combinación de la cadena pesada del segundo anticuerpo y la cadena ligera del primer anticuerpo puede unirse específicamente al segundo antígeno.

Según la presente invención, el péptido ligador es un ligador artificial. Preferiblemente, el ligador artificial se selecciona del grupo que consiste en G, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GGG, GGGS, SGGG, GGGGS, GGGGSGS, GGGGSGGS, GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 150), AKTTPKLEEGEFSEAR, AKTTPKLEEGEFSEARV, AKTTPKLGG, SAKTTPKLGG, SAKTTP, RADAAP, RADAAPTVS, RADAAAAGGPGS, SAKTTPKLEEGEFSEARV, ADAAP, ADAAPTVSIFPP, TVAAP, TVAAPSVFIFPP, QPKAAP, QPKAAPSVTLFPP, AKTTPP, AKTTPPSVTPLAP, AKTTAPSVYPLAP, ASTKGP, ASTKGPSVFLAP, GENKVEYAPALMALS, GPAKELTPLKEAKVS, GHEAAVMQVQYPAS, etc. Más preferiblemente, el ligador artificial es GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 150).

Según la presente invención, el dominio CH1 que está cerca del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica y CH1-CH2-CH3 puede derivarse de regiones constantes de cadena pesada de los mismos o diferentes subtipos, incluyendo la región constante de cadena pesada del grupo que consiste en: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y preferiblemente derivarse de la región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4. Preferiblemente, la IgG4 comprende la mutación S228P (según la numeración de la UE).

Según la presente invención, la CL es una región constante de cadena ligera κ o una región constante de cadena ligera λ .

Según una realización preferida de la presente invención, el primer antígeno y el segundo antígeno se seleccionan del grupo que consiste en: VEGF/PD-1, PD-1/VEGF, TGF- β /PD-1, PD-1/ TGF- β , HER2/CD47, CD47/HER2, HER2/CD137, CD137/HER2, PD-1/CD137, CD137/PD-1, PD-1/CD40, CD40/PD-1, PD-1/EGFR, EGFR/PD-1, PD-1/HER2, HER2/PD-1, PD-1/CTLA-4, CTLA-4/PD-1, PD-1/LAG-3, LAG-3/PD-1.

Según una realización preferida de la presente invención, la VH-A o la VH-B tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 83.

Según una realización preferida de la presente invención, la VH-A, la VH-B y la VL tienen las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 1, 11, 15; las SEQ ID NO: 11, 1, 15; las SEQ ID NO: 20, 11, 15; las SEQ ID NO: 11, 20, 15; las SEQ ID NO: 29, 41, 42; las SEQ ID NO: 41, 29, 42; las SEQ ID NO: 31, 41, 42; las SEQ ID NO: 41, 31, 42; las SEQ ID NO: 53, 61, 54; las SEQ ID NO: 61, 53, 54; las SEQ ID NO: 53, 77, 54; las SEQ ID NO: 77, 53, 54; las SEQ ID NO: 83, 91, 92; las SEQ ID NO: 91, 83, 92; las SEQ ID NO: 83, 105, 106; las SEQ ID NO: 105, 83, 106; las SEQ ID NO: 83, 113, 114; las SEQ ID NO: 113, 83, 114; las SEQ ID NO: 83, 117, 118; las SEQ ID NO: 117, 83, 118; las SEQ ID NO: 83, 119, 120; las SEQ ID NO: 119, 83, 120; las SEQ ID NO: 83, 121, 122 y las SEQ ID NO: 121, 83, 122.

Según una realización preferida de la presente invención, la cadena polipeptídica y la cadena ligera común tienen las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 16, 13; las SEQ ID NO: 18, 13; las SEQ ID NO: 21, 13; las SEQ ID NO: 45, 43; las SEQ ID NO: 47, 43; las SEQ ID NO: 49, 43; las SEQ ID NO: 51, 43; las SEQ ID NO: 65, 63; las SEQ ID NO: 67, 63; las SEQ ID NO: 79, 63; las SEQ ID NO: 81, 63; las SEQ ID NO: 95, 93; las SEQ ID NO: 97, 93; las SEQ ID NO: 109, 107; las SEQ ID NO: 111, 107; las SEQ ID NO: 131, 123; las SEQ ID NO: 133, 125; las SEQ ID NO: 135, 127; las SEQ ID NO: 137, 127; las SEQ ID NO: 139, 127; las SEQ ID NO: 141, 127; las SEQ ID NO: 143, 129 y las SEQ ID NO: 145, 129.

El segundo aspecto de la presente invención proporciona un nucleótido aislado, que codifica el anticuerpo biespecífico tetravalente.

El tercer aspecto de la presente invención proporciona un vector de expresión, que comprende el nucleótido.

Según una realización preferida de la presente invención, el nucleótido codifica la cadena polipeptídica y la cadena ligera común, y el nucleótido tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 17, 14; las SEQ ID NO: 19, 14; las SEQ ID NO: 22, 14; las SEQ ID NO: 46, 44; las SEQ ID NO: 48, 44; las SEQ ID NO: 50, 44; las SEQ ID NO: 52, 44; las SEQ ID NO: 66, 64; las SEQ ID NO: 68, 64; las SEQ ID NO: 80, 64; las SEQ ID NO: 82, 64; las SEQ ID NO: 96, 94; las SEQ ID NO: 98, 94; las SEQ ID NO: 110, 108; las SEQ ID NO: 112, 108; las SEQ ID NO: 132, 124; las SEQ ID NO: 134, 126; las SEQ ID NO: 136, 128; las SEQ ID NO: 138, 128; las SEQ ID NO: 140, 128; las SEQ ID NO: 142, 128; las SEQ ID NO: 144, 130 y las SEQ ID NO: 146, 130.

El cuarto aspecto de la presente invención proporciona una célula huésped, que comprende el vector de expresión.

El quinto aspecto de la presente invención proporciona un método para preparar el anticuerpo biespecífico tetravalente, que comprende las siguientes etapas de:

- a) cultivar la célula huésped en condiciones de expresión, para expresar el anticuerpo biespecífico tetravalente;
- b) aislar y purificar el anticuerpo biespecífico tetravalente de la etapa a).

5 El sexto aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo biespecífico tetravalente tal como se describió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 El séptimo aspecto de la presente invención proporciona el uso del anticuerpo biespecífico tetravalente o de la composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos. La presente invención proporciona también un método para tratar cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos, que comprende administrar el anticuerpo biespecífico tetravalente o la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite. Los cánceres incluyen, pero no se limitan a: melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente a hormonas),
 15 cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer esofágico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, glioblastoma, glioma, leucemia, linfoma y otras enfermedades malignas neoplásicas. Las enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos incluyen, pero no se limitan a: trastornos oftalmológicos, fibrosis, asma, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple,
 20 psoriasis, dermatitis atópica, etc. Y el sujeto incluye, pero no se limita a, un humano.

El octavo aspecto de la presente invención proporciona un método para construir un anticuerpo biespecífico tetravalente, que comprende las siguientes etapas de

- 25 (a) conectar una región variable de cadena pesada VH-B de un segundo anticuerpo con un primer dominio CH1 de una región constante de cadena pesada, y uniéndose el segundo anticuerpo específicamente a un segundo antígeno;
- (b) conectar (a) con una región variable de cadena pesada VH-A de un primer anticuerpo a través de un péptido ligador, y uniéndose el primer anticuerpo específicamente a un primer antígeno;
- 30 (c) conectar (b) con una región constante de cadena pesada CH1-CH2-CH3, para formar una cadena polipeptídica;
- (d) construir respectivamente (c) y la cadena ligera común VL-CL para dar un vector de expresión, para una expresión de combinación, para obtener el anticuerpo biespecífico tetravalente de interés; y

35 el CH1 es el primer dominio de la región constante de cadena pesada, el CH2 es un segundo dominio de la región constante de cadena pesada y el CH3 es un tercer dominio de la región constante de cadena pesada, la VL es una región variable de cadena ligera y la CL es una la región constante de cadena ligera, la VH-A-CH1 y la VH-B-CH1 están emparejadas con la VL-CL, respectivamente, la VH-A y la VL forman un primer sitio de unión a antígeno, la VH-B y la VL forman un segundo sitio de unión a antígeno.

40 El noveno aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico, que comprende al menos dos regiones variables de cadena pesada diferentes y al menos dos cadenas ligeras comunes, las cadenas ligeras comunes comprenden una misma región variable de cadena ligera, y las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera forman sitios de unión a antígeno, y las regiones variables de cadena pesada comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 83.

45 El décimo aspecto de la presente invención proporciona el uso de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 83 para construir un anticuerpo biespecífico, el anticuerpo biespecífico comprende al menos dos regiones variables de cadena pesada diferentes y al menos dos cadenas ligeras comunes, comprendiendo las cadenas ligeras comunes una misma región variable de cadena ligera, y las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera forman sitios de unión a antígeno.

50 En la presente invención, los términos "anticuerpo (abreviado como Ac)" e "inmunoglobulina G (abreviado como IgG)" son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons con características estructurales idénticas, compuestas de dos cadenas ligeras (LC) idénticas y dos cadenas pesadas (HC) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y cadena ligera tiene también puentes disulfuro intracatenarios espaciados de manera regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo una región variable (VH) seguida de regiones constantes. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios estructurales, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera tiene una región variable (VL) en un extremo y una región constante en su otro extremo, la región constante de cadena ligera incluye un dominio CL; la región constante de la cadena ligera está emparejada con el dominio CH1 de la región constante de la cadena pesada, y la región variable de la cadena ligera está emparejada con la región variable de la cadena pesada. Las regiones constantes no están implicadas directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tal como la participación en citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). La región constante de cadena pesada incluye los

subtipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; la región constante de cadena ligera incluye κ (Kappa) o λ (Lambda). La cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo están ligadas covalentemente entre sí mediante el enlace disulfuro entre el dominio CH1 de la cadena pesada y el dominio CL de la cadena ligera, y las dos cadenas pesadas del anticuerpo están ligadas covalentemente entre sí mediante enlaces disulfuro interpolipeptídicos formados entre las regiones bisagra.

5 En la presente invención, el término "anticuerpo biespecífico (AcBs)" se refiere a una molécula de anticuerpo que puede unirse específicamente a dos antígenos (dianas) o dos epítomos al mismo tiempo.

10 En la presente invención, el término "anticuerpo monoclonal (Acm)" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales contenidos en la población son iguales, excepto por unas pocas mutaciones que se producen de manera natural posibles. Los anticuerpos monoclonales seleccionan como diana un único sitio de antígeno con alta especificidad. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo policlonal convencionales (habitualmente una mezcla que tiene diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes antigénicos), cada anticuerpo monoclonal va dirigido frente a un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, el beneficio de anticuerpos monoclonales es que se sintetizan mediante cultivo de hibridomas y no están contaminados mediante otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica las características de un anticuerpo, que se obtiene de una población de anticuerpo sustancialmente uniforme, y no debe interpretarse como que requiere ningún método especial para producir el anticuerpo.

20 En la presente invención, los términos "Fab" y "Fc" significan que la papaína puede escindir un anticuerpo en dos segmentos Fab idénticos y un segmento Fc. El segmento Fab se compone de la VH y el CH1 de la cadena pesada del anticuerpo y los dominios VL y CL de la cadena ligera. El segmento Fc puede ser un fragmento cristizable (Fc), que se compone de los dominios CH2 y CH3 del anticuerpo. El segmento Fc no tiene actividad de unión a antígeno y es el sitio en el que el anticuerpo interacciona con células o moléculas efectoras.

25 En la presente invención, el término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de las regiones variables difieren extensamente en su secuencia entre anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de las regiones variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en las regiones variables de cadena ligera como en las regiones variables de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de las regiones variables se denominan regiones de entramado (FR). Las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras nativas comprenden cada una cuatro regiones FR, adoptando en su gran mayoría una configuración de lámina β , conectada mediante tres CDR, que forman bucles que conectan, y que en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen entre sí en proximidad estrecha mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, NIH Publ. No. 91-3242, volumen I, páginas 647-669 (1991)).

40 En la presente invención, el término "anticuerpo murino" se refiere a un anticuerpo derivado de una rata o un ratón, preferiblemente un ratón.

45 En la presente invención, el término "anticuerpo humanizado" significa que las CDR se derivan de un anticuerpo no humano (preferiblemente, de ratón), mientras que las partes restantes (incluyendo regiones de entramado y regiones constantes) se derivan de un anticuerpo humano. Además, pueden alterarse residuos de región de entramado para conservar la afinidad de unión.

50 En la presente invención, los términos "se unen específicamente/unión específica" y "unirse/unión" se refieren a una reacción de unión no aleatoria entre dos moléculas, tal como la reacción entre un anticuerpo y el antígeno al que va dirigido. Generalmente, el anticuerpo se une al antígeno con una constante de disociación de equilibrio (KD) de menos de aproximadamente 10^{-7} M, por ejemplo, menos de aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o menos. En la presente invención, el término "KD" se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno específica, que se usa para describir la afinidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno. Cuanto menor sea la constante de disociación de equilibrio, más estrecha será la unión anticuerpo-antígeno, y mayor será la afinidad entre el anticuerpo y el antígeno. Por ejemplo, se usa resonancia de plasmón superficial (abreviada como SPR) para medir la afinidad de unión de anticuerpo a antígeno en un instrumento BIACORE o se usa ELISA para medir la afinidad de unión relativa de anticuerpo a antígeno.

60 En la presente invención, el término "valencia" se refiere a la presencia de un número especificado de sitios de unión a antígeno en un anticuerpo molécula. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de la presente invención tiene cuatro sitios de unión a antígeno y es tetravalente. En la presente invención, el sitio de unión a antígeno incluye una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL).

65 En la presente invención, el término "epitopo" se refiere a un determinando polipeptídico que se une específicamente a un anticuerpo. El epitopo de la presente invención es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo.

En la presente invención, el término “péptido ligador” se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos. El péptido ligador de la presente invención es un ligador nativo o un ligador artificial. Preferiblemente, el péptido ligador de la presente invención es un ligador artificial. El polipéptido ligador de la presente invención puede seleccionarse de G, GS, SG, GGS, GSG, SGG, GGG, GGGS, SGGG, GGGGS, GGGGSGS, GGGGSGGS, GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 150), AKTTPKLEEGEFSEAR, AKTTPKLEEGEFSEARV, AKTTPKLGG, SAKTTPKLGG, SAKTTP, RADAAP, RADAAPTVS, RADAAAAGGPGS, SAKTTPKLEEGEFSEARV, ADAAP, ADAAPTVSIFPP, TVAAP, TVAAPSVFIFPP, QPKAAP, QPKAAPSVTLFPP, AKTTPP, AKTTPPSVTLPLAP, AKTTAPSVYPLAP, ASTKGP, ASTKGPSVFPLAP, GENKVEYAPALMALS, GPAKELTPLKEAKVS y GHEAAAVMQVQYPAS, etc. El ligador puede ser también un péptido ligador que puede escindirse *in vivo*, un ligador sensible a proteasa (tal como MMP), un ligado basado en enlace disulfuro que puede escindirse mediante reducción, etc., véase “Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges, edited by Stefan R. Schmidt” descrito previamente, o cualquier ligador escindible conocido en la técnica. Estos ligadores escindibles pueden usarse para liberar el Fab en la parte superior de la molécula *in vivo* para mejorar la penetración y distribución en el tejido, potenciar la unión a la diana, reducir los efectos secundarios potenciales y ajustar las funciones *in vivo* y las semividas de dos regiones Fab diferentes. Lo más preferiblemente, el ligador artificial de la presente invención es GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 150).

En la presente invención, el término “cadena ligera común” se refiere a una cadena ligera que comprende la misma región variable de cadena ligera y región constante de cadena ligera, que pueden emparejarse con la cadena pesada de un primer anticuerpo que se une a un primer antígeno, para formar un sitio de unión que se une específicamente al primer antígeno, y también puede emparejarse con la cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une a un segundo antígeno, para formar un sitio de unión que se une específicamente al segundo antígeno. Además, la región variable de cadena ligera de la cadena ligera común y la región variable de cadena pesada del primer anticuerpo forman un primer sitio de unión a antígeno, y la región variable de cadena ligera de la cadena ligera común y la región variable de cadena pesada del segundo anticuerpo forman un segundo sitio de unión a antígeno.

En la presente invención, el término “vector de expresión” puede ser pTT5, vectores de la serie pSECTag, la serie pCGS3, la serie pCDNA, así como otros vectores usados en sistemas de expresión de mamífero, etc. El vector de expresión comprende una secuencia de ADN de fusión conectada con secuencias reguladores de transcripción y traducción apropiadas.

En la presente invención, el término “célula huésped” se refiere a una célula adecuada para expresar el vector de expresión tal como se describió anteriormente, que puede ser una célula eucariota, por ejemplo, puede usarse un sistema de cultivo de células huésped de mamífero o de insecto para expresar la proteína de fusión de la presente invención, CHO (ovario de hámster chino), HEK293, COS, BHK, así como células derivadas de las células mencionadas anteriormente son aplicables a la presente invención.

En la presente invención, el término “composición farmacéutica” significa que el anticuerpo biespecífico tetravalente de la presente invención puede combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable para formar una composición de preparación farmacéutica, para ejercer un efecto terapéutico de manera más estable. Estas preparaciones pueden garantizar la integridad conformacional de las secuencias de núcleo de aminoácido del anticuerpo biespecífico tetravalente dado a conocer en la presente invención, y al mismo tiempo, proteger los grupos multifuncionales de la proteína frente a la degradación (incluyendo, pero sin limitarse a, agregación, desaminación u oxidación).

La presente invención describe un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene una estructura simétrica basada en cadenas ligeras comunes y un método de construcción para el mismo. El anticuerpo biespecífico preparado mediante la presente invención tiene una actividad biológica y propiedades físicas y químicas similares o incluso mejores que las de anticuerpos monoclonales, y puede usarse para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, cánceres y otras enfermedades.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de la estructura del anticuerpo biespecífico de la presente invención, donde VH-A representa la región variable de cadena pesada del primer anticuerpo, VH-B representa la región variable de cadena pesada del segundo anticuerpo, VL representa la región variable de cadena ligera de la cadena ligera común; CH1, CH2, y CH3 representan los tres dominios de la región constante de cadena pesada, CL representa la región constante de cadena ligera de la cadena ligera común, la línea entre dos cadenas pesadas representa un enlace disulfuro, la línea entre una cadena pesada y una cadena ligera representa también un enlace disulfuro, la línea entre CH1 que está cerca del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica y VH-A representa un ligador diseñado artificialmente, y la línea entre CH1 que está cerca del extremo C-terminal de la cadena polipeptídica y CH2 representa un ligador nativo y región bisagra del anticuerpo (si la cadena pesada es del subtipo IgG4 humano, la región bisagra contendrá la mutación S228P).

Las Figs. 2A y 2B muestran los resultados de ELISA de 601 y 20-Hu y sus anticuerpos híbridos.

Las Figs. 3A y 3B muestran los resultados de ELISA de 20-Fab-601-IgG4-V94L y 601-Fab-20-IgG4-V94L.

- Las Figs. 4A y 4B muestran los patrones de HPLC-SEC de 20-Fab-601-IgG4-V94L.
- Las Figs. 5A y 5B muestran los patrones de HPLC-IEC de 20-Fab-601-IgG4-V94L.
- 5 Las Figs. 6A-6D muestran los patrones de CE-SDS de 20-Fab-601-IgG4-V94L.
- Las Figs. 7A y la Fig. 7B muestran los patrones de DSC de 20-Fab-601-IgG4-V94L.
- 10 La Fig. 8 muestra los resultados de determinación de la capacidad de 20-Fab-0313-IgG4-V94L de neutralizar la actividad biológica de VEGF.
- Las Figs. 9A y 9B muestran los resultados de evaluación de la actividad funcional de 20-Fab-0313-IgG4-V94L para potenciar la MLR.
- 15 La Fig. 10 muestra una evaluación de la capacidad de 20-Fab-0313-IgG4-V94L de unirse simultáneamente a PD-1 y VEGF165.
- La Fig. 11 muestra las propiedades farmacocinéticas de 20-Fab-0313-IgG4-V94L.
- 20 La Fig. 12 muestra las curvas de crecimiento antitumoral de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y VEGF en ratones.
- Las Figs. 13A y 13B muestran los resultados de ELISA de 1D11-Hu y 14-Hu y sus anticuerpos híbridos.
- 25 La Fig. 14 muestra los resultados de ELISA de Acm127, 14-Hu y sus anticuerpos híbridos.
- Las Figs. 15A y 15B muestran los resultados de ELISA de 14-Fab-1D11-IgG4, 1D11-Fab-14-IgG4, 14-Fab-127-IgG4 y 127-Fab-14-IgG4.
- 30 Las Figs. 16A y 16B muestran los resultados de evaluación de la actividad funcional de 14-Fab-127-IgG4 para potenciar la MLR.
- La Fig. 17 muestra la evaluación de la capacidad de 14-Fab-127-IgG4 para unirse simultáneamente a TGF- β 1 y PD-1.
- 35 La Fig. 18 muestra las curvas de crecimiento antitumoral de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y TGF-beta en ratones.
- Las Figs. 19A y 19B muestran los resultados de ELISA de 19H6-Hu, Anti-CD47B-Hu y sus anticuerpos híbridos.
- 40 Las Figs. 20A y 20B muestran los resultados de ELISA de CD47B-Fab-19H6-IgG1 y 19H6-Fab-CD47B-IgG1.
- Las Figs. 21A y 21B muestran los resultados de ELISA de 19H6-Hu, 94-Hu y sus anticuerpos híbridos.
- 45 Las Figs. 22A y 22B muestran los resultados de ELISA de 94-Fab-19H6-IgG1-LALA y 19H6-Fab-94-IgG1-LALA.
- Las Figs. 23A y 23B muestran los resultados de ELISA de 609, Anti-CD137-Hu y sus anticuerpos híbridos.
- Las Figs. 24A y 24B muestran los resultados de ELISA de 609-Fab-137-IgG4 y 137-Fab-609-IgG4.
- 50 Las Figs. 25A y 25B muestran los resultados de ELISA de 609 y Anti-CD40-Hu y sus anticuerpos híbridos.
- Las Figs. 26A y 26B muestran los resultados de ELISA de 609-Fab-40-IgG4 y 40-Fab-609-IgG4.
- 55 La Fig. 27 muestra los resultados de ELISA de 609-HC+cetuximab-LC, 609-HC+bevacizumab-LC, 609-HC+trastuzumab-LC, 609-HC+pertuzumab-LC, 609-HC+ipilimumab-LC y 609-HC+5E7-Hu-LC.
- La Fig. 28 muestra los resultados de la capacidad de 609-HC+cetuximab-LC, 609-HC+bevacizumab-LC, 609-HC+trastuzumab-LC, 609-HC+pertuzumab-LC, 609-HC+ipilimumab-LC y 609-HC+5E7-Hu-LC para bloquear la interacción PD-1/PD-L1.
- 60 La Fig. 29 muestra los resultados de la capacidad de 609-HC+cetuximab-LC, 609-HC+bevacizumab-LC, 609-HC+trastuzumab-LC, 609-HC+pertuzumab-LC, 609-HC+ipilimumab-LC y 609-HC+5E7-Hu-LC para potenciar una reacción linfocítica mixta.
- 65

La Fig. 30 muestra la determinación de la capacidad de 609, 609-HC+cetuximab-LC, 609-HC+bevacizumab-LC, 609-HC+pertuzumab-LC, 609-HC+ipilimumab-LC y 609-HC+5E7-Hu-LC para unirse a PD-1 en la superficie celular mediante citometría de flujo.

5 La Fig. 31 muestra los resultados de barrido de alanina de la región variable de cadena ligera de 609.

Las Figs. 32A y 32B muestran los resultados de ELISA de 609-Fab-cetuximab-IgG4.

Las Figs. 33A y 33B muestran los resultados de ELISA de 609-Fab-pertuzumab-IgG4.

10

Las Figs. 34A y 34B muestran los resultados de ELISA de 609-Fab-ipilimumab-IgG1, Ipilimumab-Fab-609-IgG1, 609-Fab-ipilimumab-IgG4 e Ipilimumab-Fab-609-IgG4.

15

La Fig. 35 muestra los resultados de determinación de la actividad funcional de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4.

La Fig. 36 muestra los resultados de determinación de la actividad ADCC de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4.

20

La Fig. 37 muestra las farmacocinéticas de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4 en ratas.

La Fig. 38 muestra las curvas de crecimiento antitumoral de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4 en ratones.

25

Las Figs. 39A y 39B muestran los resultados de ELISA de 609-Fab-5E7-IgG4 y 5E7-Fab-609-IgG4.

La Fig. 40 muestra la determinación de la capacidad de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3 para unirse simultáneamente a dos antígenos.

30

La Fig. 41 muestra la determinación de la actividad funcional de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3.

La Fig. 42 muestra las curvas de crecimiento antitumoral de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3 en ratones.

35

Las Figs. 43A ~ 43E muestran las pruebas de especificidad de anticuerpos híbridos.

Las Figs. 44A ~ 44H muestran los patrones de HPLC-IEC de 609-Fab-cetuximab-IgG4, 609-Fab-pertuzumab-IgG4, 609-Fab-ipilimumab-IgG1, Ipilimumab-Fab-609-IgG1, 609-Fab-ipilimumab-IgG4, Ipilimumab-Fab-609-IgG4, 609-Fab-5E7-IgG4 y 5E7-Fab-609-IgG4.

40

Las Figs. 45A y 45B muestran los patrones de HPLC-IEC de 609-Fab-ipilimumab-IgG1 y 609-Fab-5E7-IgG4.

Las Figs. 46^a ~ 46D muestran los patrones de NR-CE-SDS^a y de R-CE-SDS de 609-Fab-ipilimumab-IgG1 y 609-Fab-5E7-IgG4.

45

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El método de expresión y de purificación de anticuerpos usado en los siguientes ejemplos se describe tal como sigue: se construyeron genes exógenos en el vector de expresión pcDNA3.4 (adquirido de Thermo Fisher Scientific), y la combinación de vectores de expresión se transfirió a células HEK293F (adquiridas de Thermo Fisher Scientific) mediante el método de transfección de PEI (polietilenimina) para expresar el anticuerpo, y entonces el anticuerpo se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

50

El método de detección ELISA usado en los siguientes ejemplos se describe tal como sigue: se recubrió una placa ELISA con proteínas recombinantes, respectivamente, y se bloqueó con PBST que contenía albúmina sérica bovina al 1% (PBST: tampón fosfato que contiene Tween-20 al 0,05%). El anticuerpo que debe someterse a prueba se diluyó en serie y entonces se transfirió a la placa anterior recubierta con proteína recombinante, se incubó a temperatura ambiente durante media hora y entonces se lavó la placa; se añadió un anticuerpo anti-humano de cabra etiquetado con HRP (peroxidasa del rábano) diluido de manera apropiada (específico de Fc o Fab, adquirido de Sigma), se incubó a temperatura ambiente durante media hora y entonces se lavó la placa; se añadieron 100 µl de disolución cromogénica con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) como sustrato a cada pocillo, se incubó a temperatura ambiente durante 1-5 min; se añadieron 50 µl de disolución de interrupción (H₂SO₄ 2 M) para interrumpir la reacción. Se leyó la DO450 con un lector de microplacas (SpectraMax 190), y se realizaron una representación gráfica y un análisis de datos usando GraphPad Prism6 y se calculó la CE50.

60

65

El método usado en los siguientes ejemplos para evaluar la capacidad para potenciar la reacción linfocítica mixta (MLR) se describe tal como sigue: se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre humana usando Histopaque (adquirido de Sigma) y se separaron los monocitos en las PBMC mediante un método de adherencia, y entonces se indujeron los monocitos con IL-4 (25 ng/ml) y GM-CSF (25 ng/ml) para su diferenciación a células dendríticas. Siete días más tarde, las células dendríticas inducidas anteriormente se digirieron y recogieron. Las PBMC se separaron de la sangre de otros donantes mediante el método anterior, y entonces se separaron las células T CD4⁺ de las PBMC con un imán MACS y microperlas CD4 (adquiridas de Miltenyibiotec). Las células dendríticas inducidas (10⁴/pocillo) y las células T CD4⁺ separadas (10⁵/pocillo) se mezclaron en proporción y entonces se inocularon en una placa de 96 pocillos, 150 µl por pocillo; unas pocas horas más tarde, se añadieron 50 µl de anticuerpo diluido en serie a la placa de 96 pocillos anterior; se incubó la placa de 96 pocillos en un incubador de células a 37°C durante 3 días. Durante el experimento anterior, se usó medio AIM-V (adquirido de Thermo Fisher Scientific) para cultivar las células. Entonces, se determinó la secreción de IL-2 e IFN-γ según procedimientos operativos estándar. Se determinaron IL-2 e IFN-γ usando ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo estándar (los anticuerpos emparejados para la detección relacionada se adquirieron de BD Biosciences). Se leyó la DO450 con un lector de microplacas (SpectraMax 190). Se realizó una representación gráfica mediante GraphPad Prism6 y se calculó la CE50.

Los métodos para detectar propiedades físicas y químicas usados en los siguientes ejemplos se describen tal como sigue:

HPLC-SEC

Los anticuerpos son proteínas de alto peso molecular con estructuras secundarias y terciarias altamente complejas. Debido a cambios tales como modificación, agregación y degradación postraduccionales, los anticuerpos son heterogéneos en sus propiedades bioquímicas y biofísicas. Se observan comúnmente variantes, agregados y fragmentos degradados cuando se analizan anticuerpos biespecíficos mediante técnicas de separación, y su presencia puede comprometer la seguridad y la eficacia. Agregados, fragmentos degradados y moléculas ensambladas de manera incompleta tienden a aparecer durante la producción y el almacenamiento de un anticuerpo. En la presente invención, se usó cromatografía de líquidos de alto rendimiento – cromatografía por exclusión de tamaño (HPLC-SEC) para detectar el contenido de las impurezas anteriores en una muestra. El peso molecular del agregado es mayor que el del monómero, así que el tiempo de retención del pico correspondiente es más corto; el peso molecular del fragmento degradado o de la molécula ensamblada de manera incompleta es menor que el del monómero, así que el tiempo de retención del pico correspondiente es más largo. Cromatógrafo usado para HPLC-SEC: Dionex Ultimate 3000; el método para la preparación de la fase móvil es tal como sigue: se ajusta una cantidad apropiada de licor madre de dihidrogenofosfato de sodio 20 mM con dihidrogenofosfato de sodio 20 mM a un pH de 6,8 ± 0,1; volumen de inyección: 20 µg; columna cromatográfica: TSK G3000SWXL, especificación: 7,8×300 mm 5 µm; tasa de flujo: 0,5 ml/min, tiempo de elución: 30 min; temperatura de la columna: 25°C, temperatura ambiente de la muestra: 10°C; longitud de onda de detección: 214 nm.

HPLC-IEC

Muchas modificaciones postraduccionales (tales como N-glicosilación, modificación de residuo lisina C-terminal, ciclización de glutamina o glutamato N-terminal, desamidación de asparagina, isomerización de ácido aspártico, oxidación de residuo de aminoácido, etc.) cambiarán directa o indirectamente la carga superficial del anticuerpo, conduciendo a la generación de heterogeneidad de carga. Las variantes de carga puede separarse y analizarse en base a la carga. Los métodos de análisis usados comúnmente incluyen cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y cromatografía de intercambio aniónico (AEX). Cuando se analizan mediante un método basado en cromatografía, las especies ácidas y las especies básicas se definen en base a su tiempo de retención en relación con el pico principal. Las especies ácidas son las variantes que se eluyeron antes que el pico principal de CEX o después que el pico principal de AEX, mientras que las especies básicas son las variantes que se eluyeron después que el pico principal de CEX o antes que el pico principal de AEX. Los picos correspondientes a las especies ácidas y las especies básicas se denominan picos ácidos y picos básicos, respectivamente. Las variantes de carga se generan fácilmente durante la producción y el almacenamiento de anticuerpos. En este caso, se usó cromatografía de líquidos de alto rendimiento-cromatografía de intercambio iónico (HPLC-IEC) para analizar la heterogeneidad de carga de las muestras. El cromatógrafo usado en HPLC-IEC fue Dionex Ultimate 3000; fase móvil A: PB 20 mM pH 6,3, fase móvil B: PB 20 mM + NaCl 200 mM pH 6,3, la relación de mezclado de las dos fases móviles cambió con el tiempo según el programa prefijado, tasa de flujo 1,0 ml/min; columna cromatográfica: Thermo Propac™ WCX-10; temperatura de la columna: 30°C, temperatura ambiente de la muestra: 10°C; volumen de inyección: 20 µg; longitud de onda de detección: 214 nm.

CE-SDS

En la presente invención, se usó CE-SDS (electroforesis capilar-dodecilsulfato de sodio) para analizar el contenido de fragmentos degradados o moléculas ensambladas de manera incompleta en la muestra. CE se divide en dos tipos: no reducido y reducido; para el primero, cuando la muestra está desnaturalizada, no es necesario el agente reductor DTT para destruir el enlace disulfuro en la molécula; para el último, cuando la muestra está desnaturalizada, se necesita el agente reductor DTT para destruir el enlace disulfuro en la molécula. La CE-SDS no reducida y reducida se denominan NR-CE-SDS y R-CE-SDS, respectivamente. El instrumento de electroforesis capilar usado fue ProteomeLab™ PA800 plus (Beckman Coulter), equipado con un detector UV 214 nm, modelo de capilar: capilar de sílice fusionada desnuda, especificación: 30,7 cm×50 µm, longitud efectiva: 20,5 cm; otros agentes relacionados se adquirieron de Beckman Coulter.

ES 2 974 323 T3

Los parámetros clave del instrumento se fijaron tal como sigue: temperatura de capilar y de cámara de muestra: 20±2°C, voltaje de separación: 15 kV.

DSC

5

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) refleja la estabilidad térmica de la muestra detectando principalmente el cambio de calor en biomoléculas en un proceso de calentamiento o de enfriamiento controlado. Mediante el calentamiento, el despliegue de la muestra de proteína absorberá calor, y la energía suplementaria requerida para eliminar la diferencia de temperatura en el conjunto de muestra se registrará mediante el dispositivo. Estos cambios de calor formarán una forma de pico en el espectro. La temperatura superior pico correspondiente al despliegue de la muestra de proteína se toma como la temperatura de fusión Tf. Tf es un indicador importante de la estabilidad térmica de la proteína. Cuanto mayor sea la Tf, mejor será la estabilidad de la proteína.

10

La información de secuencia implicada en la presente invención se resume en la tabla 1.

15

Tabla 1. Información de secuencia de los anticuerpos de la presente invención

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de bevacizumab (601)
2	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de bevacizumab (601)
3	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo murino n.º 20
4	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo murino n.º 20
5	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR1 de anticuerpo murino n.º 20
6	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR2 de anticuerpo murino n.º 20
7	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR3 de anticuerpo murino n.º 20
8	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR1 de anticuerpo murino n.º 20
9	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR2 de anticuerpo murino n.º 20
10	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR3 de anticuerpo murino n.º 20
11	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de 20-Hu
12	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de 20-Hu
13	Secuencia de aminoácidos de 601-LC-V94L
14	Secuencia de nucleótidos de 601-LC-V94L
15	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de 601-LC-V94L
16	Secuencia de aminoácidos de 20-Fab-601-IgG4
17	Secuencia de nucleótidos de 20-Fab-601-IgG4
18	Secuencia de aminoácidos de 601-Fab-20-IgG4
19	Secuencia de nucleótidos de 601-Fab-20-IgG4
20	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de Y0313-1
21	Secuencia de aminoácidos de 20-Fab-0313-IgG4
22	Secuencia de nucleótidos de 20-Fab-0313-IgG4
23	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR1 de anticuerpo murino n.º 1D11
24	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR2 de anticuerpo murino n.º 1D11
25	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR3 de anticuerpo murino n.º 1D11
26	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR1 de anticuerpo murino n.º 1D11
27	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR2 de anticuerpo murino n.º 1D11
28	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR3 de anticuerpo murino n.º 1D11
29	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de 1D11-Hu
30	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de 1D11-Hu
31	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de Acm127
32	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de Acm127
33	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo murino n.º 14
34	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo murino n.º 14

ES 2 974 323 T3

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia
35	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR1 de anticuerpo murino n.º 14
36	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR2 de anticuerpo murino n.º 14
37	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR3 de anticuerpo murino n.º 14
38	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR1 de anticuerpo murino n.º 14
39	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR2 de anticuerpo murino n.º 14
40	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR3 de anticuerpo murino n.º 14
41	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de 14-Hu
42	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de 14-Hu
43	Secuencia de aminoácidos de 14-Hu-LC
44	Secuencia de nucleótidos de 14-Hu-LC
45	Secuencia de aminoácidos de 14-Fab-1D11-IgG4
46	Secuencia de nucleótidos de 14-Fab-1D11-IgG4
47	Secuencia de aminoácidos de 1D11-Fab-14-IgG4
48	Secuencia de nucleótidos de 1D11-Fab-14-IgG4
49	Secuencia de aminoácidos de 14-Fab-127-IgG4
50	Secuencia de nucleótidos de 14-Fab-127-IgG4
51	Secuencia de aminoácidos de 127-Fab-14-IgG4
52	Secuencia de nucleótidos de 127-Fab-14-IgG4
53	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de 19H6-Hu
54	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de 19H6-Hu
55	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR1 de anti-CD47B
56	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR2 de anti-CD47B
57	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR3 de anti-CD47B
58	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR1 de anti-CD47B
59	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR2 de anti-CD47B
60	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR3 de anti-CD47B
61	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anti-CD47B-Hu
62	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anti-CD47B-Hu
63	Secuencia de aminoácidos de 19H6-Hu-LC
64	Secuencia de nucleótidos de 19H6-Hu-LC
65	Secuencia de aminoácidos de CD47B-Fab-19H6-IgG1
66	Secuencia de nucleótidos de CD47B-Fab-19H6-IgG1
67	Secuencia de aminoácidos de 19H6-Fab-CD47B-IgG1
68	Secuencia de nucleótidos de 19H6-Fab-CD47B-IgG1
69	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo murino n.º 94
70	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo murino n.º 94
71	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR1 de anticuerpo murino n.º 94
72	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR2 de anticuerpo murino n.º 94
73	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR3 de anticuerpo murino n.º 94
74	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR1 de anticuerpo murino n.º 94
75	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR2 de anticuerpo murino n.º 94

ES 2 974 323 T3

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia
76	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR3 de anticuerpo murino n.º 94
77	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de 94-Hu
78	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de 94-Hu
79	Secuencia de aminoácidos de 94-Fab-19H6-IgG1-LALA
80	Secuencia de nucleótidos de 94-Fab-19H6-IgG1-LALA
81	Secuencia de aminoácidos de 19H6-Fab-94-IgG1-LALA
82	Secuencia de nucleótidos de 19H6-Fab-94-IgG1-LALA
83	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de Acm1-25-Hu (609)
84	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de Acm1-25-Hu (609)
85	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR1 de anti-CD137
86	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR2 de anti-CD137
87	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR3 de anti-CD137
88	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR1 de anti-CD137
89	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR2 de anti-CD137
90	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR3 de anti-CD137
91	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anti-CD137-Hu
92	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anti-CD137-Hu
93	Secuencia de aminoácidos de anti-CD137-Hu-LC
94	Secuencia de nucleótidos de anti-CD137-Hu-LC
95	Secuencia de aminoácidos de 609-Fab-137-IgG4
96	Secuencia de nucleótidos de 609-Fab-137-IgG4
97	Secuencia de aminoácidos de 137-Fab-609-IgG4
98	Secuencia de nucleótidos de 137-Fab-609-IgG4
99	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR1 de anti-CD40
100	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR2 de anti-CD40
101	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena pesada H-CDR3 de anti-CD40
102	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR1 de anti-CD40
103	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR2 de anti-CD40
104	Secuencia de aminoácidos de región determinante de complementariedad de cadena ligera L-CDR3 de anti-CD40
105	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anti-CD40-Hu
106	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anti-CD40-Hu
107	Secuencia de aminoácidos de anti-CD40-Hu-LC
108	Secuencia de nucleótidos de anti-CD40-Hu-LC
109	Secuencia de aminoácidos de 609-Fab-40-IgG4
110	Secuencia de nucleótidos de 609-Fab-40-IgG4
111	Secuencia de aminoácidos de 40-Fab-609-IgG4
112	Secuencia de nucleótidos de 40-Fab-609-IgG4
113	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de cetuximab
114	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de cetuximab
115	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de trastuzumab
116	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de trastuzumab
117	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de pertuzumab
118	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de pertuzumab
119	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de 10D1 (ipilimumab)
120	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de 10D1 (ipilimumab)
121	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de 5E7-Hu
122	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de 5E7-Hu
123	Secuencia de aminoácidos de cetuximab-LC
124	Secuencia de nucleótidos de cetuximab-LC

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia
125	Secuencia de aminoácidos de pertuzumab-LC
126	Secuencia de nucleótidos de pertuzumab-LC
127	Secuencia de aminoácidos de ipilimumab-LC
128	Secuencia de nucleótidos de ipilimumab-LC
129	Secuencia de aminoácidos de 5E7-Hu-LC
130	Secuencia de nucleótidos de 5E7-Hu-LC
131	Secuencia de aminoácidos de 609-Fab-cetuximab-IgG4
132	Secuencia de nucleótidos de 609-Fab-cetuximab-IgG4
133	Secuencia de aminoácidos de 609-Fab-pertuzumab-IgG4
134	Secuencia de nucleótidos de 609-Fab-pertuzumab-IgG4
135	Secuencia de aminoácidos de 609-Fab-ipilimumab-IgG1
136	Secuencia de nucleótidos de 609-Fab-ipilimumab-IgG1
137	Secuencia de aminoácidos de ipilimumab-Fab-609-IgG1
138	Secuencia de nucleótidos de ipilimumab-Fab-609-IgG1
139	Secuencia de aminoácidos de 609-Fab-ipilimumab-IgG4
140	Secuencia de nucleótidos de 609-Fab-ipilimumab-IgG4
141	Secuencia de aminoácidos de ipilimumab-Fab-609-IgG4
142	Secuencia de nucleótidos de ipilimumab-Fab-609-IgG4
143	Secuencia de aminoácidos de 609-Fab-5E7-IgG4
144	Secuencia de nucleótidos de 609-Fab-5E7-IgG4
145	Secuencia de aminoácidos de 5E7-Fab-609-IgG4
146	Secuencia de nucleótidos de 5E7-Fab-609-IgG4
147	Secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada de IgG1
148	Secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada de IgG4 (S228P)
149	Secuencia de aminoácidos de región constante de cadena ligera kappa
150	Ligador (GGGGSGGGGSGGGGS)
151	La cuarta región de entramado de cadena pesada (WGQGLTVVSS)
152	La cuarta región de entramado de cadena ligera (FGQGTKVEIK)
153	La cuarta región de entramado de cadena ligera (FGGKTKVELK)

Los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales se usan para ilustrar adicionalmente la presente invención y no deben interpretarse como que limitan la presente invención. Los ejemplos no incluyen una descripción detallada de métodos tradicionales, tales como los métodos de construcción de vectores de expresión y plásmidos, métodos de inserción de genes que codifican proteínas en tales vectores y plásmidos, o métodos de transfección de plásmidos en células huésped. Tales métodos se conocen ampliamente por los expertos habituales en la técnica y se describen en muchas publicaciones, incluyendo Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

10 Ejemplo 1 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y VEGF

Ejemplo 1.1 Secuencias

Las secuencias de anticuerpo de región variable de cadena pesada y de región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 1 y 2) de bevacizumab (denominadas a continuación en el presente documento 601) se obtuvieron de la bibliografía disponible públicamente (Magdelaine-Beuzelin C, Kaas Q, Wehbi V, *et al.* Structure-function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment[J]. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2007, 64(3): 210-225). Los ADN que codifican las regiones variables anteriores se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada (601-VH) y la región variable de cadena ligera (601-VL) de 601 se conectaron a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 147) y la región constante de cadena ligera kappa humana (SEQ ID NO: 149), respectivamente, para construir genes de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 601, que se denominaron 601-HC y 601-LC, respectivamente.

Según los ejemplos 1-5 en el documento WO2018/137576A1, basándose en los resultados de selección, el anticuerpo monoclonal anti-PD-1 humano murino n.º 20 se seleccionó finalmente como anticuerpo líder, y se obtuvieron la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera y se tradujeron a secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 3 y 4).

Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo n.º 20 se analizaron, según el esquema de Kabat, y se determinaron las regiones determinantes de complementariedad de antígeno y las regiones de entramado de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo n.º 20. El anticuerpo n.º 20 comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de H-CDR1: NYDMS (SEQ ID NO: 5), H-CDR2: TISGGGGYTYSDSVKG (SEQ ID NO: 6) y H-CDR3: PYGHYGFY (SEQ ID NO: 7), y las secuencias de aminoácidos

de las CDR de cadena ligera de L-CDR1: SASQGISNFLS (SEQ ID NO: 8), L-CDR2: YTSSLHS (SEQ ID NO: 9) y L-CDR3: QQYSNLPWT (SEQ ID NO: 10).

5 La comparación de homología de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino n.º 20 con la secuencia de línea germinal de IgG humana se realizó en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. Se seleccionó IGHV3-21*01 como molde de injerto de CDR de cadena pesada, las CDR de cadena pesada del anticuerpo murino n.º 20 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGHV3-21*01, y se añadió WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 151) tras la H-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena pesada injertada por CDR. De manera similar, se realizó la comparación de homología de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino n.º 20 con la secuencia de línea germinal de IgG humana. Se seleccionó IGKV1-39*01 como molde de injerto de CDR de cadena ligera, las CDR de cadena ligera del anticuerpo murino n.º 20 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGKV1-39*01, y se añadió FGQGTVKVEIK (SEQ ID NO: 152) tras la L-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena ligera injertada por CDR. Basándose en las regiones variables injertadas por CDR, algunos sitios de aminoácido en las regiones de entramado se sometieron a retromutación (la retromutación es mutar ciertos aminoácidos en regiones de entramado humanas en los aminoácidos en la misma posición en la región de entramado murina. El sitio de retromutación es generalmente crítico para mantener la estructura y/o afinidad del anticuerpo). Cuando se realizó retromutación, la secuencia de aminoácidos se numeró según Kabat y la posición de cada sitio se indicó mediante numeración de Kabat.

20 Preferiblemente, para la región variable de cadena pesada injertada por CDR, según la numeración de Kabat, T en la posición 28 se retromutó a V murina, G en la posición 44 se retromutó a R, y R en la posición 94 se retromutó a S. Para la región variable de cadena ligera injertada por CDR, A en la posición 43 se retromutó a T, P en la posición 44 se retromutó a V, y F en la posición 71 se retromutó a Y

25 La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera anteriores con sitios de retromutación se definieron como región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera humanizadas (SEQ ID NO: 11 y 12), respectivamente. Los ADN que codifican las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera humanizadas se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de IgG4 humana (con la mutación S228P en la región bisagra) (SEQ ID NO: 148) para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado 20-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado 20-Hu-LC.

35 Los genes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anterior se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, y los vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera resultantes se transfirieron a células HEK293F mediante el método de transfección de PEI para expresar el anticuerpo. Tras cultivar las células HEK293F en medio de expresión Free Style 293 durante 5 días, se recogió el sobrenadante celular y se purificó el anticuerpo mediante cromatografía de afinidad de proteína A. El anticuerpo obtenido mediante la combinación de 20-Hu-HC y 20-Hu-LC se denominó 20-Hu.

40 **Ejemplo 1.2 Selección de cadena ligera común**

Se usó BLAST para comparar y analizar las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 20-Hu y la región variable de cadena ligera de 601. Los resultados mostraron que, entre ellas, los aminoácidos idénticos representaban el 89% (identidades) y los aminoácidos con propiedades similares representaban el 94% (positivos).

50 Las secuencias génicas de 601-HC y 601-LC se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente. Los vectores de expresión de 20-Hu-HC, 20-Hu-LC, 601-HC y 601-LC se combinaron de la siguiente manera: 20-Hu-HC+20-Hu-LC, 601-HC+601-LC, 20-Hu-HC+601-LC y 601-HC+20-Hu-LC, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 20-Hu, 601, 20-Hu-HC+601-LC y 601-HC+20-Hu-LC, respectivamente.

55 El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína de dominio extracelular de PD-1 humano con una etiqueta 6*His se preparó por los inventores (la fuente del dominio extracelular de PD-1 se describe en el documento WO2018/137576A1), y esta proteína recombinante se denominó PD1-His. VEGF165 humano con una etiqueta 6*His (secuencia de NCBI, registro: AAM03108), y esta proteína recombinante se denominó VEGF165-His. Una placa ELISA se recubrió con PD1-His y VEGF165-His, con una concentración de recubrimiento de 20 ng/pocillo y 10 ng/pocillo, respectivamente.

60 Como se muestra en la Fig. 2A, 20-Hu y 20-Hu-HC+601-LC pueden unirse de manera efectiva a PD1-His, con CE50 de 0,2062 nM y 0,9747 nM, respectivamente; mientras que 601 y 601-HC+20-Hu-LC no pueden unirse de manera efectiva a PD1-His, las CE50 no pueden calcularse de manera precisa. Como se muestra en la Fig. 2B, 601 y 601-HC+20-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a VEGF165-His, con CE50 de 0,4681 nM y 8,217 nM, respectivamente; mientras que 20-Hu y 20-Hu-HC+601-LC no pueden unirse de manera efectiva a VEGF165-His.

65 En comparación con 20-Hu, la afinidad relativa de 20-Hu-HC+601-LC con respecto a PD1-His disminuyó significativamente; en comparación con 601, la afinidad relativa de 601-HC+20-Hu-LC con respecto a VEGF165-His

también disminuyó significativamente. En este caso intentamos usar retromutación para aumentar la afinidad relativa de 20-Hu-HC+601-LC con respecto a PD1-His. Se encontró mediante análisis que había 12 diferencias de residuo de aminoácido entre la región variable de cadena ligera de 601 y la región variable de cadena ligera de 20-Hu, entre las que los residuos de aminoácido en las posiciones 28, 32, 34, 46, 50, 71, 93 y 94 (según el esquema de numeración de Kabat) pueden ser críticos para mantener la afinidad del anticuerpo. En este caso, mediante mutagénesis dirigida al sitio, los residuos de aminoácido en las posiciones anteriores de 601-LC se mutaron en residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes de 20-Hu-LC, y estas 601-LC con mutaciones puntuales se denominaron 601-LC-D28G, 601-LC-Y32F, 601-LC-N34S, 601-LC-V46L, 601-LC-F50Y, 601-LC-F71Y, 601-LC-T93N y 601-LC-V94L, respectivamente.

Las secuencias génicas de las cadenas ligeras anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente. Se combinó 20-Hu-HC con el vector de expresión anterior de 601-LC con mutaciones puntuales, respectivamente, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 20-Hu-HC+601-LC-D28G, 20-Hu-HC+601-LC-Y32F, 20-Hu-HC+601-LC-N34S, 20-Hu-HC+601-LC-V46L, 20-Hu-HC+601-LC-F50Y, 20-Hu-HC+601-LC-F71Y, 20-Hu-HC+601-LC-T93N y 20-Hu-HC+601-LC-V94L, respectivamente. El ELISA descrito en el ejemplo anterior se usó para evaluar la afinidad relativa de los anticuerpos anteriores para unirse a PD-1, y se usó 20-Hu-HC+601-LC como referencia. Los resultados de ELISA mostraron que las CE50 de los anticuerpos mutantes anteriores y 20-Hu-HC+601-LC eran 0,4849 nM, 0,4561 nM, 0,1751 nM, 0,5333 nM, 0,5255 nM, 1,0345 nM, 0,4859 nM, 0,3079 nM y 0,6251 nM, respectivamente; en comparación con 20-Hu-HC+601-LC, 20-Hu-HC+601-LC-N34S y 20-Hu-HC+601-LC-V94L tenían una afinidad relativa significativamente mayor con respecto a PD-1; otros anticuerpos mutantes tenían básicamente la misma afinidad relativa o una incluso menor que 20-Hu-HC+601-LC.

Se combinó 601-HC con el vector de expresión anterior de 601-LC con mutaciones puntuales y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 601-HC+601-LC-D28G, 601-HC+601-LC-Y32F, 601-HC+601-LC-N34S, 601-HC+601-LC-V46L, 601-HC+601-LC-F50Y, 601-HC+601-LC-F71Y, 601-HC+601-LC-T93N, 601-HC+601-LC-V94L, respectivamente. El ELISA descrito en el ejemplo anterior se usó para evaluar la afinidad relativa de los anticuerpos anteriores para unirse a VEGF165, y se usó 601 como referencia. Los resultados de ELISA mostraron que las CE50 de los anticuerpos mutantes anteriores y 601 eran 0,1328 nM, 0,1254 nM, 0,2081 nM, 0,3256 nM, 0,1400 nM, 0,1481 nM, 0,1259 nM, 0,1243 nM y 0,1291 nM, respectivamente; en comparación con 601, 601-HC+601-LC-N34S y 601-HC+601-LC-V46L tenían una afinidad relativa significativamente menor con respecto a VEGF165; otros anticuerpos mutantes tenían básicamente la misma afinidad relativa que 601.

En resumen, la mutación V94L puede potenciar la afinidad relativa de 20-Hu-HC+601-LC con respecto a PD-1 sin reducir la afinidad relativa de 601 con respecto a VEGF165. En este caso, se seleccionó 601-LC-V94L (SEQ ID NO: 13 y 14) como la cadena ligera común para construir un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 1.3 Construcción de anticuerpos biespecíficos

La región variable de cadena pesada de 20-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 601 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). El gen de cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construido mediante tales procedimientos se denominó 20-Fab-601-IgG4 (SEQ ID NO: 16 y 17). De manera similar, la región variable de cadena pesada de 601 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 20-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). El gen de cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construido mediante tales procedimientos se denominó 601-Fab-20-IgG4 (SEQ ID NO: 18 y 19).

Las secuencias anteriores se construyeron en un vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, los vectores de expresión 20-Fab-601-IgG4 y 601-Fab-20-IgG4 se combinaron con el vector de expresión 601-LC-V94L, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 20-Fab-601-IgG4-V94L y 601-Fab-20-IgG4-V94L, respectivamente.

Ejemplo 1.4 Determinación de la afinidad relativa mediante ELISA

Como se muestra en la Fig. 3A, 20-Hu-HC+601-LC-V94L, 20-Fab-601-IgG4-V94L y 601-Fab-20-IgG4-V94L pueden unirse de manera efectiva a PD1-His, con CE50 de 0,3314 nM, 0,4768 nM y 1,772 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 3B, 601-HC+601-LC-V94L, 20-Fab-601-IgG4-V94L y 601-Fab-20-IgG4-V94L pueden unirse de manera efectiva a VEGF165-His, con CE50 de 0,01872 nM, 0,05859 nM y 0,03886 nM, respectivamente. 20-Fab-601-IgG4-V94L y 601-Fab-20-IgG4-V94L pueden unirse tanto a PD-1 como a VEGF, lo que indica que son anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 1.5 Determinación de la afinidad mediante Biacore

En el presente documento, la afinidad de los anticuerpos anteriores con respecto a PD-1 o VEGF se determinó mediante Biacore 8K (GE healthcare). En Biacore 8K, el chip acoplado con proteína A/G se usó para capturar diversos anticuerpos,

respectivamente, y entonces se inyectó la proteína recombinante PD1-His o VEGF165-His para obtener la curva de unión-disociación, que se eluyó con tampón de regeneración de hidrocloreuro de guanidina 6 M para el siguiente ciclo. Los datos se analizaron usando el software de evaluación Biacore 8K. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2-1. Parámetro cinético de unión y de disociación y constante de disociación de equilibrio para PD-1

Nombre de la muestra	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
20-Hu-HC+601-LC-V94L	2,86E+04	4,54E-05	15,9E-10
20-Fab-601-IgG4-V94L	7,52E+04	6,66E-05	8,85E-10

Tabla 2-2. Parámetro cinético de unión y de disociación y constante de disociación de equilibrio para VEGF

Nombre de la muestra	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
601-HC+601-LC-V94L	3,90E+06	2,91E-05	7,46E-12
20-Fab-601-IgG4-V94L	1,81E+06	1,67E-05	9,26E-12

La tabla 2-1 mostró que 20-Hu-HC+601-LC-V94L y 20-Fab-601-IgG4-V94L tenían constantes de disociación de equilibrio (KD) muy similares para PD-1, con KD de 1,59E-09 y 8,85E-10, respectivamente. La tabla 2-2 mostró que 601-HC+601-LC-V94L y 20-Fab-601-IgG4-V94L tenían una constante de unión (Kon) y constante de disociación (Koff) muy similares para VEGF165-His, y tienen básicamente constantes de disociación de equilibrio (KD) equivalentes, con KD de 7,46E-12 y 9,26E-12, respectivamente. La constante de disociación de equilibrio (KD) era inversamente proporcional a la afinidad.

Ejemplo 1.6 Caracterización de propiedades fisicoquímicas

Ejemplo 1.6.1 HPLC-SEC

La Fig. 4A muestra el patrón de HPLC-SEC del anticuerpo monoclonal 601-HC+601-LC-V94L, en el que había dos picos obvios, pico 1 y pico 2, que representan el 0,7% y el 99,3%, respectivamente. Entre ellos, el tiempo de retención de pico 1 era más corto que el del pico principal pico 2, lo que indica que el pico 1 puede estar provocado por agregados; no había ningún pico que pudiera representar fragmentos degradados o moléculas ensambladas de manera incompleta en la figura. La Fig. 4B muestra el patrón de HPLC-SEC de 20-Fab-601-IgG4-V94L, en el que había dos picos obvios, pico 1 y pico 2, que representan el 0,7% y el 99,3%, respectivamente. Entre ellos, el tiempo de retención de Peak1 era más corto que el del pico principal pico 2, lo que indica que el pico 1 puede estar provocado por agregados; no había ningún pico que pudiera representar fragmentos degradados o moléculas ensambladas de manera incompleta en la figura.

Ejemplo 1.6.2 HPLC-IEC

Las Figs. 5A y 5B muestran los patrones de HPLC-IEC de 601-HC+601-LC-V94L y 20-Fab-601-IgG4-V94L. Sus picos principales representaban el 79,31% y el 80,64%, respectivamente. Los resultados indican que 20-Fab-601-IgG4-V94L tiene una heterogeneidad de carga comparable a la de 601-HC+601-LC-V94L.

Ejemplo 1.6.3 CE-SDS

Las Figs. 6A y 6B muestran los patrones de NR-CE-SDS y R-CE-SDS de 601-HC+601-LC-V94L, respectivamente. En el patrón de NR-CE-SDS, el pico principal pico 9 representaba el 97,90%; En el patrón de R-CE-SDS, los dos picos principales pico 6 (correspondiente a la cadena ligera) y pico 12 (correspondiente a la cadena pesada) representaban el 30,92% y el 65,27%, respectivamente, y la relación de las dos áreas de pico era 1:2,1. Las Figs. 6C y 6D muestran los patrones de NR-CE-SDS y R-CE-SDS de 20-Fab-601-IgG4-V94L, respectivamente. En el patrón de NR-CE-SDS, el pico principal pico 13 representaba el 96,74%; En el patrón de R-CE-SDS, los dos picos principales pico 3 (correspondiente a la cadena ligera) y pico 12 (correspondiente a la cadena pesada) representaban el 38,42% y el 59,74%, respectivamente, y la relación de las dos áreas de pico era 2:3,1. En NR-CE-SDS, las proporciones de los picos principales de 601-HC+601-LC-V94L y 20-Fab-601-IgG4-V94L eran muy similares; en R-CE-SDS, las relaciones de áreas de pico de cadena ligera y cadena pesada tanto de 601-HC+601-LC-V94L como de 20-Fab-601-IgG4-V94L eran consistentes con las expectativas.

Ejemplo 1.6.4 DSC

Las Figs. 7A y 7B muestran los patrones de DSC de 601-HC+601-LC-V94L y 20-Fab-601-IgG4-V94L, respectivamente. Entre ellos, la Tfinicio y la Tf de 601-HC+601-LC-V94L eran 66,46°C y 75,37°C, respectivamente, y la Tfinicio y la Tf de 20-Fab-601-IgG4-V94L eran 65,92°C y 74,28°C, respectivamente. Los resultados indican que 20-Fab-601-IgG4-V94L y 601-HC+601-LC-V94L tienen una estabilidad térmica muy similar.

Ejemplo 1.7 Construcción de anticuerpos biespecíficos mejorados**Ejemplo 1.7.1 Construcción de anticuerpos biespecíficos**

En la solicitud de patente estadounidense US20020032315A1, los inventores relacionados usan un método de presentación en fago para modificar la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de bevacizumab, y obtener la secuencia de aminoácidos Y0313-1 de región variable de cadena pesada con mayor afinidad y actividad neutralizante (SEQ ID NO: 114 en el documento US20020032315A1 es la misma que SEQ ID NO: 20 en la presente invención).

En el presente documento, la región variable de cadena pesada de 601 (bevacizumab) en 20-Fab-601-IgG4-V94L se reemplazó por Y0313-1. El método es tal como sigue: la región variable de cadena pesada de 20-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de Y0313-1 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). El gen de cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construido mediante tales procedimientos se denominó 20-Fab-0313-IgG4 (SEQ ID NO: 21 y 22).

Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, el vector de expresión 20-Fab-0313-IgG4 se combinó con el vector de expresión 601-LC-V94L, y se expresó y purificó al anticuerpo. El anticuerpo obtenido se denominó 20-Fab-0313-IgG4-V94L.

Ejemplo 1.7.2 Determinación de la capacidad para neutralizar la actividad biológica de VEGF

Se adquirieron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de AllCells Biotechnology Co., Ltd. Las HUVEC se cultivaron y se subcultivaron con medio completo para células endoteliales de vena umbilical (adquirido de AllCells, n.º de cat./especificación: H-004/500ml). Cuando las HUVEC crecieron hasta la fase de crecimiento logarítmica, las células se tripsinizaron para desprender las células. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron en el medio completo y entonces se inocularon en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a una densidad de 8000 células/pocillo; tras 24 horas, el medio completo en la placa de 96 pocillos se reemplazó por medio mínimo (adquirido de AllCells, n.º de cat./especificación: H-004B/500ml), 150 µl/pocillo; el anticuerpo se diluyó en serie en el medio mínimo que contenía 400 ng/ml de VEGF165 recombinante (adquirido de Acrobiosystems, n.º de cat.: VE5-H4210), y entonces la disolución mixta de VEGF165 y el anticuerpo se añadió a una placa de 96 pocillos, 50 µl/pocillo; se incubó durante 3 días en un incubador de 37°C, de célula de CO₂ al 5%; y entonces se añadieron 20 µl de disolución de CCK-8 (Dojindo) a cada pocillo y se incubó durante otras 4 horas en el incubador; se leyó la DO450 con un lector de microplacas. Se realizaron una representación gráfica y un análisis de datos usando GraphPad Prism6 y se calculó la CI50.

Como se muestra en la Fig. 8, 601, 20-Fab-601-IgG4-V94L, 601-Fab-20-IgG4-V94L y 20-Fab-0313-IgG4-V94L pueden inhibir de manera efectiva la proliferación celular de HUVEC inducida mediante VEGF165, con CI50 de 4,422 nM, 9,039 nM, 3,84 nM y 1,632 nM, respectivamente. Los resultados anteriores indican que 20-Fab-0313-IgG4-V94L tiene la capacidad más fuerte para neutralizar la actividad biológica de VEGF 165.

Ejemplo 1.7.3 Evaluación de la actividad funcional para potenciar la MLR

Como se muestra en las Figs. 9A y 9B, 20-humanizado (es decir, 20-Hu), 20-Hu-HC+601-LC-V94L y 20-Fab-0313-IgG4-V94L pueden estimular de manera efectiva MLR para secretar IL-2 e IFN-γ. Para estimular MLR para secretar IL-2, las CE50 eran 0,2571 nM, 0,3703 nM y 0,7554 nM, respectivamente, y para estimular MLR para secretar IFN-γ, las CE50 eran 0,1426 nM, 0,247 nM y 1,036 nM, respectivamente.

Ejemplo 1.7.4 Determinación de la capacidad de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y VEGF para unirse simultáneamente a dos antígenos

La microplaca se recubrió con VEGF165 (adquirido de Acrobiosystems, n.º de cat.: VE5-H4210). El anticuerpo que debe someterse a prueba se diluyó en serie con PBST que contiene albúmina sérica bovina al 1%, entonces se transfirió a la placa anterior y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora; la placa se lavó tres veces con PBST; se diluyó proteína recombinante extracelular de PD-1 humano biotinilada (adquirida de Sino Biological, n.º de cat.: 10377-H08H-B) hasta 200 ng/ml, se transfirió a la placa de microtitulación y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora; la placa se lavó tres veces con PBST; se diluyó estreptavidina-HRP (adquirida de BD Biosciences, n.º de cat.: 554066) 1000 veces, se transfirió a la placa de microtitulación, se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora; la placa se lavó tres veces con PBST; se añadió disolución cromogénica de TMB (100 µl/pocillo) y se incubó a temperatura ambiente durante 1-5 min; se añadió disolución de interrupción (50 µl/pocillo) para interrumpir la reacción cromogénica. Se leyó la DO450 con un lector de microplacas. Se realizaron una representación gráfica y un análisis de datos usando GraphPad Prism6 y se calculó la CE50.

Como se muestra en la Fig. 10, 20-Fab-0313-IgG4-V94L puede unirse de manera adicionalmente efectiva a PD-1 humano tras unirse a VEGF165, con una CE50 de 0,3293 nM. Ni 601 ni 20-Hu-HC+601-LC-V94L pueden unirse simultáneamente a PD-1 y VEGF165.

Ejemplo 1.7.5 Determinación de farmacocinéticas de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y VEGF en ratas

Se usaron ratas SD (Sprague-Dawley) (adquiridas de Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd) para estudiar las farmacocinéticas de los anticuerpos biespecíficos. Había cuatro ratas en cada grupo, que pesaban aproximadamente 200 g. A cada rata se le administró una dosis de 1 mg de anticuerpo mediante inyección intravenosa (I.V); se extrajo sangre de la órbita en un momento específico tras la administración y se recogió el suero mediante centrifugación tras coagularse de manera natural la sangre.

El método para medir la concentración del anticuerpo diana en el suero es tal como sigue: se recubrió una placa ELISA con los dos antígenos relacionados correspondientes al anticuerpo biespecífico (VEGF165, adquirido de Acrobiosystems, n.º de cat.: VE5-H4210; la fuente de proteína recombinante del dominio extracelular de PD-1 humano con 6*His tag es tal como se describe en el ejemplo 1.2), respectivamente, y entonces se bloquearon con PBST que contiene albúmina sérica bovina al 1%. Un suero de rata diluido de manera apropiada se transfirió a la placa anterior recubierta con los antígenos relacionados, se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavó la placa, y entonces se añadió anticuerpo (específico de Fc) anti-humano de cabra etiquetado con HRP (adquirido de Sigma; este anticuerpo se ha tratado con adsorción cruzada de especies y no reconoce anticuerpos de rata), se incubó a temperatura ambiente durante media hora y se lavó la placa; se añadió disolución cromogénica con TMB como sustrato a 100 µl/pocillo, se incubó a temperatura ambiente durante 1-5 min; se añadieron 50 µl de disolución de interrupción (H₂SO₄ 2 M) para interrumpir la reacción. Se leyó la DO450 con un lector de microplacas y se convirtió la DO450 en concentración sérica de anticuerpo usando una curva estándar. Se realizaron una representación gráfica y un análisis de datos usando GraphPad Prism6. La semivida del anticuerpo en ratas se calculó usando el software Phoenix.

Como se muestra en la Fig. 11, la semivida de 20-Fab-0313-IgG4-V94L se calculó que era de 16,9 días (resultado de detección con PD-1 como antígeno) y de 17,3 días (resultado de detección con VEGF165 como antígeno). Los resultados anteriores indican que 20-Fab-0313-IgG4-V94L tiene buenas propiedades farmacocinéticas.

Ejemplo 1.7.6 Efecto antitumoral de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y VEGF en ratones

Se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas para reconstruir el sistema inmune humano en ratones NSG y establecer un modelo de xenoinjerto subcutáneo NCI-H460 de cáncer de pulmón humano en los ratones. El modelo de ratón tenía tanto células T que expresan PD-1 humano como células tumorales humanas que expresan VEGF humano, así que puede usarse para evaluar la actividad antitumoral del anticuerpo biespecífico frente a PD-1 y VEGF *in vivo*. Las etapas de implementación específicas son tal como sigue: se recogieron células NCI-H460 de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano (ATCC®HTB-177™) cultivadas *in vitro*, se ajustó la suspensión celular a una concentración de 1 × 10⁶/ml y entonces se mezcló con Matrigel (adquirido de BD Biosciences, n.º de cat.: 356234) en un volumen igual. Las PBMC adquiridas (adquiridas de Allcells, n.º de cat.: PB005-C) se resucitaron *in vitro* y las PBMC se resuspendieron en PBS, y la suspensión de PBMC se ajustó a una concentración de 1 × 10⁷/ml. La suspensión de células tumorales mixtas y la suspensión de PBMC se mezclaron en un volumen igual. En condiciones estériles, se inocularon 200 µl de la suspensión celular mixta por vía subcutánea en la parte superior derecha del lomo de ratones M-NSG (adquiridos de Shanghai Model Organisms Center, Inc.). El mismo día, los ratones inoculados con las células mixtas se dividieron aleatoriamente en grupos según su peso corporal, con 10 ratones en cada grupo. El tratamiento farmacológico de ratones en cada grupo es tal como sigue: grupo control, inyectado solo con solución salina normal; grupo de Avastin, inyectado con 10 mg/kg de anticuerpo control positivo anti-VEGF Avastin (producido por Roche Pharmaceuticals); grupo de Opdivo, inyectado con 10 mg/kg de anticuerpo control positivo anti-PD-1 Opdivo (producido por Bristol-Myers Squibb); grupo de 20-Fab-0313-IgG4-V94L, inyectado con 16 mg/kg de 20-Fab-0313-IgG4-V94L. Teniendo en cuenta la diferencia en el peso molecular entre anticuerpos biespecíficos y anticuerpos monoclonales, la dosis del fármaco en este experimento se proporcionó según la regla de cantidad igual de sustancia. Posteriormente, los fármacos se administraron según el régimen diseñado anteriormente, dos veces a la semana durante un total de 10 veces, y los volúmenes tumorales se midieron dos veces a la semana. Finalmente, la curva de crecimiento de tumor de cada grupo determinada a lo largo del tiempo se muestra en la Fig. 12.

Los resultados mostraron que al final del experimento el 31^{er} día, las tasas de inhibición tumoral de Avastin, Opdivo y 20-Fab-0313-IgG4-V94L eran del 84,5%, del 35,8% y del 96,6%, respectivamente (tasa de inhibición tumoral = (volumen medio del grupo control - volumen medio del grupo experimental) / volumen medio del grupo control × 100%). En comparación con Avastin y Opdivo, 20-Fab-0313-IgG4-V94L puede inhibir el crecimiento tumoral de manera más efectiva.

Ejemplo 2 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y TGF-beta**Ejemplo 2.1 Secuencias**

El documento US5571714A da a conocer una serie de anticuerpos monoclonales anti-TGF-β (factor de crecimiento transformante beta), en los que el anticuerpo monoclonal murino 1D11.16 (denominado a continuación en el presente documento 1D11) puede unirse de manera efectiva a TGF-β1 y -β2. El hibridoma correspondiente a 1D11 se ha depositado en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC® HB-9849™) por los inventores. La secuencia de ID11 murina se obtuvo del documento US20180244763A1.

Se analizaron las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo n.º 1D11 y se determinaron las regiones determinantes de complementariedad de antígeno y las regiones

de entramado de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo n.º ID11 según el esquema de Kabat. El anticuerpo n.º 1D11 comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de H-CDR1: TYWMN (SEQ ID NO: 23), H-CDR2: QIFPASGSTNYNEMFEG (SEQ ID NO: 24) y H-CDR3: GDGNYALDAMDY (SEQ ID NO: 25), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de L-CDR1: RASESVDSYGNSFMH (SEQ ID NO: 26), L-CDR2: LASNLES (SEQ ID NO: 27) y L-CDR3: QQNNEDPLT (SEQ ID NO: 28).

La comparación de homología de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino n.º 1D11 con la secuencia de línea germinal de IgG humana se realizó en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. Se seleccionó IGHV1-46*01 como molde de injerto de CDR de cadena pesada, las CDR de cadena pesada del anticuerpo murino n.º 1D11 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGHV1-46*01 y se añadió WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 151) tras la H-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena pesada injertada por CDR. De manera similar, se realizó la comparación de homología de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino n.º 1D11 con la secuencia de línea germinal de IgG humana. Se seleccionó IGKV7-3*01 como molde de injerto de CDR de cadena ligera, las CDR de cadena ligera del anticuerpo murino n.º 1D11 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGKV7-3*01 y se añadió FGGGTVKVELK (SEQ ID NO: 153) tras la L-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena ligera injertada por CDR. Basándose en la regiones variables injertadas por CDR, algunos sitios de aminoácido en la región de entramado se sometieron a retromutación. Cuando se realizó retromutación, la secuencia de aminoácidos se numeró según Kabat y la posición de cada sitio se indicó mediante numeración de Kabat.

Preferiblemente, para la región variable de cadena pesada injertada por CDR, T en la posición 28 se retromutó a I murina, T en la posición 30 se retromutó a I, y M en la posición 48 se retromutó a I, V en la posición 67 se retromutó a A, M en la posición 69 se retromutó a L, R en la posición 71 se retromutó a V, V en la posición 78 se retromutó a A. Para la región variable de cadena ligera injertada por CDR, N en la posición 81 se retromutó a D.

Los ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas anteriores (SEQ ID NO: 29 y 30) se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (con la mutación S228P en la región bisagra) (SEQ ID NO: 148) para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado 1D11-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena ligera kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado 1D11-Hu-LC.

Los genes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anterior se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, y se expresó y purificó al anticuerpo. El anticuerpo obtenido de la combinación de 1D11-Hu-HC y 1D11-Hu-LC se denominó 1D11-Hu.

El documento US20100136021A1 da a conocer también una serie de anticuerpos anti-TGF- β , en los que el anticuerpo monoclonal Acm12.7 (denominado a continuación en el presente documento Acm127) puede unirse de manera efectiva a y neutralizar TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Las secuencias de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de Acm127 se obtuvieron del documento US20100136021A1 (SEQ ID NO: 31 y 32).

Los ADN que codifican las regiones variables anteriores se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (con mutación S228P en la región bisagra) (SEQ ID NO: 148), para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado Acm127-HC; la región variable de cadena ligera se conectó a la región constante de cadena ligera kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera de longitud completa, denominado Acm127-LC.

Según la descripción de los ejemplos 1-5 en el documento WO2018/137576A1, el anticuerpo monoclonal murino n.º 14 se seleccionó como anticuerpo líder, y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera se obtuvieron y se tradujeron a secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 33 y 34).

Se analizaron las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo n.º 14 y, según el esquema de Kabat, se determinaron las regiones determinantes de complementariedad de antígeno y las regiones de entramado de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo n.º 14. El anticuerpo n.º 14 comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de H-CDR1: GYTMN (SEQ ID NO: 35), H-CDR2: LINPYNGDTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 36) y H-CDR3: WRYTMDY (SEQ ID NO: 37), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de L-CDR1: RASESVDNYGNSFMN (SEQ ID NO: 38), L-CDR2: FASNLES (SEQ ID NO: 39) y L-CDR3: QQNNEAPPT (SEQ ID NO: 40).

La comparación de homología de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino n.º 14 con la secuencia de línea germinal de IgG humana se realizó en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. Se seleccionó IGHV1-46*01 como molde de injerto de CDR de cadena pesada, las CDR de cadena pesada del anticuerpo murino n.º 14 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGHV1-46*01 y se añadió WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 151) tras la H-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena pesada injertada por CDR. De manera

5 similar, se realizó la comparación de homología de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino n.º 14 con la secuencia de línea germinal de IgG humana. Se seleccionó IGKV7-3*01 como molde de injerto de CDR de cadena ligera, las CDR de cadena ligera del anticuerpo murino n.º 14 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGKV7-3*01 y se añadió FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 152) tras la L-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena ligera injertada por CDR. Basándose en la regiones variables injertadas por CDR, algunos sitios de aminoácido en la región de entramado se sometieron a retromutación. Cuando se realizó retromutación, la secuencia de aminoácidos se numeró según Kabat y la posición de cada sitio se indicó mediante numeración de Kabat.

10 Preferiblemente, para la región variable de cadena pesada injertada por CDR, T en la posición 28 (numeración de Kabat) se retromutó a S murina, M en la posición 48 se retromutó a I, V en la posición 67 se retromutó a A, M en la posición 69 se retromutó a V, R en la posición 71 se retromutó a V, T en la posición 73 se retromutó a K, V en la posición 78 se retromutó a A. Para la región variable de cadena ligera injertada por CDR, L en la posición 46 se retromutó a P, G en la posición 68 se retromutó a R, y N en la posición 81 se retromutó a D.

15 Las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera anteriores con sitios de retromutación se definieron como región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera humanizas, respectivamente (SEQ ID NO: 41 y 42). Los ADN que codifican las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera humanizadas se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (con la mutación S228P en la región bisagra) (SEQ ID NO: 148) para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado 14-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado 14-Hu-LC.

25 Los genes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anterior se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, y se expresó y purificó al anticuerpo. El anticuerpo obtenido de la combinación de 14-Hu-HC y 14-Hu-LC se denominó 14-Hu.

Ejemplo 2.2 Selección de cadena ligera común

30 Se usó BLAST para comparar y analizar las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 14-Hu y la región variable de cadena ligera de 1D11-Hu. Los resultados mostraron que, entre ellas, los aminoácidos idénticos representaban el 92% (identidades) y los aminoácidos con propiedades similares representaban el 94% (positivos).

35 Los vectores de expresión de 14-Hu-HC, 14-Hu-LC, 1D11-Hu-HC y 1D11-Hu-LC se combinaron de la siguiente manera: 14-Hu-HC+14-Hu-LC, 1D11-Hu-HC+1D11-Hu-LC, 14-Hu-HC+1D11-Hu-LC y 1D11-Hu-HC+14-Hu-LC, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 14-Hu, 1D11-Hu, 14-Hu-HC+1D11-Hu-LC y 1D11-Hu-HC+14-Hu-LC, respectivamente.

40 El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína de dominio extracelular de PD-1 humano con una etiqueta 6*His se preparó por los inventores (la fuente del dominio extracelular de PD-1 es tal como se describe en el documento WO2018/137576A1), y esta proteína recombinante se denominó PD1-His, que se usó para recubrir una placa ELISA (20 ng/pocillo); se usó TGF-β1 (adquirido de Sino Biological) para recubrir la placa ELISA (5 ng/pocillo).

45 Como se muestra en la Fig. 13A, 14-Hu puede unirse de manera efectiva a PD1-His, con una CE50 de 0,3924 nM; mientras que 1D11-Hu, 14-Hu-HC+1D11-Hu-LC y 1D11-Hu-HC+14-Hu-LC no pueden unirse de manera efectiva a PD1-His. Como se muestra en la Fig. 13B, 1D11-Hu puede unirse de manera efectiva a TGF-β1, con una CE50 de 0,06624 nM; 1D11-Hu-HC+14-Hu-LC puede unirse también a TGF-β1, con una CE50 de 0,5255 nM, mientras que 14-Hu y 14-Hu-HC+1D11-Hu-LC no pueden unirse a TGF-β1. En el presente documento, se seleccionó 14-Hu-LC (SEQ ID NO: 43 y 44) como cadena ligera común para construir un anticuerpo biespecífico.

50 Se usó BLAST para comparar y analizar las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 14-Hu y la región variable de cadena ligera de Acm127. Los resultados mostraron que, entre ellas, los aminoácidos idénticos representaban el 75% (identidades) y los aminoácidos con propiedades similares representaban el 83% (positivos).

55 Los vectores de expresión de 14-Hu-LC, Acm127-HC y Acm127-LC se combinaron de la siguiente manera: Acm127-HC+Acm127-LC y Acm127-HC+14-Hu-LC, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron Acm127 y Acm127-HC+14-Hu-LC, respectivamente.

60 La afinidad relativa de 1D11-Hu, 1D11-Hu-HC+14-Hu-LC, Acm127 y Acm127-HC+14-Hu-LC con respecto TGF-β1 se determinó mediante el ELISA descrito en los ejemplos anteriores. Se realizaron una representación gráfica y un análisis de datos usando GraphPad Prism6 y se calculó la CE50.

65 Como se muestra en la Fig. 14, 1D11-Hu, Acm127 y Acm127-HC+14-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a TGF-β1, con CE50 de 0,1338 nM, 0,04136 nM y 0,07105 nM, respectivamente. En comparación con 1D11-Hu, Acm127 y Acm127-HC+14-Hu-LC tenían una CE50 menor y una plataforma mayor, de modo que ambos tenían una mayor afinidad

con respecto a TGF- β 1. En el presente documento, se seleccionó 14-Hu-LC (SEQ ID NO: 43 y 44) como cadena ligera común para construir un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 2.3 Construcción de anticuerpos biespecíficos

La región variable de cadena pesada de 14-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 1D11 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). El gen de cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construido mediante tales procedimientos se denominó 14-Fab-1D11-IgG4 (SEQ ID NO: 45 y 46). De manera similar, la región variable de cadena pesada de 1D11 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 14-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). El gen de cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construido mediante tales procedimientos se denominó 1D11-Fab-14-IgG4 (SEQ ID NO: 47 y 48).

Según el método descrito en el ejemplo anterior, la región variable de cadena pesada de 14-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de Acm127 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). El gen de cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construido mediante tales procedimientos se denominó 14-Fab-127-IgG4 (SEQ ID NO: 49 y 50). De manera similar, la región variable de cadena pesada de Acm127 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 14-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). El gen de cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construido mediante tales procedimientos se denominó 127-Fab-14-IgG4 (SEQ ID NO: 51 y 52).

Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, los vectores de expresión 14-Fab-1D11-IgG4, 1D11-Fab-14-IgG4, 14-Fab-127-IgG4 y 127-Fab-14-IgG4 se combinaron con el vector de expresión 14-Hu-LC, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 14-Fab-1D11-IgG4, 1D11-Fab-14-IgG4, 14-Fab-127-IgG4 y 127-Fab-14-IgG4, respectivamente.

Ejemplo 2.4 Determinación de la afinidad relativa mediante ELISA

Como se muestra en la Fig. 15A, 14-Hu, 14-Fab-1D11-IgG4, 1D11-Fab-14-IgG4, 14-Fab-127-IgG4 y 127-Fab-14-IgG4 pueden unirse a PD1-His, con CE50 de 0,4321 nM, 0,4367 nM, 1,996 nM, 0,3873 nM y 3,955 nM, respectivamente; en comparación con 14-Fab-1D11-IgG4 y 14-Fab-127-IgG4, 1D11-Fab-14-IgG4 y 127-Fab-14-IgG4 tenían una afinidad relativa más débil con respecto a PD1-His, lo que puede estar provocado por impedimento estérico. Como se muestra en la Fig. 15B, 1D11-Hu-HC+14-Hu-LC, Acm127-HC+14-Hu-LC, 14-Fab-1D11-IgG4, 1D11-Fab-14-IgG4, 14-Fab-127-IgG4 y 127-Fab-14-IgG4 pueden unirse a TGF- β 1, con CE50 de 1,267 nM, 0,0803 nM, 0,6985 nM, 0,3628 nM, 0,1525 nM y 0,1083 nM, respectivamente. En comparación con 1D11-Hu-HC+14-Hu-LC, 14-Fab-1D11-IgG4 y 1D11-Fab-14-IgG4, Acm127-HC+14-Hu-LC, 14-Fab-127-IgG4 y 127-Fab-14-IgG4 tenían una afinidad relativa más fuerte con respecto a TGF- β 1.

Ejemplo 2.5 Evaluación de la actividad funcional para potenciar la MLR

Como se muestra en las Figs. 16A y 16B, tanto 14-Hu como 14-Fab-127-IgG4 pueden estimular de manera efectiva MLR para secretar IL-2 e IFN- γ . Para estimular MLR para secretar IL-2, las CE50 eran 0,1008 nM y 0,3185 nM, respectivamente, y para estimular MLR para secretar IFN- γ , las CE50 eran 0,04716 nM y 0,5871 nM, respectivamente. Además, los resultados experimentales mostraron que, a mayores concentraciones, en comparación con 14-Hu, 14-Fab-127-IgG4 puede estimular MLR para secretar más IL-2 e IFN- γ .

Ejemplo 2.6 Determinación de la capacidad de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y TGF-beta para unirse simultáneamente a dos antígenos

La microplaca se recubrió con TGF- β 1 (adquirido de Sino Biological, n.º de cat.: 10804-HNAC). El anticuerpo que debe someterse a prueba se diluyó en serie con PBST que contiene albúmina sérica bovina al 1%, entonces se transfirió a la microplaca anterior y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora. Las etapas experimentales posteriores fueron las mismas que se describieron en el ejemplo 1.7.4.

Como se muestra en la Fig. 17, 14-Fab-127-IgG4 puede unirse de manera adicionalmente efectiva a PD-1 humano tras unirse a TGF- β 1, con una CE50 de 0,2784 nM. Ni 14-Hu ni Acm127-HC+14-Hu-LC pueden unirse simultáneamente a PD-1 y TGF- β 1.

Ejemplo 2.7 Efecto antitumoral de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y TGF-beta en ratones

Se adquirieron ratones transgénicos con PD-1 humano (el fondo de línea germinal es C57BL/6) y células de cáncer colorrectal de ratón MC38 del Shanghai Model Organisms Center, Inc. En los ratones transgénicos, el segmento extracelular del gen PD-1 humano se usó para reemplazar la parte homóloga de los ratones. El anticuerpo biespecífico de la presente invención puede reconocer la molécula de PD-1 en los ratones transgénicos y puede unirse también al TGF-beta endógeno de los ratones. Las etapas de implementación específicas son tal como sigue: se cultivaron células MC38 *in vitro* con DMEM que contiene suero al 10% DMEM (suero y medio adquiridos de Gibco); las células MC38 cultivadas se inocularon en ratones transgénicos con PD-1 humano, cada ratón se inoculó con 2×10^6 células por vía subcutánea; cuando las células tumorales que debían inocularse crecieron hasta un volumen próximo a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos, con 8 ratones en cada grupo. El tratamiento farmacológico de ratones en cada grupo es tal como sigue: grupo control, solo inyectado con solución salina normal; grupo de Keytruda (grupos con dos dosis), inyectado con 2 mg/kg o 10 mg/kg de anticuerpo control positivo anti-PD-1 Keytruda (producido por Merck); grupo de 14-Fab-127-IgG4 (grupos con dos dosis), inyectado con 3,2 mg/kg o 16 mg/kg de 14-Fab-127-IgG4. Teniendo en cuenta la diferencia en peso molecular entre anticuerpos biespecíficos y anticuerpos monoclonales, las dosis del fármaco en este experimento se proporcionó según la regla de cantidad igual de sustancia. Posteriormente, los fármacos se administraron según el régimen diseñado anteriormente, dos veces a la semana durante un total de 6 veces, y el volumen tumoral se midió dos veces a la semana. Finalmente, la curva de crecimiento de tumor en cada grupo determinada a lo largo del tiempo se muestra en la Fig. 18.

Los resultados mostraron que al final del experimento el 25º día, las tasas de inhibición tumoral de Keytruda (grupos con dos dosis) y 14-Fab-127-IgG4 (grupos con dos dosis) eran del 79,2% (2 mg/kg) y del 77,7% (10 mg/kg), del 85,1% (3,2 mg/kg) y del 100% (16 mg/kg), respectivamente (tasa de inhibición tumoral = $(\text{volumen medio del grupo control} - \text{volumen medio del grupo experimental}) / \text{volumen medio del grupo control} \times 100\%$). En comparación con Keytruda, 14-Fab-127-IgG4 puede inhibir el crecimiento tumoral de manera más efectiva, y 14-Fab-127-IgG4 a dosis altas puede provocar una regresión tumoral completa en todos los ratones.

Ejemplo 3 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a HER-2 y CD47**Ejemplo 3.1 Secuencias**

19H6-Hu es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humana humanizado, cuyas secuencias de región variable de cadena pesada y de región variable de cadena ligera eran del documento WO2020/025013A1. La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas se denominaron 19H6-Hu-VH y 19H6-Hu-VL (SEQ ID NO: 53 y 54), respectivamente.

Los ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 147), para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado 19H6-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado 19H6-Hu-LC. Los genes 19H6-Hu-HC y 19H6-Hu-LC se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, se expresó y purificó el anticuerpo, y el anticuerpo obtenido se denominó 19H6-Hu.

MABL-2 (denominado a continuación en el presente documento anti-CD47B) es un anticuerpo monoclonal murino frente a CD47 humana, cuyas secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada y de región variable de cadena ligera se derivaron de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 10 en el documento US20030108546A.

Se analizaron las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD47B y, según el esquema de Kabat, se determinaron las regiones determinantes de complementariedad de antígeno y las regiones de entramado de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-CD47B. El anticuerpo anti-CD47B comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de H-CDR1: NHVIH (SEQ ID NO: 55), H-CDR2: YIYPYNDGTYNEKFKD (SEQ ID NO: 56) y H-CDR3: GGYTYDD (SEQ ID NO: 57), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de L-CDR1: RSSQSLVHNSGKTIHLH (SEQ ID NO: 58), L-CDR2: KVSNRFS (SEQ ID NO: 59) y L-CDR3: SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 60).

La comparación de homología de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD47B con la secuencia de línea germinal de IgG humana se realizó en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. Se seleccionó IGHV1-46*01 como molde de injerto de CDR de cadena pesada, las CDR de cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD47B se trasplantaron a las regiones de entramado de IGHV1-46*01 y se añadió WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 151) tras la H-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena pesada injertada por CDR. De manera similar, se realizó la comparación de homología de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino anti-CD47B con la secuencia de línea germinal de IgG humana. Se seleccionó IGKV2-30*01 como molde de injerto de CDR de cadena ligera, las CDR de cadena ligera del anticuerpo murino anti-CD47B se trasplantaron a las regiones de entramado de IGKV2-30*01 y se añadió FGQGTVKVEIK (SEQ ID NO: 152) tras la L-CDR3 como cuarta región de

entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena ligera injertada por CDR. Basándose en la regiones variables injertadas por CDR, algunos sitios de aminoácido en la región de entramado se sometieron a retromutación. Cuando se realizó mutación, la secuencia de aminoácidos se numeró según Kabat y la posición de cada sitio se indicó mediante numeración de Kabat.

Preferiblemente, para la región variable de cadena pesada injertada por CDR, según la numeración de Kabat, T en la posición 30 se mutó a A, M en la posición 69 se mutó a L, R en la posición 71 se mutó a S, y T en la posición 73 se mutó a K. Para la región variable de cadena ligera injertada por CDR, F en la posición 36 se mutó a Y, y R en la posición 46 se mutó a L.

La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera anteriores con sitios de mutación se definieron como región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera humanizadas, que se denominaron anti-CD47B-Hu-VH y anti-CD47B-Hu-VL (SEQ ID NO: 61 y 62), respectivamente.

Los ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 147), para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado anti-CD47B-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado anti-CD47B-Hu-LC. Los genes anti-CD47B-Hu-HC y anti-CD47B-Hu-LC se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, se expresó y purificó el anticuerpo, y el anticuerpo obtenido se denominó anti-CD47B-Hu.

Ejemplo 3.2 Selección de cadena ligera común

Se usó BLAST para comparar y analizar las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 19H6-Hu y la región variable de cadena ligera de anti-CD47B-Hu. Los resultados mostraron que, entre ellas, los aminoácidos idénticos representaban el 96% (identidades) y los aminoácidos con propiedades similares representaban el 99% (positivos).

Los genes de cadena pesada y cadena ligera de 19H6-Hu y anti-CD47B-Hu se combinaron de la siguiente manera: 19H6-Hu-HC+anti-CD47B-Hu-LC y anti-CD47B-Hu-HC+19H6-Hu-LC, se expresaron y purificaron los anticuerpos, y los anticuerpos obtenidos se denominaron 19H6-Hu-HC+anti-CD47B-Hu-LC y anti-CD47B-Hu-HC+19H6-Hu-LC, respectivamente.

El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de Her-2 humana con una etiqueta de polihistidina se adquirió de ACROBiosystems (n.º de cat.: HE2-H5225), y la proteína recombinante del segmento extracelular de CD47 humana con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 12283-H08H), y las dos proteínas recombinantes se denominaron HER2-ECD-His y CD47-ECD-His. Una placa ELISA se recubrió con HER2-ECD-His y CD47-ECD-His, respectivamente, ambos con una concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo.

Como se muestra en la Fig. 19A, 19H6-Hu y 19H6-Hu-HC+anti-CD47B-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a HER2-ECD-His, con CE50 de 0,07701 nM y 0,1388 nM, respectivamente; mientras que anti-CD47B-Hu y anti-CD47B-Hu-HC+19H6-Hu-LC no pueden unirse de manera efectiva a HER2-ECD-His. Como se muestra en la Fig. 19B, tanto anti-CD47B-Hu como anti-CD47B-Hu-HC+19H6-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a CD47-ECD-His, con CE50 de 0,04276 nM y 0,0541 nM, respectivamente, mientras que 19H6-Hu y 19H6-Hu-HC+anti-CD47B-Hu-LC no pueden unirse de manera efectiva a CD47-ECD-His. En el presente documento, se seleccionó 19H6-Hu-LC (SEQ ID NO: 63 y 64) como cadena ligera común para construir un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 3.3 Construcción de anticuerpos biespecíficos

La región variable de cadena pesada de anti-CD47B-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 19H6-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (CH1+CH2+CH3). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó CD47B-Fab-19H6-IgG1 (SEQ ID NO: 65 y 66). De manera similar, la región variable de cadena pesada de 19H6-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de anti-CD47B-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (CH1+CH2+CH3). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 19H6-Fab-CD47B-IgG1 (SEQ ID NO: 67 y 68).

Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, los vectores de expresión CD47B-Fab-19H6-IgG1 y 19H6-Fab-CD47B-IgG1 se combinaron con el vector de expresión 19H6-Hu-LC, respectivamente, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron CD47B-Fab-

19H6-IgG1 y 19H6-Fab-CD47B-IgG1, respectivamente (por brevedad, solo se usó el nombre de la cadena pesada como nombre del anticuerpo).

Ejemplo 3.4 Determinación de la afinidad relativa mediante ELISA

Como se muestra en la Fig. 20A, 19H6-Hu, CD47B-Fab-19H6-IgG1 y 19H6-Fab-CD47B-IgG1 pueden unirse de manera efectiva a HER2-ECD-His, con CE50 de 0,1262 nM, 0,1057 nM y 0,1543 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 20B, anti-CD47B-Hu-HC+19H6-Hu-LC, CD47B-Fab-19H6-IgG1 y 19H6-Fab-CD47B-IgG1 pueden unirse de manera efectiva a CD47-ECD-His, con CE50 de 0,06166 nM, 0,07817 nM y 0,1945 nM, respectivamente. Los resultados anteriores muestran que CD47B-Fab-19H6-IgG1 y 19H6-Fab-CD47B-IgG1 pueden unirse tanto a HER-2 como a CD47, lo que indica que son anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 4 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a HER-2 y CD137

Ejemplo 4.1 Secuencias

19H6-Hu es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humana humanizado, cuya fuente de es tal como se describe en el ejemplo 3.1.

El anticuerpo n.º 94 es un anticuerpo anti-CD137 humana derivado de ratón preparado en el laboratorio de nuestra empresa, según el método de preparación descrito en los ejemplos 1-5 en el documento WO2018/137576A1, la diferencia es que los ratones se inmunizaron usando proteína recombinante CD137 humana y se seleccionaron células de hibridoma mediante ELISA usando proteína recombinante CD137 humana. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestran en las SEQ ID NO: 69 y 70, respectivamente.

Se analizaron las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo n.º 94 y, según el esquema de Kabat, se determinaron las regiones determinantes de complementariedad de antígeno y las regiones de entramado de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo n.º 94. El anticuerpo n.º 94 comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de H-CDR1: SYDIS (SEQ ID NO: 71), H-CDR2: VIWTGGGTNYNSAFMS (SEQ ID NO: 72) y H-CDR3: MDY (SEQ ID NO: 73), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de L-CDR1: RSSQSLHNSGNTILH (SEQ ID NO: 74), L-CDR2: KVSNRFS (SEQ ID NO: 75) y L-CDR3: SQSTHVPWT (SEQ ID NO: 76).

La comparación de homología de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino n.º 94 con la secuencia de línea germinal de IgG humana se realizó en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. Se seleccionóIGHV4-59*01 como molde de injerto de CDR de cadena pesada, las CDR de cadena pesada del anticuerpo murino n.º 94 se trasplantaron a las regiones de entramado deIGHV4-59*01 y se añadióWGGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 151) tras la H-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena pesada injertada por CDR. De manera similar, se realizó la comparación de homología de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino n.º 94 con la secuencia de línea germinal de IgG humana. Se seleccionóIGKV2-30*01 como molde de injerto de CDR de cadena ligera, las CDR de cadena ligera del anticuerpo murino n.º 94 se trasplantaron a las regiones de entramado deIGKV2-30*01 y se añadióFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 152) tras la L-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena ligera injertada por CDR. Basándose en la regiones variables injertadas por CDR, algunos sitios de aminoácido en la región de entramado se sometieron a retromutación. Cuando se realizó mutación, la secuencia de aminoácidos se numeró según Kabat y la posición de cada sitio se indicó mediante numeración de Kabat.

Preferiblemente, para la región variable de cadena pesada injertada por CDR, según la numeración de Kabat, G en la posición 27 se mutó a F, I en la posición 29 se mutó a L, I en la posición 48 se mutó a L, R en la posición 71 se mutó a S, V en la posición 71 se mutó a K, T en la posición 73 se mutó a N, N en la posición 76 se mutó a S, F en la posición 78 se mutó a V, A en la posición 93 se mutó a V Para la región variable de cadena ligera injertada por CDR, F en la posición 36 se mutó a Y, R en la posición 46 se mutó a L, I en la posición 48 se mutó a F, e Y en la posición 87 se mutó a F.

La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera anteriores con sitios de mutación se definieron como región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera humanizadas, que se denominaron 94-Hu-VH y 94-Hu-VL (SEQ ID NO: 77 y 78), respectivamente.

Los ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas anteriores se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 147), para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado 94-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado 94-Hu-LC. Los genes 94-Hu-HC y 94-Hu-LC se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, y se expresó y purificó al anticuerpo. El anticuerpo obtenido se denominó 94-Hu.

Ejemplo 4.2 Selección de cadena ligera común

Se usó BLAST para comparar y analizar las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 19H6-Hu y la región variable de cadena ligera de 94-Hu. Los resultados muestran que, entre ellas, los aminoácidos idénticos representaban el 97% (identidades) y los aminoácidos con propiedades similares representaban el 99% (positivos).

Los genes de cadena pesada y cadena ligera de 19H6-Hu y 94-Hu se combinaron de la siguiente manera: 19H6-Hu-HC+94-Hu-LC y 94-Hu-HC+19H6-Hu-LC, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 19H6-Hu-HC+94-Hu-LC y 94-Hu-HC+19H6-Hu-LC, respectivamente.

El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de Her-2 humana con una etiqueta de polihistidina se adquirió de ACROBiosystems (n.º de cat.: HE2-H5225), y la proteína recombinante del segmento extracelular de CD137 humana con etiquetas Fc se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10041-H02H), las dos proteínas recombinantes se denominaron HER2-ECD-His y CD137-ECD-Fc, respectivamente. Una placa ELISA se recubrió con HER2-ECD-His y CD137-ECD-Fc, respectivamente, ambos con la concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo.

Como se muestra en la Fig. 21A, tanto 19H6-Hu como 19H6-Hu-HC+94-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a HER2-ECD-His, con CE50 de 0,1222 nM y 0,1391 nM, respectivamente; mientras que 94-Hu y 94-Hu-HC+19H6-Hu-LC no pueden unirse de manera efectiva a HER2-ECD-His. Como se muestra en la Fig. 21B, tanto 94-Hu como 94-Hu-HC+19H6-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a CD137-ECD-Fc, con CE50 de 0,3913 nM y 0,634 nM, respectivamente, mientras que 19H6-Hu y 19H6-Hu-HC+94-Hu-LC no pueden unirse de manera efectiva a CD137-ECD-Fc. En el presente documento, se seleccionó 19H6-Hu-LC (SEQ ID NO: 63 y 64) como cadena ligera común para construir un anticuerpo biespecífico (en realidad, también puede seleccionarse 94-Hu-LC como cadena ligera común para construir un anticuerpo biespecífico).

Ejemplo 4.3 Construcción de anticuerpos biespecíficos

La región variable de cadena pesada de 94-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 19H6-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (CH1+CH2+CH3). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 94-Fab-19H6-IgG1. De manera similar, la región variable de cadena pesada de 19H6-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 94-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (CH1+CH2+CH3). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 19H6-Fab-94-IgG1.

Con el fin de reducir la interacción entre el segmento Fc de las moléculas de anticuerpo biespecífico anteriores y FcγR (receptores gamma de Fc), tanto la leucina en la posición 234 como la leucina en la posición 235 de su segmento Fc se mutaron a alanina, y la mutación se marcó como LALA (referencia: Wang X, Mathieu M, Brezski R J. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions[J]. Protein & cell, 2018, 9(1): 63-73.). Las moléculas de AcBs anteriores tras la mutación se denominaron 94-Fab-19H6-IgG1-LALA (SEQ ID NO: 79 y 80) y 19H6-Fab-94-IgG1-LALA (SEQ ID NO: 81 y 82), respectivamente. En el presente documento, el propósito de la mutación LALA es principalmente reducir la toxicidad potencial *in vivo* (referencia: Ho SK, Xu Z, Thakur A, *et al.* Epitope and Fc-mediated Crosslinking, but not High Affinity, Are Critical for Antitumor Activity of CD137 Agonist Antibody with Reduced Liver Toxicity[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2020. págs. 1040-1051.).

Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, los vectores de expresión 94-Fab-19H6-IgG1-LALA y 19H6-Fab-94-IgG1-LALA se combinaron con el vector de expresión 19H6-Hu-LC, respectivamente, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 94-Fab-19H6-IgG1-LALA y 19H6-Fab-94-IgG1-LALA, respectivamente (por brevedad, solo el nombre de la cadena pesada se usó como nombre del anticuerpo).

Ejemplo 4.4 Determinación de la afinidad relativa mediante ELISA

Como se muestra en la Fig. 22A, 19H6-Hu, 94-Fab-19H6-IgG1-LALA y 19H6-Fab-94-IgG1-LALA pueden unirse de manera efectiva a HER2-ECD-His, con CE50 de 0,1933 nM, 0,1579 nM y 0,1201 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 22B, tanto 94-Hu-HC+19H6-Hu-LC como 94-Fab-19H6-IgG1-LALA pueden unirse de manera efectiva a CD137-ECD-Fc, con CE50 de 0,634 nM y 0,2411 nM, respectivamente; 19H6-Fab-94-IgG1-LALA tiene una unión débil a CD137-ECD-Fc, con una CE50 de 27,56 nM. Los resultados anteriores mostraron que 94-Fab-19H6-IgG1-LALA y 19H6-Fab-94-IgG1-LALA pueden unirse tanto a HER-2 como a CD137, lo que indica que son anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 5 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CD137**Ejemplo 5.1 Secuencias**

MAB1-25-Hu (denominado a continuación en el presente documento 609) es un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 humano humanizado, cuyas secuencias de región variable de cadena pesada y de región variable de cadena ligera se derivan del documento WO2018/137576A1. La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas (SEQ ID NO: 83 y 84) se conectaron a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (S228P) (SEQ ID NO: 148) y la región constante de cadena ligera kappa (SEQ ID NO: 149), respectivamente, y finalmente se obtuvieron los genes de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo monoclonal Acm1-25-Hu humanizado completo (609).

4B4-1-1 (denominado a continuación en el presente documento anti-CD137) es un anticuerpo monoclonal murino frente a CD137 humana, cuyas secuencias de región variable de cadena pesada y de región variable de cadena ligera de aminoácidos se derivan de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 en el documento US5928893.

Se analizaron las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD137 y, según el esquema de Kabat, se determinaron las regiones determinantes de complementariedad de antígeno y las regiones de entramado de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-CD137. El anticuerpo anti-CD137 comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de H-CDR1: SYWMH (SEQ ID NO: 85), H-CDR2: EINPGNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 86) y H-CDR3: SFTTARGFAY (SEQ ID NO: 87), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de L-CDR1: RASQTISDILH (SEQ ID NO: 88), L-CDR2: YASQSIG (SEQ ID NO: 89) y L-CDR3: QDGHSFPPT (SEQ ID NO: 90).

La comparación de homología de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD137 con la secuencia de línea germinal de IgG humana se realizó en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. Se seleccionó IGHV1-46*01 como molde de injerto de CDR de cadena pesada, las CDR de cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD137 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGHV1-46*01 y se añadió WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 151) tras la H-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena pesada injertada por CDR. De manera similar, se realizó la comparación de homología de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino anti-CD137 con la secuencia de línea germinal de IgG humana. Se seleccionó IGKV6-21*02 como molde de injerto de CDR de cadena ligera, las CDR de cadena ligera del anticuerpo murino anti-CD137 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGKV6-21*02 y se añadió FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 152) tras la L-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena ligera injertada por CDR. Basándose en las regiones variables injertadas por CDR, algunos sitios de aminoácido en la región de entramado se sometieron a retromutación. Cuando se realizó mutación, la secuencia de aminoácidos se numeró según Kabat y la posición de cada sitio se indicó mediante numeración de Kabat.

Preferiblemente, para la región variable de cadena pesada injertada por CDR, según la numeración de Kabat, T en la posición 30 se mutó a S, M en la posición 69 se mutó a L, R en la posición 71 se mutó a V, y T en la posición 73 se mutó a K. Para la región variable de cadena ligera injertada por CDR, L en la posición 4 se mutó a M, y V en la posición 58 se mutó a I, y T en la posición 69 se mutó a S.

La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera anteriores con sitios de mutación se definen como región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera humanizadas, que se denominaron anti-CD137-Hu-VH y anti-CD137-Hu-VL (SEQ ID NO: 91 y 92), respectivamente.

Los ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (S228P) (SEQ ID NO: 148), para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado anti-CD137-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado anti-CD137-Hu-LC. Los genes anti-CD137-Hu-HC y anti-CD137-Hu-LC se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, se expresó y purificó el anticuerpo, y el anticuerpo obtenido se denominó Anti-CD137-Hu.

Ejemplo 5.2 Selección de cadena ligera común

Se usó BLAST para comparar y analizar las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 609 y la región variable de cadena ligera de anti-CD137-Hu. Los resultados muestran que, entre ellas, los aminoácidos idénticos representaban el 73% (identidades) y los aminoácidos con propiedades similares representaban el 88% (positivos).

Los genes de cadena pesada y cadena ligera de 609 y anti-CD137-Hu se combinaron de la siguiente manera: 609-HC+anti-CD137-Hu-LC y anti-CD137-Hu-HC+609-LC, se expresaron y purificaron los anticuerpos, y los anticuerpos obtenidos se denominaron 609-HC+anti-CD137-Hu-LC y anti-CD137-Hu-HC+609-LC, respectivamente.

El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de PD-1 humano con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10377-H08H), y la proteína recombinante del segmento extracelular de CD137 humana con etiquetas Fc se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10041-H02H), y las

dos proteínas recombinantes se denominaron PD1-ECD-His y CD137-ECD-Fc, respectivamente. Una placa ELISA se recubrió con PD1-ECD-His y CD137-ECD-Fc, respectivamente, ambos con una concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo.

5 Como se muestra en la Fig. 23A, tanto 609 como 609-HC+anti-CD137-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,1358 nM y 0,2067 nM, respectivamente; mientras que anti-CD137-Hu y anti-CD137-Hu-HC+609-LC no pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His. Como se muestra en la Fig. 23B, anti-CD137-Hu puede unirse de manera efectiva a CD137-ECD-Fc, con una CE50 de 0,461 nM, mientras que 609, 609-HC+anti-CD137-Hu-LC y anti-CD137-Hu-HC+609-LC no pueden unirse de manera efectiva a CD137-ECD-Fc. En el presente documento, se seleccionó anti-CD137-Hu-LC (SEQ ID NO: 93 y 94) como cadena ligera común para construir un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 5.3 Construcción de anticuerpos biespecíficos

15 La región variable de cadena pesada de 609 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de anti-CD137-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 609-Fab-137-IgG4 (SEQ ID NO: 95 y 96). De manera similar, la región variable de cadena pesada de anti-CD137-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 609 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 137-Fab-609-IgG4 (SEQ ID NO: 97 y 98).

25 Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, los vectores de expresión 609-Fab-137-IgG4 y 137-Fab-609-IgG4 se combinaron con el vector de expresión anti-CD137-Hu-LC, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 609-Fab-137-IgG4 y 137-Fab-609-IgG4, respectivamente (por brevedad, se usa solo el nombre de la cadena pesada como nombre del anticuerpo).

Ejemplo 5.4 Determinación de la afinidad relativa mediante ELISA

35 Como se muestra en la Fig. 24A, 609-HC+anti-CD137-Hu-LC, 609-Fab-137-IgG4 y 137-Fab-609-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,2067 nM, 0,2293 nM y 1,415 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 24B, anti-CD137-Hu, 609-Fab-137-IgG4 y 137-Fab-609-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a CD137-ECD-Fc, con CE50 de 0,461 nM, 0,3572 nM y 0,2424 nM, respectivamente. Los resultados anteriores mostraron que 609-Fab-137-IgG4 y 137-Fab-609-IgG4 pueden unirse tanto a PD-1 como a CD137, lo que indica que son anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 6 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CD40

Ejemplo 6.1 Secuencias

609 es un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 humano humanizado, cuya fuente se describe en el ejemplo 5.1.

45 ACm2.220 (denominado a continuación en el presente documento anti-CD40) es un anticuerpo monoclonal murino frente a CD40 humana, cuyas secuencias de región variable de cadena pesada y de región variable de cadena ligera de aminoácidos se derivan de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 1 en el documento US6312693.

50 Se analizaron las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD40 y, según el esquema de Kabat, se determinaron las regiones determinantes de complementariedad de antígeno y las regiones de entramado de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-CD40. El anticuerpo anti-CD40 comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de H-CDR1: TTGMQ (SEQ ID NO: 99), H-CDR2: WINTHSGVVPKYVEDFKG (SEQ ID NO: 100) y H-CDR3: SGNGNYDLAYFAY (SEQ ID NO: 101), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de L-CDR1: RASQSISDILH (SEQ ID NO: 102), L-CDR2: YASHSIS (SEQ ID NO: 103) y L-CDR3: QHGHSFPWT (SEQ ID NO: 104).

65 La comparación de homología de la región variable de cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD40 con la secuencia de línea germinal de IgG humana se realizó en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Igblast/>. Se seleccionó IGHV7-4-1*02 como molde de injerto de CDR de cadena pesada, las CDR de cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD40 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGHV7-4-1*02 y se añadió WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 151) tras la H-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena pesada injertada por CDR. De manera similar, se realizó la comparación de homología de la región variable de cadena ligera del anticuerpo murino anti-CD40 con la secuencia de línea germinal de IgG humana. Se seleccionó IGKV3-11*01 como molde de injerto de CDR de cadena ligera, las CDR de cadena ligera del anticuerpo murino anti-CD40 se trasplantaron a las regiones de entramado de IGKV3-11*01 y se añadió FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 152) tras la L-CDR3 como cuarta región de entramado, para obtener una secuencia de región variable de cadena ligera injertada por CDR. Basándose en la regiones variables

injertadas por CDR, algunos sitios de aminoácido en la región de entramado se sometieron a retromutación. Cuando se realizó mutación, la secuencia de aminoácidos se numeró según Kabat y la posición de cada sitio se indicó mediante numeración de Kabat.

5 Preferiblemente, para la región variable de cadena pesada injertada por CDR, según la numeración de Kabat, V en la posición 2 se mutó a I, T en la posición 28 se mutó a A, Q en la posición 39 se mutó a E, y M en la posición 48 se mutó a I, S en la posición 76 se muta a N, y A en la posición 93 se mutó a V. Para la región variable de cadena ligera injertada por CDR, A en la posición 43 se mutó a S, Y en la posición 49 se mutó a K, y T en la posición 69 se mutó a S.

10 La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera anteriores con sitios de mutación se definieron como región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera humanizadas, que se denominaron anti-CD40-Hu-VH y anti-CD40-Hu-VL (SEQ ID NO: 105 y 106), respectivamente.

15 Los ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (S228P) (SEQ ID NO: 148), para obtener un gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado anti-CD40-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena kappa humana (SEQ ID NO: 149), para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado anti-CD40-Hu-LC. Los genes anti-CD40-Hu-HC y anti-CD40-Hu-LC se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, se expresó y purificó el anticuerpo, y el anticuerpo obtenido se denominó anti-CD40-Hu.

Ejemplo 6.2 Selección de cadena ligera común

25 Se usó BLAST para comparar y analizar las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 609 y la región variable de cadena ligera de anti-CD40-Hu. Los resultados mostraron que, entre ellas, los aminoácidos idénticos representaban el 90% (identidades) y los aminoácidos con propiedades similares representaban el 96% (positivos).

30 Los genes de cadena pesada y cadena ligera de 609 y anti-CD40-Hu se combinaron de la siguiente manera: 609-HC+anti-CD40-Hu-LC y anti-CD40-Hu-HC+609-LC, se expresaron y purificaron los anticuerpos, y los anticuerpos obtenidos se denominaron 609-HC+anti-CD40-Hu-LC y anti-CD40-Hu-HC+609-LC, respectivamente.

35 El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de PD-1 humano con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10377-H08H), y la proteína recombinante del segmento extracelular de CD40 humana con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10774-H08H), y las dos proteínas recombinantes se denominaron PD1-ECD-His y CD40-ECD-His, respectivamente. Una placa ELISA se recubrió con PD1-ECD-His y CD40-ECD-His, respectivamente, ambos con una concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo.

40 Como se muestra en la Fig. 25A, tanto 609 como 609-HC+anti-CD40-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,1263 nM y 0,1387 nM, respectivamente; mientras que anti-CD40-Hu y anti-CD40-Hu-HC+609-LC no pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His. Como se muestra en la Fig. 25B, anti-CD40-Hu puede unirse de manera efectiva a CD40-ECD-His, con una CE50 de 0,1104 nM, mientras que 609, 609-HC+anti-CD40-Hu-LC y anti-CD40-Hu-HC+609-LC no pueden unirse de manera efectiva a CD40-ECD-His. En el presente documento, se seleccionó anti-CD40-Hu-LC (SEQ ID NO: 107 y 108) como cadena ligera común para construir un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 6.3 Construcción de anticuerpos biespecíficos

50 La región variable de cadena pesada de 609 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de anti-CD40-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 609-Fab-40-IgG4 (SEQ ID NO: 109 y 110). De manera similar, la región variable de cadena pesada de anti-CD40-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 609 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 40-Fab-609-IgG4 (SEQ ID NO: 111 y 112).

60 Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, los vectores de expresión 609-Fab-40-IgG4 y 40-Fab-609-IgG4 se combinaron con el vector de expresión anti-CD40-Hu-LC, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 609-Fab-40-IgG4 y 40-Fab-609-IgG4, respectivamente (por brevedad, se usa solo el nombre de la cadena pesada como nombre del anticuerpo).

65

Ejemplo 6.4 Determinación de la afinidad relativa mediante ELISA

Como se muestra en la Fig. 26A, 609-HC+anti-CD40-Hu-LC, 609-Fab-40-IgG4 y 40-Fab-609-IgG4 pueden unirse a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,1387 nM, 0,1723 nM y 1,017 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 26B, anti-CD40-Hu, 609-Fab-40-IgG4 y 40-Fab-609-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a CD40-ECD-His, con CE50 de 0,1104 nM, 0,1047 nM y 0,09556 nM, respectivamente. Los resultados anteriores mostraron que 609-Fab-40-IgG4 y 40-Fab-609-IgG4 pueden unirse tanto a PD-1 como a CD40, lo que indica que son anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 7 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y otras dianas**Ejemplo 7.1 Secuencias**

609 es un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 humano humanizado, cuya fuente es tal como se describe en el ejemplo 5.1.

Las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 1-2, 113-118) de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de los anticuerpos tales como cetuximab, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab se obtuvieron de la bibliografía pública (Magdelaine-Beuzelin C, Kaas Q, Wehbi V, *et al.* Structure-function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment[J]. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2007, 64 (3): 210-225). 10D1 (denominado a continuación en el presente documento ipilimumab) es un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 humano, cuyas secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se derivan de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 7 en el documento US20020086014A1 (es decir, SEQ ID NO: 119 y 120 en la presente invención).

Los ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. Las secuencias codificantes de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se conectaron a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 147) y la región constante de cadena ligera kappa humana (SEQ ID NO: 149) para construir un genes de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo, respectivamente. Los genes de cadena pesada de los anticuerpos anteriores se denominaron cetuximab-HC, bevacizumab-HC, trastuzumab-HC, pertuzumab-HC e ipilimumab-HC, respectivamente, y los genes de cadena ligera de los anticuerpos anteriores se denominaron cetuximab-LC, bevacizumab-LC, trastuzumab-LC, pertuzumab-LC e ipilimumab-LC, respectivamente. Los genes de cadena pesada y de cadena ligera anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, y los genes de cadena pesada y de cadena ligera correspondientes anteriores se combinaron, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron cetuximab-IgG1, bevacizumab-IgG1, trastuzumab-IgG1, pertuzumab-IgG1 e ipilimumab-IgG1, respectivamente.

5E7-Hu es un anticuerpo anti-LAG-3 humano humanizado, cuyas secuencias de región variable de cadena pesada y de región variable de cadena ligera se derivan de SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28 en el documento PCT/CN2020/076023 (es decir, SEQ ID NO: 121 y 122 en la presente invención). Los ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera humanizadas se sintetizaron por Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. La región variable de cadena pesada humanizada sintética se conectó a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (S228P) (SEQ ID NO: 148) para obtener el gen de cadena pesada humanizado de longitud completa, denominado 5E7-Hu-HC; la región variable de cadena ligera humanizada se conectó a la región constante de cadena kappa humana (SEQ ID NO: 149) para obtener un gen de cadena ligera humanizado de longitud completa, denominado 5E7-Hu-LC. Los genes 5E7-Hu-HC y 5E7-Hu-LC se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. El anticuerpo obtenido se denominó 5E7-Hu.

Ejemplo 7.2 Selección de cadena ligera común**Ejemplo 7.2.1 Determinación de la afinidad de unión de anticuerpos híbridos con respecto a antígeno**

Se combinaron los genes de la cadena pesada de 609 y la cadena ligera de los anticuerpos anteriores, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 609-HC+cetuximab-LC, 609-HC+bevacizumab-LC, 609-HC+trastuzumab-LC, 609-HC+pertuzumab-LC, 609-HC+ipilimumab-LC y 609-HC+5E7-Hu-LC, respectivamente.

El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de PD-1 humano con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10377-H08H), que se denominó PD1-ECD-His. Una placa ELISA se recubrió con PD1-ECD-His, con una concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo. Como se muestra en la Fig. 27, Opdivo (adquirido de Bristol-Myers Squibb), 609, 609-HC+cetuximab-LC, 609-HC+bevacizumab-LC, 609-HC+pertuzumab-LC, 609-HC+ipilimumab-LC y 609-HC+5E7-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,2887 nM, 0,1100 nM, 0,2424 nM, 0,1530 nM, 0,2244 nM, 0,1547 nM y 0,1709 nM; mientras que 609-HC+trastuzumab-LC tiene una afinidad de unión relativamente débil con respecto a PD1-ECD-His, con una CE50 de 0,7219 nM. Por tanto, en el presente documento pueden seleccionarse cetuximab-LC (SEQ ID NO: 123 y 124), bevacizumab-LC, pertuzumab-LC (SEQ ID NO: 125 y 126), ipilimumab-LC (SEQ ID NO: 127 y 128) y 5E7-Hu-LC (SEQ ID NO: 129 y 130) como cadena ligera común para construir el anticuerpo biespecífico correspondiente. Entre ellos, el anticuerpo control de isotipo es un anticuerpo de IgG4 humana que no se une a PD-1.

Ejemplo 7.2.2 Determinación de la capacidad de anticuerpos híbridos para bloquear la interacción PD-1/PD-L1

El método para detectar la capacidad de anticuerpos para bloquear la interacción PD-1/PD-L1 es tal como sigue: las proteínas de fusión del dominio extracelular de PD-1 humano y PD-L1 con etiquetas Fc humanas se prepararon por los inventores (según el método de preparación descrito en el documento WO2018/137576A1). Las dos proteínas recombinantes se denominaron PD1-ECD-hFc y PD-L1-ECD-hFc, respectivamente. Se preparó el reactivo de etiquetado biotinilado éster de biotina-N-hidroxisuccinimida (adquirido de Sigma, n.º de cat./especificación: H1759-100MG) en licor madre 100 mM con DMSO anhidro; se calculó la cantidad correspondiente de concentración de sustancia basándose en el peso molecular y la concentración de PD-L1-ECD-hFc; se tomó un volumen apropiado de proteína de fusión PD-L1-ECD-hFc y, tras calcular la cantidad de sustancia, se mezcló con éster de biotina-N-hidroxisuccinimida a una relación de 1:20 y se etiquetó a temperatura ambiente durante 1 hora; tras la diálisis, se determinó la concentración de proteína mediante espectrofotometría ultravioleta. Se diluyó PD-1-ECD-hFc humana hasta 2 µg/ml con tampón de recubrimiento, se añadió a una placa ELISA de 96 pocillos con una pipeta de múltiples canales, 100 µl/pocillo, se incubó a temperatura ambiente durante 4 h; la placa se lavó una vez con PBST, se bloqueó con PBST que contenía BSA al 1%, 200 µl/pocillo, se incubó a temperatura ambiente durante 2 h; se desechó la disolución de bloqueo, se secó a golpecitos la placa y se almacenó a 4°C para su uso posterior. Se diluyó PD-L1-ECD-hFc biotinizada con PBST+BSA al 1% (disolución de PBST que contiene albúmina sérica bovina al 1%) hasta 500 ng/ml en una placa de 96 pocillos; el anticuerpo anti-PD-1 se diluyó en serie con la proteína de fusión biotinizada diluida anterior; la disolución mixta del anticuerpo diluido y de la proteína de fusión biotinizada anteriores se transfirió a la placa ELISA anterior recubierta con PD-1-ECD-hFc humana y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; la placa se lavó 3 veces con PBST; se añadió estreptavidina-HRP (adquirida de BD Biosciences) diluida 1:1000 con PBST+BSA al 1%, se incubó a temperatura ambiente durante 45 min; la placa se lavó 3 veces con PBST; se añadió disolución cromogénica (TMB como sustrato), 100 µl/pocillo, se incubó a temperatura ambiente durante 1~5min; se añadió disolución de interrupción para interrumpir la reacción cromogénica, 50 µl/pocillo; se leyeron los valores de DO450 con un lector de microplacas; se realizaron un análisis de datos y una representación gráfica usando GraphPad Prism6, y se calculó la CI50.

Como se muestra en la Fig. 28, Opdivo, 609, 609-HC+ cetuximab-LC, 609-HC+ bevacizumab-LC, 609-HC+ trastuzumab-LC, 609-HC+ pertuzumab-LC, 609-HC+ ipilimumab-LC y 609-HC+ 5E7-Hu-LC pueden bloquear de manera efectiva la interacción entre PD-1 y PD-L1, con CI50 de 0,05729 nM, 0,1309 nM, 0,1199 nM, 0,1191 nM, 0,1162 nM, 0,09876 nM, 0,1052 nM, 0,1312 nM, respectivamente. Entre ellos, el anticuerpo control de isotipo es un anticuerpo de IgG4 humana que no se une a PD-1.

Ejemplo 7.2.3 Determinación de la capacidad de anticuerpos híbridos para potenciar la reacción linfocítica mixta

Entonces se determinó la capacidad de los anticuerpos anteriores para potenciar la reacción linfocítica mixta. Como se muestra en la Fig. 29, 609, 609-HC+ cetuximab-LC, 609-HC+ bevacizumab-LC, 609-HC+ pertuzumab-LC, 609-HC+ ipilimumab-LC y 609-HC+ 5E7-Hu-LC pueden todos estimular de manera efectiva la reacción linfocítica mixta para secretar IL-2, con CE50 de 0,08623 nM, 0,2510 nM, 0,1211 nM, 0,5171 nM, 0,2040 nM y 0,09101 nM, respectivamente. Entre ellos, 609-HC+ trastuzumab-LC no puede estimular de manera efectiva la reacción linfocítica mixta para secretar IL-2. El anticuerpo control de isotipo es un anticuerpo de IgG4 humana que no se une a PD-1.

Ejemplo 7.2.4 Determinación de la capacidad de anticuerpos híbridos para unirse a PD-1 de superficie celular mediante citometría de flujo

La capacidad de los anticuerpos híbridos para unirse a PD-1 en la superficie celular se determinó mediante citometría de flujo. El proceso de establecimiento de células TF-1 que expresan PD-1 es tal como sigue: el gen de PD-1 humano de longitud completa (secuencia de UniProt, entrada: Q15116) se construyó en el vector de expresión lentiviral pLVX-Puro (adquirido de Clontech). El vector de empaquetamiento lentiviral y pLVX-Puro cargados con el gen diana se transfectaron a células HEK293FT (adquiridas de Thermo Fisher Scientific, n.º de cat.: R70007) con Lipofectamine 3000 (adquirida de Thermo Fisher Scientific, n.º de cat.: L3000001), se incubaron en un incubador de células durante 48 horas y entonces se recogió el sobrenadante de cultivo celular y se filtró con una membrana de filtro de 0,45 µm para eliminar el desecho celular. Se infectaron células TF-1 (adquiridas de ATCC, n.º de cat. CRL-2003™) con el sobrenadante anterior que contenía partículas de virus. Tras 48 horas, las células se trataron con puromicina para seleccionar una población celular que expresa de manera estable el gen diana. La línea de células TF-1 que expresa de manera estable PD-1 se denominó TF1-PD1.

El método para detectar la unión de anticuerpos a células mediante citometría de flujo es tal como sigue: se inocularon células TF1-PD1 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (200.000 células por pocillo); tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante, y se añadieron anticuerpos diluidos en serie y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora; las células se lavaron dos veces con PBS; tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y se añadió un anticuerpo FITC (específico de Fc) anti-IgG humana diluido de manera apropiada (adquirido de Sigma, n.º de cat.: F9512) a cada pocillo, y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora; las células se lavaron dos veces con PBS; tras aspirar el sobrenadante, se añadió tampón de fijación I (adquirido de BD Biosciences) para fijar las células y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min; las células se lavaron dos veces con PBS y finalmente se resuspendieron en 200 µl de PBS. La intensidad de fluorescencia del canal de FITC se detectó en el citómetro de flujo; los datos experimentales se procesaron con el software del citómetro de flujo y se exportaron a Excel; se realizaron un análisis de datos y una representación gráfica usando GraphPad Prism6, y se calculó la CE50.

Como se muestra en la Fig. 30, 609, 609-HC+cetuximab-LC, 609-HC+bevacizumab-LC, 609-HC+pertuzumab-LC, 609-HC+ipilimumab-LC y 609-HC+5E7-Hu-LC pueden unirse de manera efectiva a PD-1 en la superficie celular, con CE50 de 0,3761 nM, 0,577 nM, 0,5193 nM, 0,4302 nM, 0,4773 nM y 0,3864 nM, respectivamente. Entre ellos, el efecto de unión de 609-HC+trastuzumab-LC a TF1-PD1 era significativamente más débil que el de otros anticuerpos híbridos. El anticuerpo control de isotipo es un anticuerpo de IgG4 humana que no se une a PD-1.

Ejemplo 7.2.5 Estudio de barrido de alanina del efecto de la CDR de región variable de cadena ligera de 609 sobre la unión de 609 a PD-1

Los resultados experimentales anteriores mostraron que los anticuerpos híbridos producidos mediante la combinación de la cadena pesada de 609 con la cadena ligera de muchos otros anticuerpos diana pueden unirse de manera adicionalmente más efectiva a moléculas de PD-1, y tiene la capacidad de bloquear la interacción PD-1/PD-L1, estimular la reacción linfocítica mixta y la capacidad de unirse a PD-1 en la superficie celular. En el presente documento, se usó barrido de alanina para estudiar el efecto de las CDR de región variable de cadena ligera de 609 en la unión de 609 a PD-1. El método es tal como sigue: los aminoácidos en la cadena ligera CDR de 609 se mutaron a alanina, respectivamente (la alanina original en las CDR no se cambió) y entonces la cadena pesada de 609 se combinó con estos mutantes de cadena ligera, respectivamente, y se expresaron y purificaron los anticuerpos según el método descrito en los ejemplos anteriores, y entonces se determinó la afinidad relativa de los anticuerpos con respecto a PD-1 según el método ELISA descrito en los ejemplos anteriores. Como se muestra en la tabla 3, R24A en 609-HC+609-LC-R24A significa que la arginina en la posición 24 se mutó a alanina, la posición del aminoácido mutado se indicó mediante numeración de Kabat, y el resto puede deducirse mediante analogía.

Tabla 3. Resultados de barrido de alanina de la región variable de cadena ligera de 609

Nombre del anticuerpo	CE50 (nM)
Opdiv o	0,3054
609	0,0980
609-HC+609-LC-R24A	0,0967
609-HC+609-LC-S26A	0,1094
609-HC+609-LC-Q27A	0,1105
609-HC+609-LC-S28A	0,1059
609-HC+609-LC-I29A	0,0969
609-HC+609-LC-S30A	0,1068
609-HC+609-LC-N31A	0,1148
609-HC+609-LC-F32A	0,1547
609-HC+609-LC-L33A	0,1060
609-HC+609-LC-H34A	0,1112
609-HC+609-LC-Y50A	0,1272
609-HC+609-LC-S52A	0,1074
609-HC+609-LC-Q53A	0,1103
609-HC+609-LC-S54A	0,1237
609-HC+609-LC-I55A	0,1140
609-HC+609-LC-S56A	0,1240
609-HC+609-LC-Q89A	0,1322
609-HC+609-LC-Q90A	0,1457
609-HC-609-LC-S91A	0,1334
609-HC+609-LC-N92A	0,0971
609-HC+609-LC-S93A	0,1106
609-HC-609-LC-W94A	0,1045
609-HC+609-LC-P95A	0,1317
609-HC-609-LC-H96A	0,1266
609-HC+609-LC-T97A	0,1143

Como se muestra en la Fig. 31 y la tabla 3, los resultados de barrido de alanina mostraron que la mutación de los aminoácidos de CDR de cadena ligera a alanina no afectaba significativamente a la unión del anticuerpo a PD-1, lo que indica que 609 se une principalmente a moléculas de PD-1 a través de la cadena pesada y es menos dependiente de la cadena ligera.

Ejemplo 7.3 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y EGFR

La región variable de cadena pesada de 609 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de cetuximab-IgG1 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones

variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 609-Fab-cetuximab-IgG4 (SEQ ID NO: 131 y 132).

Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, la 609-Fab-cetuximab-IgG4 se combinó con el vector de expresión cetuximab-LC, y se expresó y purificó al anticuerpo. El anticuerpo obtenido se denominó 609-Fab-cetuximab-IgG4 (por brevedad, se usa solo el nombre de la cadena pesada como nombre del anticuerpo).

El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de PD-1 humano con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10377-H08H), y la proteína recombinante del segmento extracelular de EGFR humana con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10001-H08H), y las dos proteínas recombinantes se denominaron PD1-ECD-His y EGFR-ECD-His, respectivamente. Una placa ELISA se recubrió con PD1-ECD-His y EGFR-ECD-His, con una concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo y 20 ng/pocillo, respectivamente.

Como se muestra en la Fig. 32^a, tanto 609-HC+cetuximab-LC como 609-Fab-cetuximab-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,7172 nM y 0,2616 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 32B, tanto cetuximab-IgG1 como 609-Fab-cetuximab-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a EGFR-ECD-His, con CE50 de 0,07609 nM y 0,09327 nM, respectivamente. Los resultados anteriores mostraron que 609-Fab-cetuximab-IgG4 puede unirse tanto a PD-1 como a EGFR, lo que indica que es un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 7.4 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y HER-2

La región variable de cadena pesada de 609 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de pertuzumab-IgG1 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 609-Fab-pertuzumab-IgG4 (SEQ ID NO: 133 y 134).

Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente, la 609-Fab-pertuzumab-IgG4 se combinó con el vector de expresión pertuzumab-LC, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. El anticuerpo obtenido se denominó 609-Fab-pertuzumab-IgG4 (por brevedad, se usa solo el nombre de la cadena pesada como nombre del anticuerpo).

El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de PD-1 humano con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10377-H08H), y la proteína recombinante del segmento extracelular de Her-2 humana con una etiqueta de polihistidina se adquirió de ACROBiosystems (n.º de cat.: HE2-H5225), y las dos proteínas recombinantes se denominaron PD1-ECD-His y HER2-ECD-His. Una placa ELISA se recubrió con PD1-ECD-His y HER2-ECD-His, ambos con una concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo.

Como se muestra en la Fig. 33^a, tanto 609-HC+pertuzumab-LC como 609-Fab-pertuzumab-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,1422 nM y 0,1196 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 33B, tanto pertuzumab-IgG1 como 609-Fab-pertuzumab-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a HER2-ECD-His, con CE50 de 0,5352 nM y 2,616 nM, respectivamente. Los resultados anteriores mostraron que 609-Fab-pertuzumab-IgG4 pueden unirse tanto a PD-1 como a HER-2, lo que indica que es un anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 7.5 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4

Ejemplo 7.5.1 Construcción de anticuerpos biespecíficos

La región variable de cadena pesada de 609 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de ipilimumab-IgG1 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (CH1+CH2+CH3). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 609-Fab-ipilimumab-IgG1 (SEQ ID NO: 135 y 136). De manera similar, la región variable de cadena pesada de ipilimumab-IgG1 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 609 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (CH1+CH2+CH3). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó ipilimumab-Fab-609-IgG1 (SEQ ID NO: 137 y 138).

La región variable de cadena pesada de 609 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de ipilimumab-IgG1 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones

variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 609-Fab-ipilimumab-IgG4 (SEQ ID NO: 139 y 140). De manera similar, la región variable de cadena pesada de ipilimumab-IgG1 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 609 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construidos mediante tales procedimientos se denominó ipilimumab-Fab-609-IgG4 (SEQ ID NO: 141 y 142).

Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, respectivamente. 609-Fab-ipilimumab-IgG1, ipilimumab-Fab-609-IgG1, 609-Fab-ipilimumab-IgG4 e ipilimumab-Fab-609-IgG4 se combinaron con el vector de expresión ipilimumab-LC, respectivamente, y se expresaron y purificaron los anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 609-Fab-ipilimumab-IgG1, ipilimumab-Fab-609-IgG1, 609-Fab-ipilimumab-IgG4 e ipilimumab-Fab-609-IgG4 (por brevedad, se usa solo el nombre de la cadena pesada como nombre del anticuerpo).

El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de PD-1 humano con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10377-H08H), y la proteína recombinante del segmento extracelular de CTLA-4 humano con etiquetas Fc humanas se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 11159-H31H5), y las dos proteínas recombinantes se denominaron PD1-ECD-His y CTLA4-ECD-Fc. Una placa ELISA se recubrió con PD1-ECD-His y CTLA4-ECD-Fc, respectivamente, ambos con una concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo.

Como se muestra en la Fig. 34^a, 609-HC+ipilimumab-LC, 609-Fab-ipilimumab-IgG1, ipilimumab-Fab-609-IgG1, 609-Fab-ipilimumab-IgG4 e ipilimumab-Fab-609-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,2337 nM, 0,1734 nM, 0,7954 nM, 0,2078 nM y 0,9643 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 34B, ipilimumab-IgG1, 609-Fab-ipilimumab-IgG1, ipilimumab-Fab-609-IgG1, 609-Fab-ipilimumab-IgG4 e ipilimumab-Fab-609-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a CTLA4-ECD-Fc, con CE50 de 0,8354 nM, 2,123 nM, 0,3376 nM, 2,626 nM y 0,392 nM, respectivamente. Los resultados anteriores mostraron que 609-Fab-ipilimumab-IgG1, ipilimumab-Fab-609-IgG1, 609-Fab-ipilimumab-IgG4 e ipilimumab-Fab-609-IgG4 pueden unirse tanto a PD-1 como a CTLA-4, lo que indica que son anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 7.5.2 Determinación de la actividad funcional de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4

Se añadieron los siguientes aditivos a RPMI 1640 para preparar medio completo RPMI 1640: suero bovino fetal al 10%; disolución de aminoácidos no esenciales MEM al 1%; piruvato de sodio al 1%; HEPES al 1%; 2-mercaptoetanol al 1%; penicilina-estreptomocina al 1%; GlutaMAX al 1% (los aditivos anteriores se adquirieron de Thermo Fisher Scientific). Se lavaron PBMC recién aisladas (adquiridas de Allcells, n.º de cat.: PB005-C) y se resuspendieron con el medio completo RPMI 1640 anterior, y se añadió una cierta cantidad de superantígeno enterotoxina B estafilocócica (SEB). El superantígeno se preparó usando *E. coli* por los inventores (la secuencia de aminoácidos de SEB se deriva de <https://www.uniprot.org/uniprot/P01552>). La suspensión de células PBMC se inoculó en una placa de cultivo celular de 96 pocillos de fondo redondo, con 150 µl de suspensión y 200.000 células por pocillo; se añadieron 50 µl de anticuerpo diluido en serie a la placa de 96 pocillos anterior; se puso la placa de 96 pocillos en un incubador de células a 37°C y se incubó durante 4 días. Se tomó una cantidad apropiada de sobrenadante de cultivo celular de la placa de 96 pocillos y entonces se determinó la secreción de IL-2 según procedimientos operativos estándar. La IL-2 en el sobrenadante se determinó mediante ELISA de tipo sándwich (los anticuerpos emparejados para la detección relacionada se adquirieron de BD Biosciences). Se leyó la DO450 con un lector de microplacas (SpectraMax 190), se realizó una representación gráfica usando graphPad Prism6 y se calculó la CE50.

Tabla 4. Parámetros de actividad funcional de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4

Anticuerpo	CE50 (nM)	Parte superior
609	0,0682	9269
609-HC+ipilimumab-LC	0,06578	8546
ipilimumab-IgG1	0,07534	9700
ipilimumab-Fab-609-IgG4	0,5292	9115
609-Fab-ipilimumab-IgG4	0,1267	10441
ipilimumab-Fab-609-IgG1	0,1173	11416
609-Fab-ipilimumab-IgG1	0,05802	15237
609-HC+ipilimumab-LC/ipilimumab-IgG1	0,06863	14447

Como se muestra en la Fig. 35 y la tabla 4, 609, 609-HC+ipilimumab-LC e ipilimumab-IgG1 tienen una CE50 y una parte superior (plataforma alta) comparables, lo que indica que estos tres anticuerpos tienen actividades funcionales similares. De más a menos, las actividades funcionales de los anticuerpos biespecíficos anti-PD-1 y CTLA-4 se clasifican tal como sigue: 609-Fab-ipilimumab-IgG1>ipilimumab-Fab-609-IgG1> 609-Fab-ipilimumab-IgG4>ipilimumab-Fab-609-IgG4. La actividad funcional de 609-Fab-ipilimumab-IgG1 e ipilimumab-Fab-609-IgG1 era significativamente mejor que la de los anticuerpos monoclonales 609 e ipilimumab-IgG1, y el anticuerpo híbrido 609-HC+ipilimumab-LC, pero era similar al

efecto de la aplicación de combinación de 609-HC+ipilimumab-LC e ipilimumab-IgG1 (609-HC+ipilimumab-LC/ipilimumab-IgG1 significa que los dos anticuerpos se usan en combinación a una relación de cantidad de sustancia de 1:1).

Ejemplo 7.5.3 Determinación de la actividad ADCC de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es una función universal de los anticuerpos de IgG humana, y la intensidad de la ADCC se refiere al subtipo de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4 de subtipo IgG1 pueden tener citotoxicidad potencial para las células que expresan PD-1. En el presente documento, se usaron PBMC recién aisladas (adquiridas de Allcells, n.º de cat.: PB005-C) como células efectoras y se usaron células TF-1 que expresan PD-1 como células diana para determinar la ADCC.

Como se muestra en la Fig. 36, el anticuerpo control de isotipo IgG4 (un anticuerpo monoclonal que no se une a PD-1 y CTLA-4) no mostró ADCC significativa. Ipilimumab-IgG1 no mostró un efecto de ADCC significativo, porque las células TF1-PD1 no expresan CTLA-4. 609 tenía una ADCC débil (con región constante de cadena pesada de subtipo IgG4, lisis de células diana de hasta aproximadamente el 10%), 609-IgG1 tenían una ADCC fuerte (reemplazando la región constante de cadena pesada de 609 con subtipo IgG1, con la lisis de células diana de hasta aproximadamente el 50%), porque las regiones constantes de cadena pesada de los dos son IgG4 y IgG1, respectivamente, y IgG1 tiene habitualmente una actividad ADCC más fuerte que IgG4. La ADCC de 609-Fab-ipilimumab-IgG1 era similar a la de 609, y la ADCC de ipilimumab-Fab-609-IgG1 era similar a la de 609-IgG1. La ADCC de 609-Fab-ipilimumab-IgG1 era significativamente más débil que la de ipilimumab-Fab-609-IgG1, lo que puede estar relacionado con el ordenamiento espacial de anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 7.5.4 Farmacocinéticas de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4 en ratas

Las farmacocinéticas de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4 en ratas se determinó mediante el método descrito en el ejemplo 1.7.5. La diferencia es que la placa ELISA se recubrió con los dos antígenos relacionados correspondientes a los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4 (las fuentes de PD1-ECD-His y CTLA4-ECD-Fc son tal como se describen en el ejemplo 7.5.1).

Como se muestra en la Fig. 37, se calculó que la semivida de 609-Fab-ipilimumab-IgG1 era de 15,2 días (resultado de detección con PD-1 como antígeno) y de 14,6 días (resultado de detección con CTLA-4 como antígeno). Los resultados anteriores indican que 609-Fab-ipilimumab-IgG1 tiene buenas propiedades farmacocinéticas.

Ejemplo 7.5.5 Efecto antitumoral de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y CTLA-4 en ratones

Se adquirieron ratones transgénicos dobles con PD-1/CTLA-4 humano (el fondo de línea germinal es C57BL/6) de Beijing Biocytogen Technology Co. Ltd., y se adquirieron células de cáncer colorrectal de ratón MC38 de Guangzhou Jennio Biotech Co., Ltd. En los ratones transgénicos dobles con PD-1/CTLA-4, los segmentos extracelulares de los genes PD-1 humano y CTLA-4 se usaron para reemplazar las partes homólogas del ratón, así que el anticuerpo biespecífico de la presente invención puede reconocer PD-1 y CTLA-4 en los ratones transgénicos. Las etapas de implementación específicas son tal como sigue: se cultivaron *in vitro* células MC38 con DMEM que contiene suero al 10% (suero y medio adquiridos de Gibco); las células MC38 cultivadas se inocularon en ratones transgénicos con PD-1 humano, a cada ratón se le inocularon 2×10^6 células por vía subcutánea; cuando las células tumorales que debían inocularse crecieron hasta un volumen próximo a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos, con 8 ratones en cada grupo. El tratamiento farmacológico de ratones en cada grupo es tal como sigue: grupo control, solo inyectado con solución salina normal; grupo de 609, inyectado con 10 mg/kg de anticuerpo anti-PD-1 609; grupo de Yervoy, inyectado con 10 mg/kg de anticuerpo control positivo anti-CTLA-4 Yervoy (producido por Bristol-Myers Squibb); grupo de 609+Yervoy, inyectado con 10 mg/kg de 609 y 10 mg/kg de Yervoy; grupo de 609-Fab-ipilimumab-IgG1, inyectado con 16 mg/kg de 609-Fab-ipilimumab-IgG1. Teniendo en cuenta la diferencia en peso molecular entre anticuerpos biespecíficos y anticuerpos monoclonales, la dosis del fármaco en este experimento se proporcionó según la regla de cantidad igual de sustancia. Posteriormente, los fármacos se administraron según el régimen diseñado anteriormente, dos veces a la semana durante un total de 4 veces, y el volumen tumoral se midió dos veces a la semana. Finalmente, las curvas de crecimiento de tumores en cada grupo determinadas a lo largo del tiempo se muestran en la Fig. 38.

Los resultados mostraron que al final del 14º día, las tasas de inhibición tumoral de los grupos de 609, Yervoy, 609+Yervoy y 609-Fab-ipilimumab-IgG1 eran del 48,6%, del 79,1%, del 85,9% y del 92,2%, respectivamente (tasa de inhibición tumoral = (volumen medio del grupo control - volumen medio del grupo experimental) / volumen medio del grupo control \times 100%). En comparación con el agente único 609 o Yervoy, 609-Fab-ipilimumab-IgG1 puede inhibir el crecimiento tumoral de manera más efectiva. El efecto terapéutico de 609-Fab-ipilimumab-IgG1 era similar al de la combinación de 609 y Yervoy.

Ejemplo 7.6 Construcción de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3

Ejemplo 7.6.1 Construcción de anticuerpos biespecíficos

La región variable de cadena pesada de 609 se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 5E7-Hu a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS

en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 609-Fab-5E7-IgG4 (SEQ ID NO: 143 y 144). De manera similar, la región variable de cadena pesada de 5E7-Hu se conectó al dominio CH1 de IgG4 humana, y entonces se conectó a la región variable de cadena pesada de 609 a través de un ligador artificial (el ligador usado en este caso es tres GGGGS en tándem) y se conectó finalmente a la región constante de cadena pesada de IgG4 humana (CH1+CH2+CH3, con la mutación S228P en la región bisagra). La cadena pesada larga que contiene dos regiones variables de cadena pesada y dos dominios CH1 construida mediante tales procedimientos se denominó 5E7-Fab-609-IgG4 (SEQ ID NO: 145 y 146).

Las secuencias anteriores se construyeron en el vector de expresión pcDNA3.4, 609-Fab-5E7-IgG4 y 5E7-Fab-609-IgG4 se combinaron con el vector de expresión 5E7-Hu-LC, respectivamente. Los anticuerpos se expresaron y purificaron usando el método descrito en los ejemplos anteriores. Los anticuerpos obtenidos se denominaron 609-Fab-5E7-IgG4 y 5E7-Fab-609-IgG4, respectivamente (por brevedad, se usa solo el nombre de la cadena pesada como nombre del anticuerpo).

El método de detección ELISA es tal como sigue: la proteína recombinante del segmento extracelular de PD-1 humano con una etiqueta de polihistidina se adquirió de Sino Biological (n.º de cat.: 10377-H08H), y la proteína recombinante del segmento extracelular de LAG-3 humano con una etiqueta de polihistidina se adquirieron de Sino Biological (n.º de cat.: 16498-H08H). Las dos proteínas recombinantes se denominaron PD1-ECD-His y LAG3-ECD-His, respectivamente. Una placa ELISA se recubrió con PD1-ECD-His y LAG3-ECD-His, respectivamente, ambos con la concentración de recubrimiento de 10 ng/pocillo.

Como se muestra en la Fig. 39A, 609-HC+5E7-Hu-LC, 609-Fab-5E7-IgG4 y 5E7-Fab-609-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a PD1-ECD-His, con CE50 de 0,1523 nM, 0,161 nM y 0,8138 nM, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 39B, 5E7-Hu, 609-Fab-5E7-IgG4 y 5E7-Fab-609-IgG4 pueden unirse de manera efectiva a LAG3-ECD-His, con CE50 de 0,1472 nM, 0,2082 nM y 0,1529 nM, respectivamente. Los resultados anteriores mostraron que 609-Fab-5E7-IgG4 y 5E7-Fab-609-IgG4 pueden unirse tanto a PD-1 como a LAG-3, lo que indica que son anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo 7.6.2 Determinación de la capacidad de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3 para unirse simultáneamente a dos antígenos

Se recubrió una microplaca con LAG3-ECD-His. El anticuerpo que debe someterse a prueba se diluyó en serie con PBST que contiene albúmina sérica bovina al 1%, entonces se transfirió a la microplaca anterior y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente media hora. Las etapas experimentales posteriores eran las mismas que se describieron en el ejemplo 1.7.4.

Como se muestra en la Fig. 40, 609-Fab-5E7-IgG4 puede unirse de manera adicionalmente efectiva a PD-1 humano tras la unión a LAG-3, con una CE50 de 0,5294 nM. Ni 5E7-Hu ni 609-HC+5E7-Hu-LC pueden unirse simultáneamente a PD-1 y LAG-3.

Ejemplo 7.6.3 Determinación de la actividad funcional de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3

En el presente documento, la actividad funcional de los anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3 se determinó según el método descrito en el ejemplo 7.5.2.

Tabla 5. Parámetros de actividad funcional de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3

Anticuerpo	CE50(nM)	Parte superior
5E7-Hu	0,2835	3851
609	0,0271	7473
609-HC+5E7-Hu-LC	0,0247	6836
609-Fab-5E7-IgG4	0,1333	12765
5E7-Hu/609-HC+5E7-Hu-LC	0,0719	11661

Como se muestra en la Fig. 41 y la tabla 5, 5E7-Hu puede estimular solo débilmente la secreción de IL-2. 609 y 609-HC+5E7-Hu-LC tenían CE50 y parte superior (plataforma alta) comparables, lo que indica que las dos tienen una actividad funcional similar. Cuando la concentración era mayor que 1 nM, la capacidad de 609-Fab-5E7-IgG4 para estimular secreción de IL-2 era significativamente mayor que la de los anticuerpos monoclonales 5E7-Hu y 609 y el anticuerpo híbrido 609-HC+5E7-Hu-LC, pero era similar al efecto de la combinación de 5E7-Hu y 609-HC+5E7-Hu-LC (5E7-Hu/609-HC+5E7-Hu-LC significa que los dos anticuerpos se usan en combinación a una relación de 1:1).

Ejemplo 7.6.4 Efecto antitumoral de anticuerpos biespecíficos frente a PD-1 y LAG-3 en ratones

Se adquirieron ratones transgénicos dobles con PD-1/LAG-3 humano (el fondo de línea germinal es C57BL/6) de Beijing Biocytogen Technology Co. Ltd., y se adquirieron células de cáncer colorrectal de ratón MC38 de Guangzhou Jennio Biotech Co., Ltd. En los ratones transgénicos dobles con PD-1/LAG-3, los segmentos extracelulares de los genes PD-1 y LAG-3 humanos se usaron para reemplazar las partes homólogas del ratón, así que el anticuerpo biespecífico de la presente invención puede reconocer PD-1 y LAG-3 en los ratones transgénicos. Las etapas de implementación específicas son tal como sigue: se cultivaron *in vitro* células MC38 con DMEM que contiene suero al 10% (suero y medio adquiridos de Gibco); las células MC38 cultivadas se inocularon en ratones transgénicos con PD-1 humano, cada ratón se inoculó con 2×10^6 células por vía subcutánea; cuando las células tumorales que debían inocularse crecieron hasta un volumen próximo a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos, con 8 ratones en cada grupo. El tratamiento farmacológico de ratones en cada grupo es tal como sigue: grupo control, solo inyectado con solución salina normal; grupo de 609, inyectado con 20 mg/kg de anticuerpo anti-PD-1 609; grupo de 5E7-Hu, inyectado con 20 mg/kg de anticuerpo anti-LAG-3 5E7-Hu; grupo de 609+5E7-Hu, inyectado con 20 mg/kg de 609 y 20 mg/kg de 5E7-Hu; grupo de 609-Fab-5E7-IgG4, inyectado con 32 mg/kg de 609-Fab-5E7-IgG4. Teniendo en cuenta la diferencia en peso molecular entre anticuerpos biespecíficos y anticuerpos monoclonales, la dosis del fármaco en este experimento se proporcionó según la regla de cantidad igual de sustancia. Posteriormente, los fármacos se administraron según el régimen diseñado anteriormente, dos veces a la semana for a total de 4 veces, y el volumen tumoral se midió dos veces a la semana. Finalmente, las curvas de crecimiento de tumores en cada grupo determinadas a lo largo del tiempo se muestran en la Fig. 42.

Los resultados mostraron que al final del 14^o día del experimento, las tasas de inhibición tumoral de los grupos de 609, 5E7-Hu, 609+5E7-Hu y 609-Fab-5E7-IgG4 eran del 70,8%, del 13,1%, del 71,5% y del 82,8%, respectivamente (tasa de inhibición tumoral = (volumen medio del grupo control - volumen medio del grupo experimental) / volumen medio del grupo control \times 100%). En comparación con el agente único 609 o 5E7-Hu, 609-Fab-5E7-IgG4 puede inhibir el crecimiento tumoral de manera más efectiva. La combinación de 609 y 5E7-Hu no era más efectiva que el agente único 609. Por tanto, puede especularse que 609-Fab-5E7-IgG4 como anticuerpo biespecífico frente a PD-1 y LAG-3 presenta un efecto sinérgico.

Ejemplo 7.7 Determinación de la especificidad de anticuerpos híbridos

El método de detección ELISA es tal como sigue: se usaron los antígenos relevantes mencionados en los ejemplos anteriores (EGFR-ECD-His, VEGF165-His, HER2-ECD-His, LAG3-ECD-His y CTLA4-ECD-Fc) para recubrir una placa ELISA, respectivamente, según las condiciones experimentales descritas anteriormente, y entonces se detectó si los anticuerpos híbridos que comprenden la cadena pesada de 609 y la cadena ligera de otros anticuerpos diana pueden reconocer tales dianas. Las fuentes de los anticuerpos tales como cetuximab-IgG1, 601, trastuzumab-IgG1, 5E7-Hu e ipilimumab-IgG1 se describieron en los ejemplos anteriores (la fuente de la región variable de trastuzumab-IgG1 es tal como se describe en el ejemplo 7.1, la región constante es la misma que la de ipilimumab-IgG1, y el método de preparación es el mismo que el de otros anticuerpos). En el presente documento, se usaron como anticuerpos control positivos que se unen a diversos antígenos, respectivamente.

Las Figs. 43A a 43E mostraron que los anticuerpos híbridos que comprenden la cadena pesada de 609 y la cadena ligera de otros anticuerpos diana no pueden reconocer otras dianas, lo que indica que estos anticuerpos híbridos tienen una buena especificidad.

Ejemplo 7.8 HPLC-SEC

La Fig. 44A muestra el patrón de HPLC-SEC de 609-Fab-cetuximab-IgG4, representando el pico principal el 99,13%. La Fig. 44B muestra el patrón de HPLC-SEC de 609-Fab-pertuzumab-IgG4, representando el pico principal el 99,2%. La Fig. 44C muestra el patrón de HPLC-SEC de 609-Fab-ipilimumab-IgG1, representando el pico principal el 99,3%. La Fig. 44D muestra el patrón de HPLC-SEC de ipilimumab-Fab-609-IgG1, representando el pico principal el 99,2%. La Fig. 44E muestra el patrón de HPLC-SEC de 609-Fab-ipilimumab-IgG4, representando el pico principal el 99,3%. La Fig. 44F muestra el patrón de HPLC-SEC de ipilimumab-Fab-609-IgG4, representando el pico principal el 99,1%. La Fig. 44G muestra el patrón de HPLC-SEC de 609-Fab-5E7-IgG4, representando el pico principal el 99,2%. La Fig. 44H muestra el patrón de HPLC-SEC de 5E7-Fab-609-IgG4, representando el pico principal el 99,0%.

Ejemplo 7.9 HPLC-IEC

La Fig. 45A muestra el patrón de HPLC-IEC de 609-Fab-ipilimumab-IgG1, representando el pico principal el 83,52%. Los resultados indican que 609-Fab-ipilimumab-IgG1 tiene una buena heterogeneidad de carga.

La Fig. 45B muestra el patrón de HPLC-IEC de 609-Fab-5E7-IgG4, representando el pico principal el 85,43%. Los resultados indican que 609-Fab-5E7-IgG4 tiene una buena heterogeneidad de carga.

Ejemplo 7.10 CE-SDS

Las Figs. 46A y 46B muestran los patrones de NR-CE-SDS y R-CE-SDS de 609-Fab-ipilimumab-IgG1, respectivamente. En el patrón de NR-CE-SDS, el pico principal pico 13 representaba el 97,02%; en el patrón de R-CE-SDS, los dos picos

principales pico 2 (correspondiente a la cadena ligera) y pico 12 (correspondiente a la cadena pesada larga) representaban el 39,14% y el 59,13%, respectivamente, y la relación de las dos áreas de pico era 2:3,0. En el patrón de R-CE-SDS, la relación de las áreas de pico de la cadena ligera y la cadena pesada larga de 609-Fab-ipilimumab-IgG1 era consistente con las expectativas.

5

Las Figs. 46C y 46D muestran los patrones de NR-CE-SDS y R-CE-SDS de 609-Fab-5E7-IgG4, respectivamente. En el patrón de NR-CE-SDS, el pico principal pico 11 representaba el 94,73%; en el patrón de R-CE-SDS, los dos picos principales pico 7 (correspondiente a la cadena ligera) y pico 16 (correspondiente a la cadena pesada larga) representaban el 38,32% y el 59,58%, respectivamente, y la relación de las dos áreas de pico era 2:3,1. En el patrón de R-CE-SDS, la relación de las áreas de pico de la cadena ligera y la cadena pesada larga de 609-Fab-5E7-IgG4 era consistente con las expectativas.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1.Un anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF, comprendiendo el anticuerpo biespecífico tetravalente dos cadenas polipeptídicas y cuatro cadenas ligeras comunes, mostrándose una secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica como SEQ ID NO. 21 y mostrándose una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera común como SEQ ID NO. 13.
- 10 2.Un nucleótido aislado, codificando el nucleótido el anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF según la reivindicación 1.
- 3.El nucleótido aislado según la reivindicación 2, en el que una secuencia del nucleótido que codifica la cadena polipeptídica se muestra como SEQ ID NO. 22 y una secuencia del nucleótido que codifica la cadena ligera común se muestra como SEQ ID NO. 14.
- 15 4.Un vector de expresión, comprendiendo el vector de expresión el nucleótido según la reivindicación 2 o la reivindicación 3.
- 20 5.Una célula huésped, comprendiendo la célula huésped el nucleótido aislado según la reivindicación 2 o la reivindicación 3 o el vector de expresión según la reivindicación 4.
- 6.Una composición farmacéutica, comprendiendo la composición farmacéutica el anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF según la reivindicación 1.
- 25 7.El anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica según la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento de cáncer, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias.
- 30 8.El anticuerpo biespecífico tetravalente o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, usándose el anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF o la composición farmacéutica para tratar cáncer.
- 35 9.Un método de preparación del anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF según la reivindicación 1, comprendiendo el método las siguientes etapas:
a) construir el vector de expresión según la reivindicación 4 y transformar una célula huésped;
b) cultivar la célula huésped de la etapa a) en condiciones de expresión, para expresar el anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF;
c) aislar y purificar el anticuerpo biespecífico tetravalente frente a PD-1 y VEGF de la etapa b).

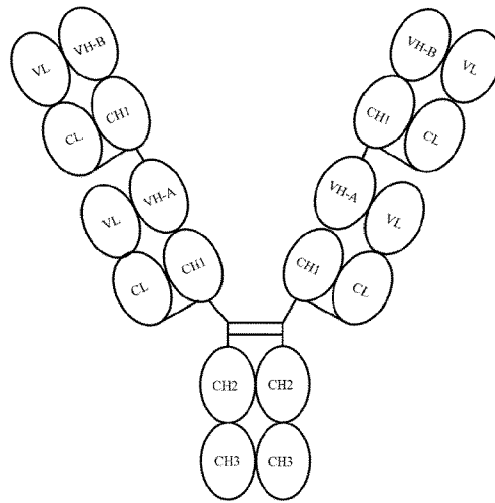


Fig. 1

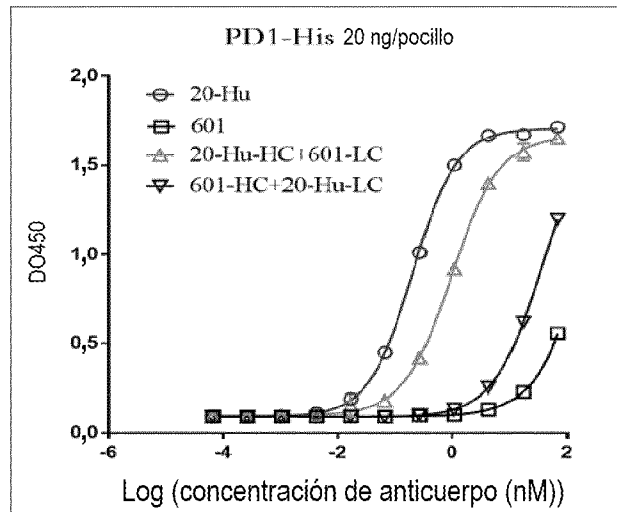


Fig. 2A

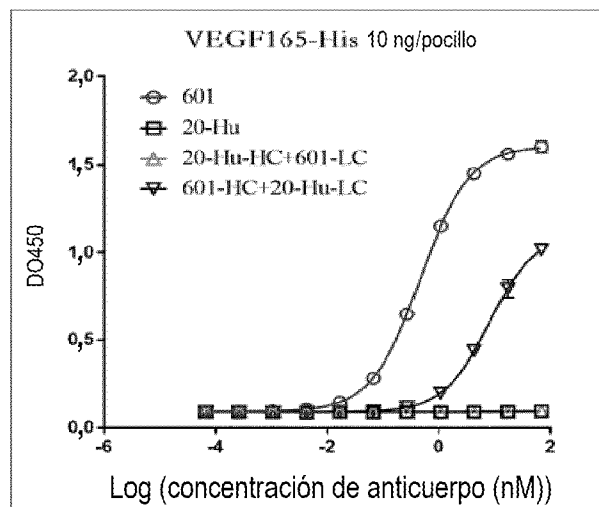


Fig. 2B

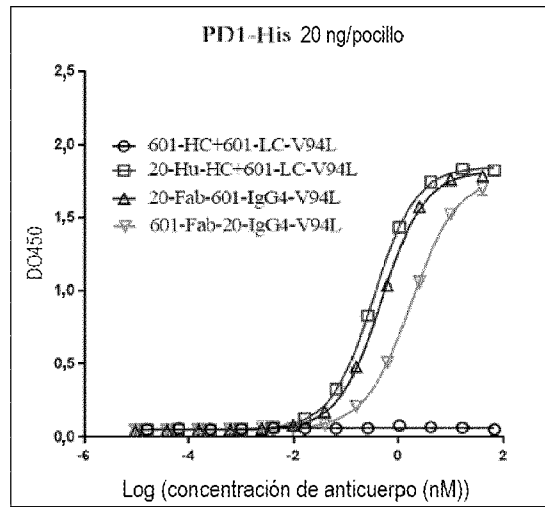


Fig. 3A

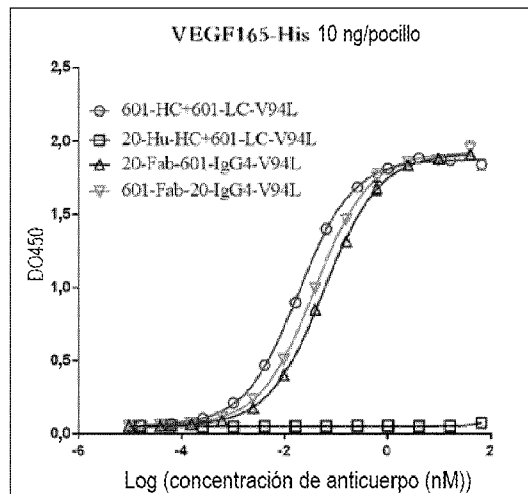


Fig. 3B

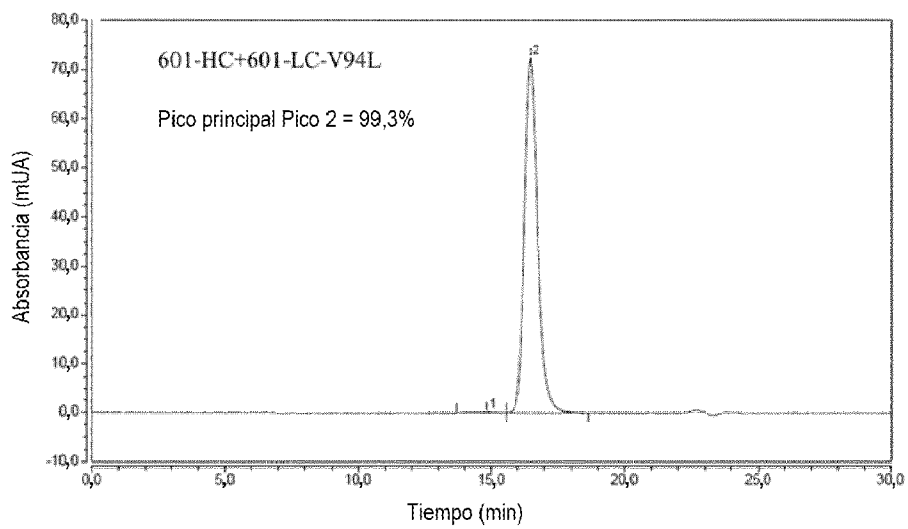


Fig. 4A

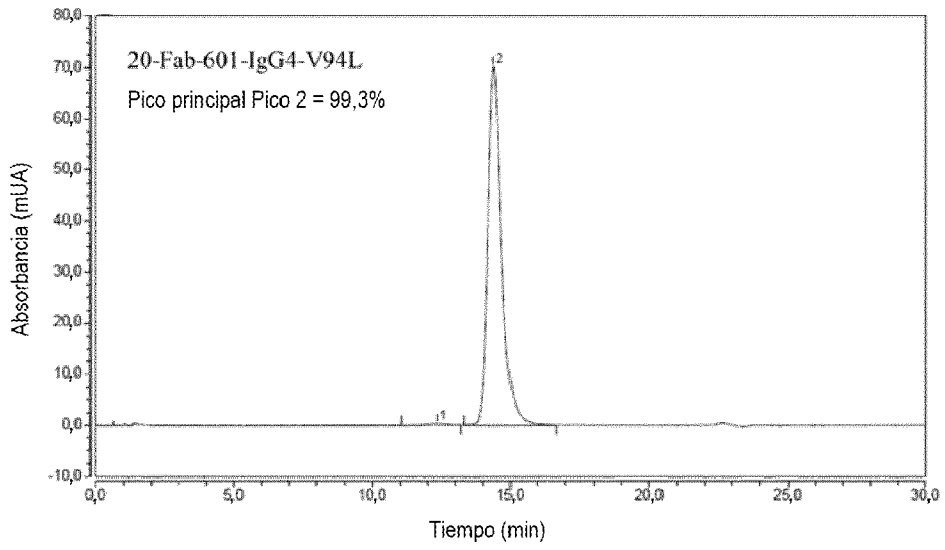


Fig. 4B

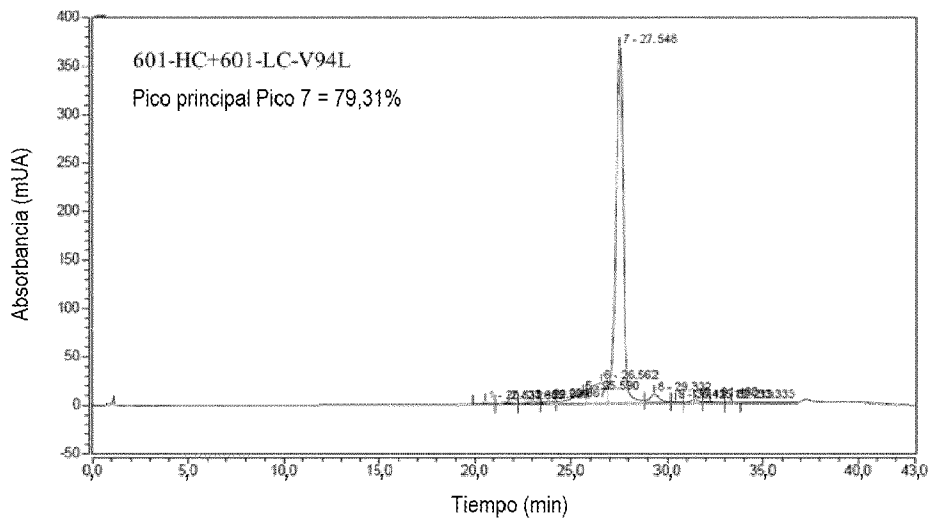


Fig. 5A

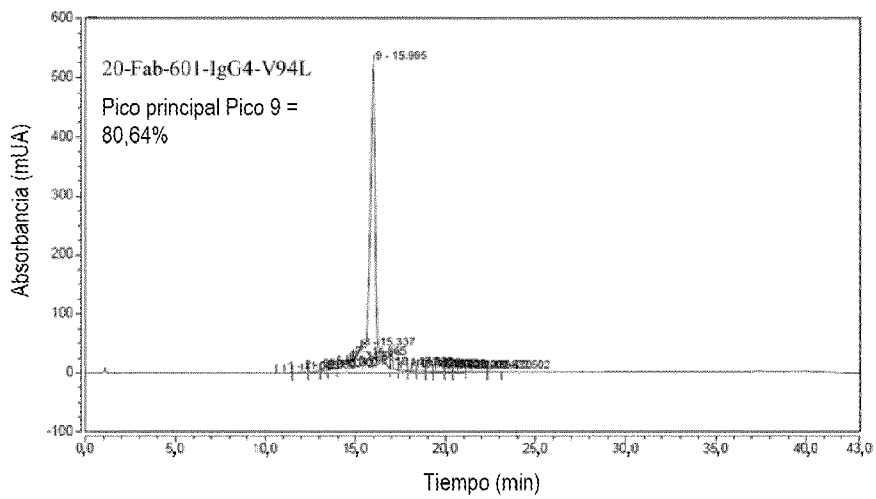


Fig. 5B

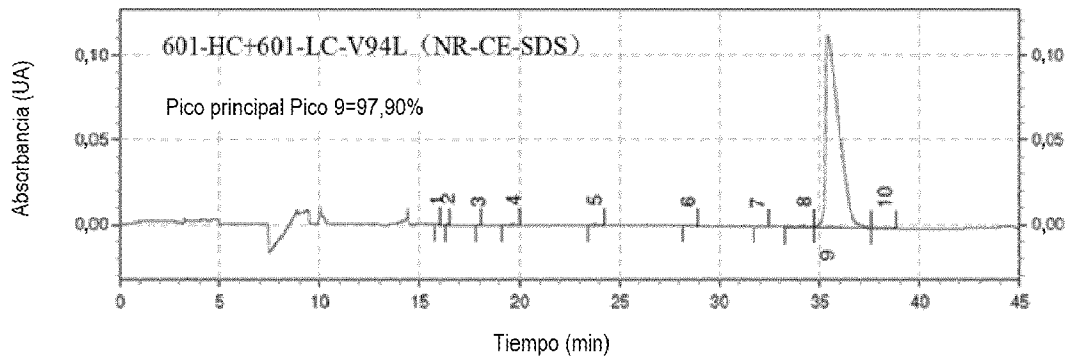


Fig. 6A

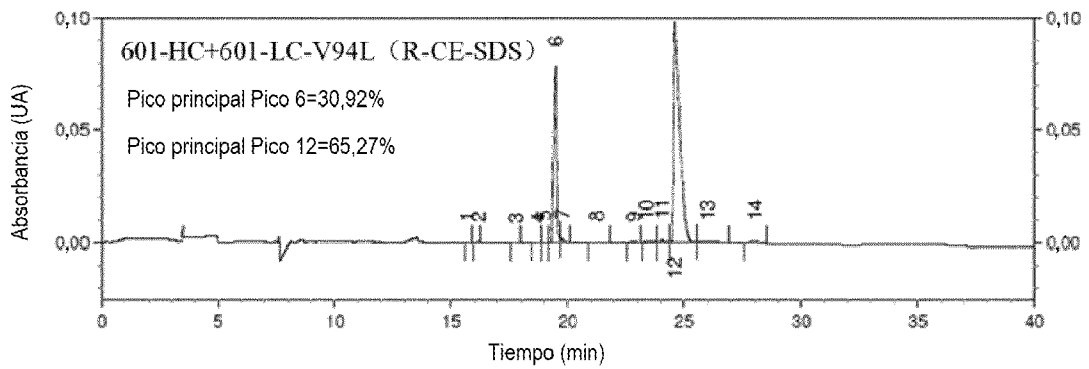


Fig. 6B

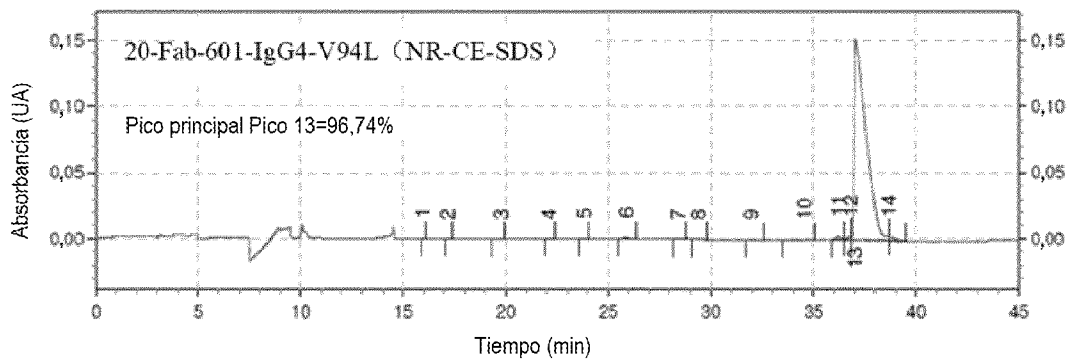


Fig. 6C

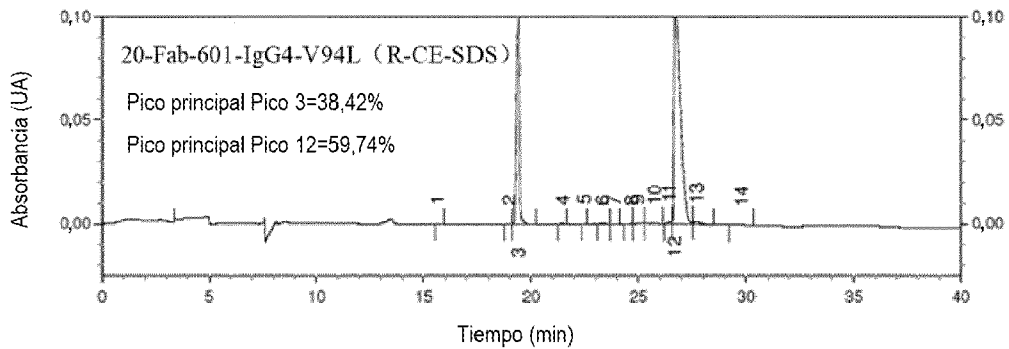


Fig. 6D

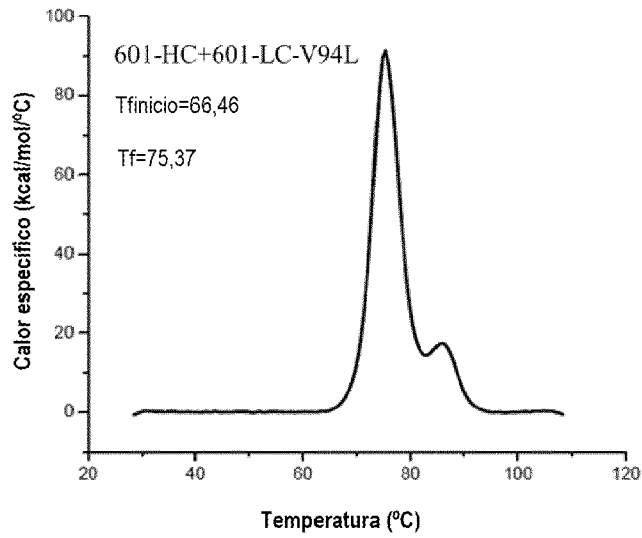


Fig. 7A

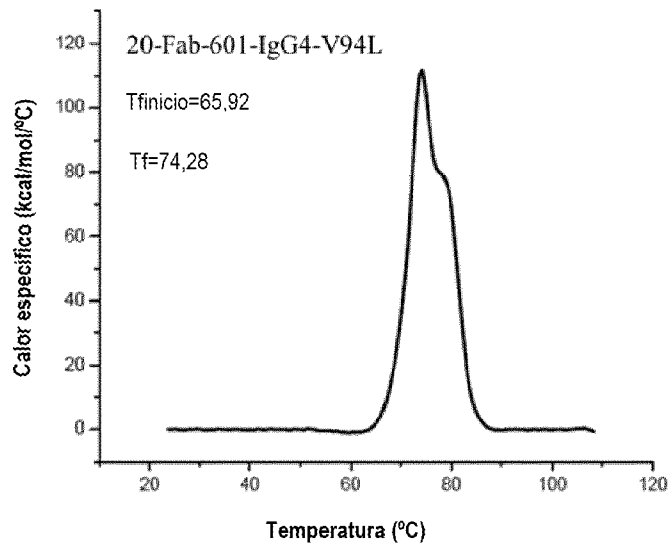


Fig. 7B

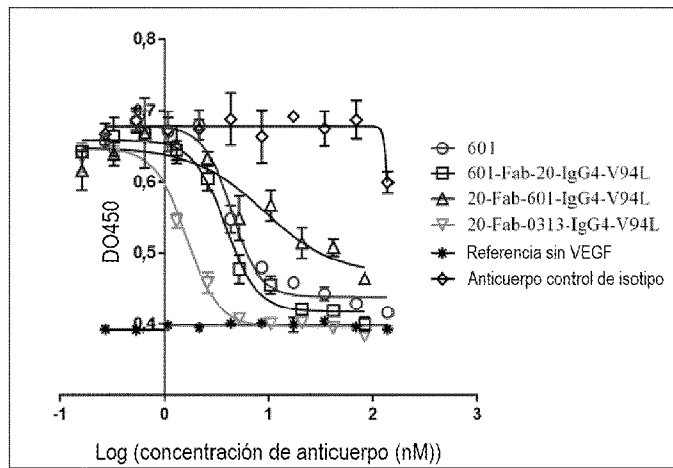


Fig. 8

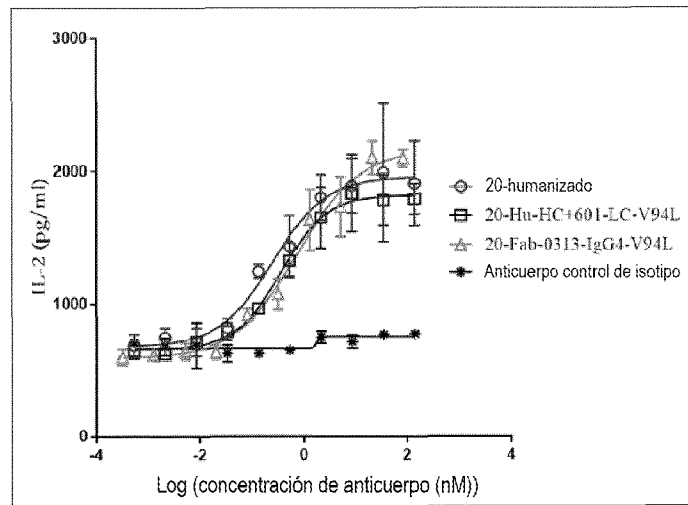


Fig. 9A

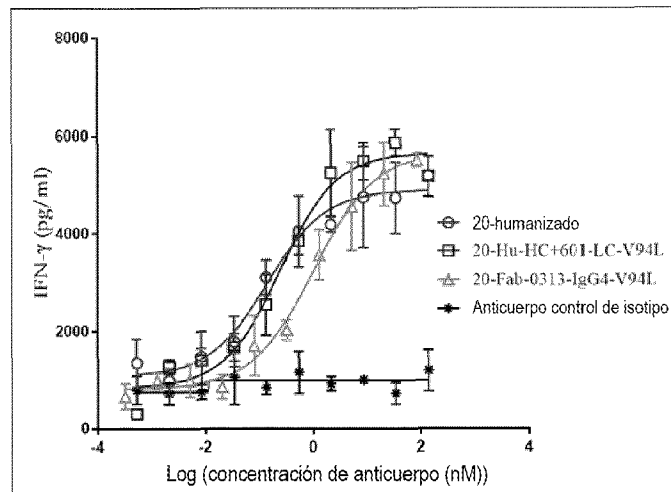


Fig. 9B

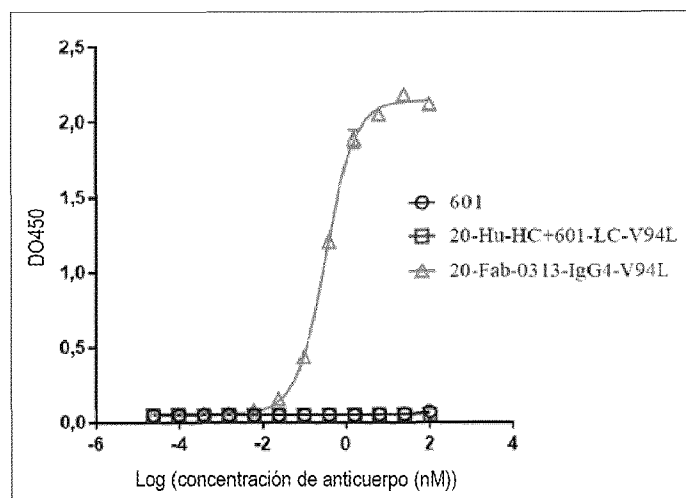


Fig. 10

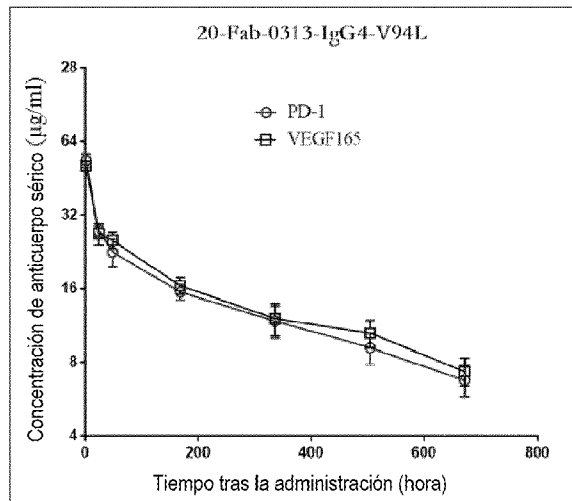


Fig. 11

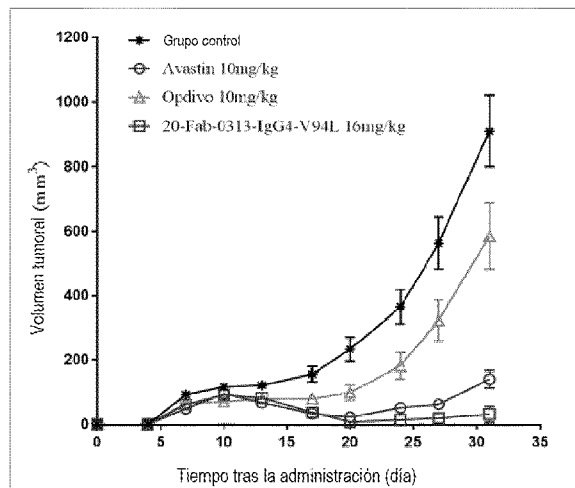


Fig. 12

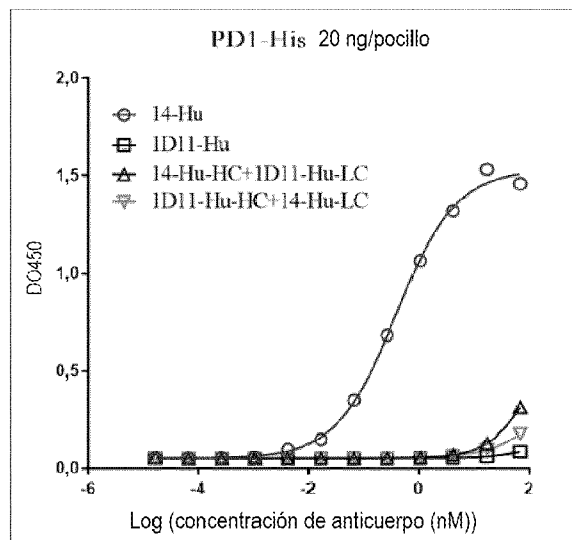


Fig. 13A

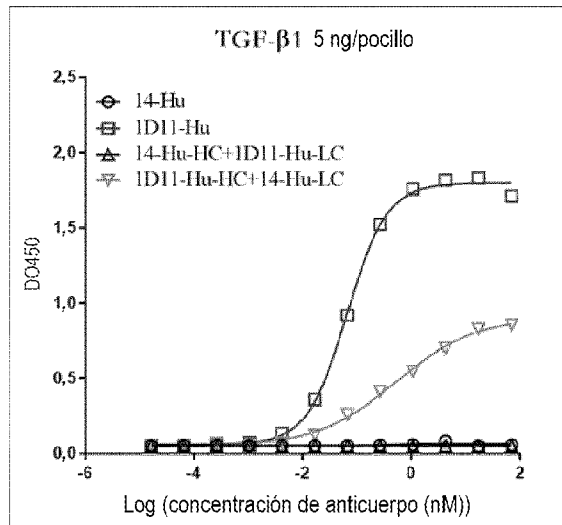


Fig. 13B

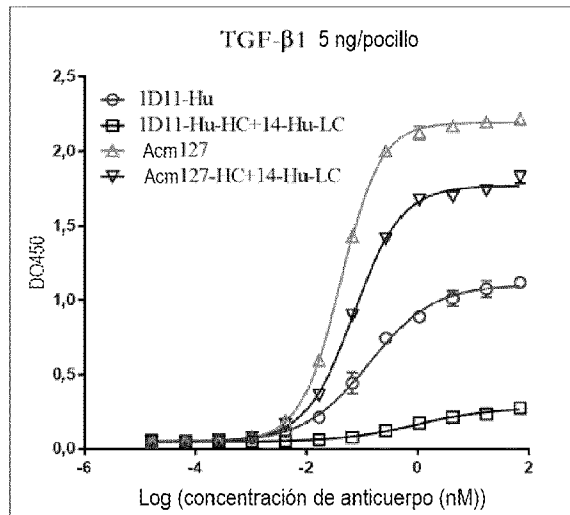


Fig. 14

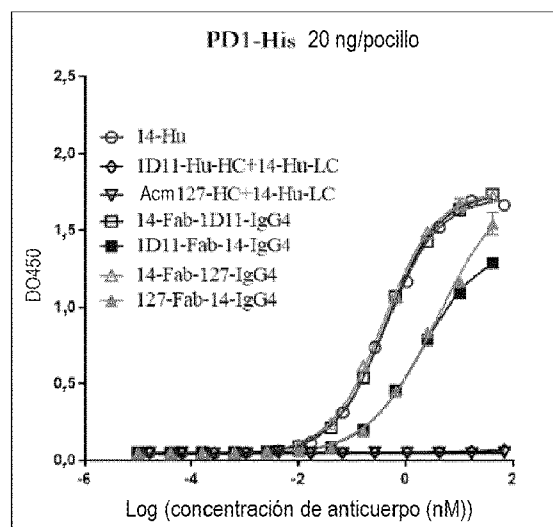


Fig. 15A

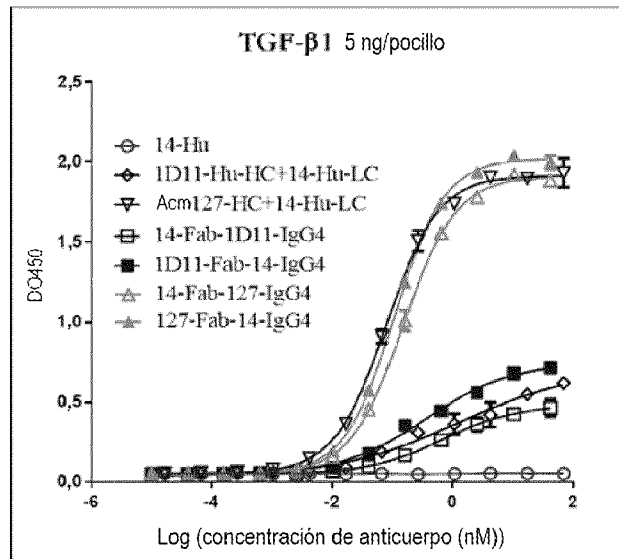


Fig. 15B

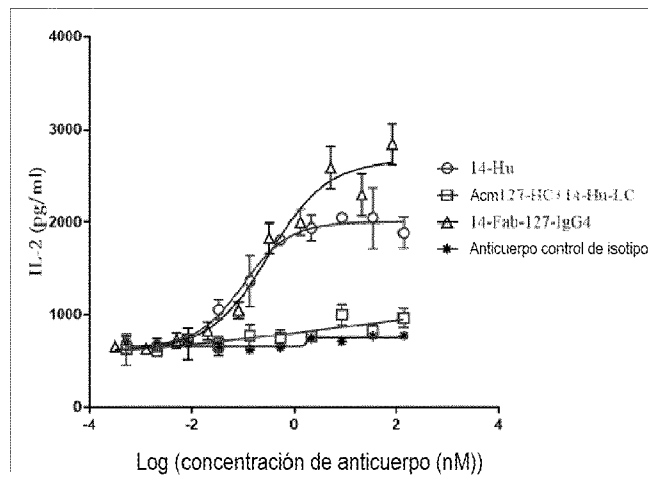


Fig. 16A

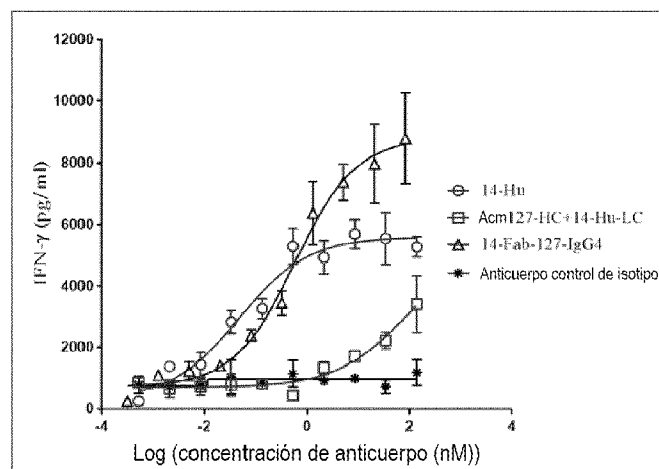


Fig.16B

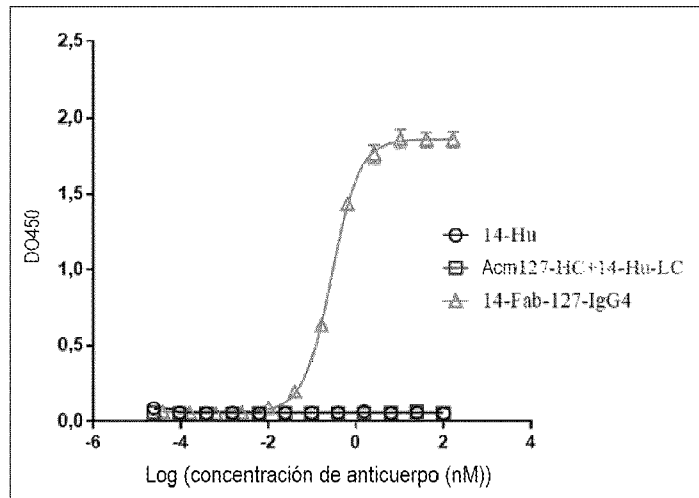


Fig. 17

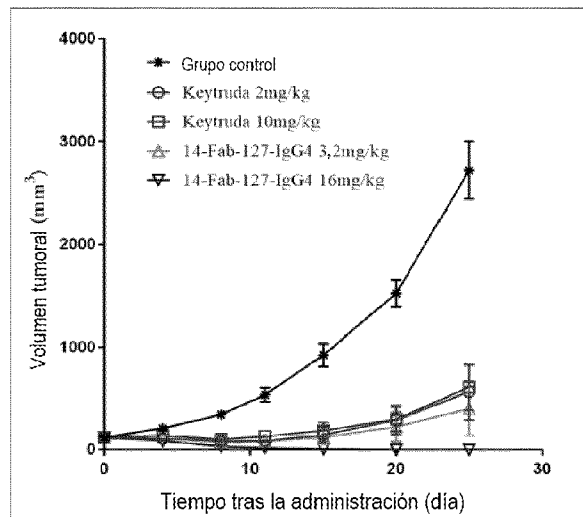


Fig. 18

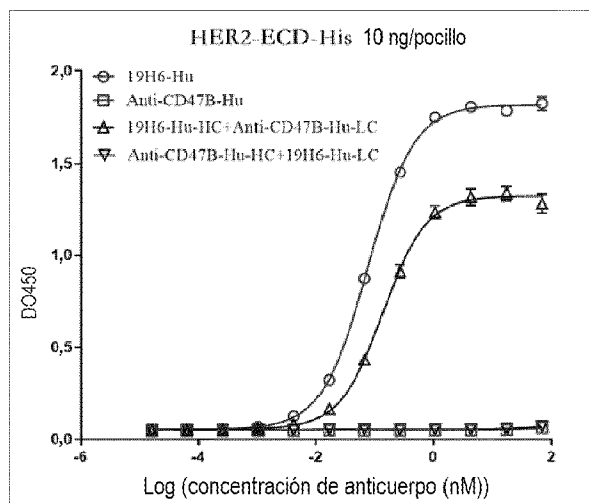


Fig. 19A

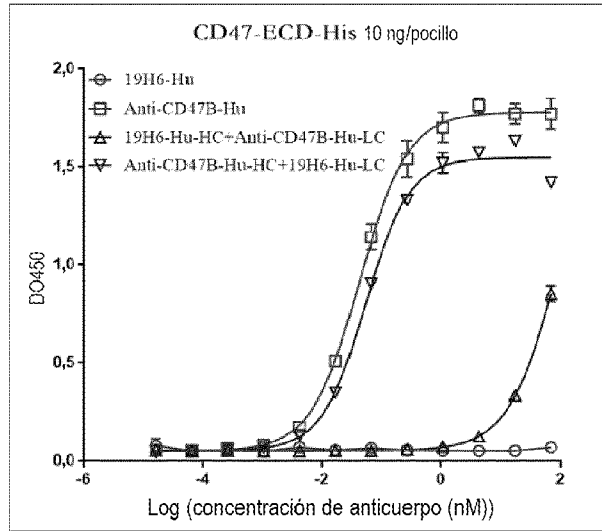


Fig. 19B

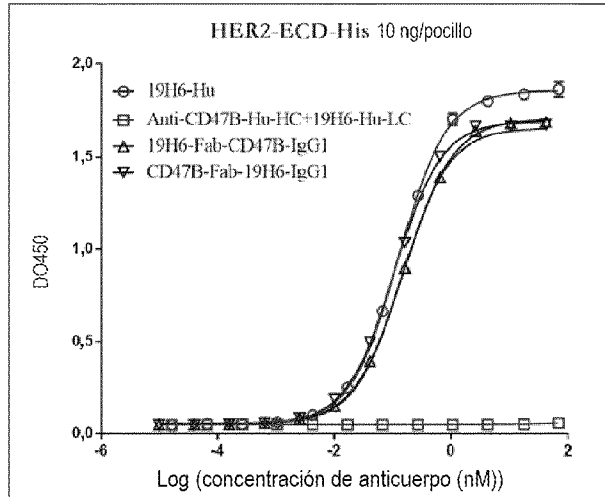


Fig. 20A

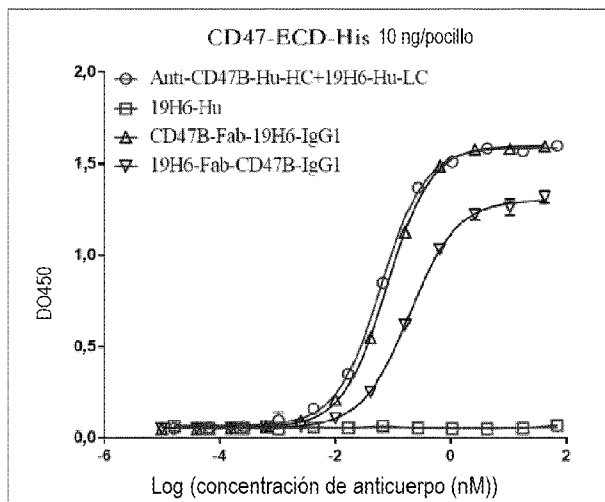


Fig. 20B

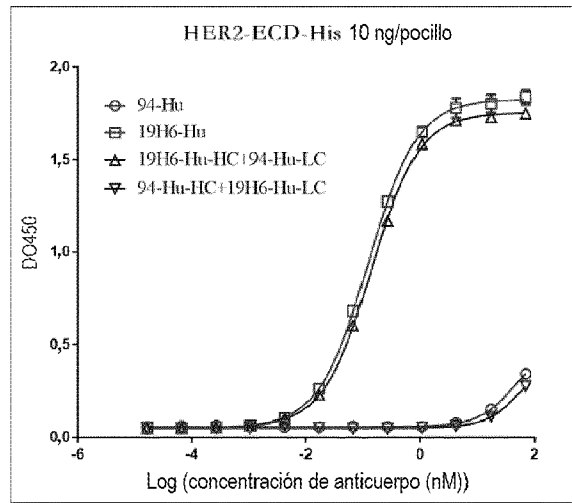


Fig. 21A

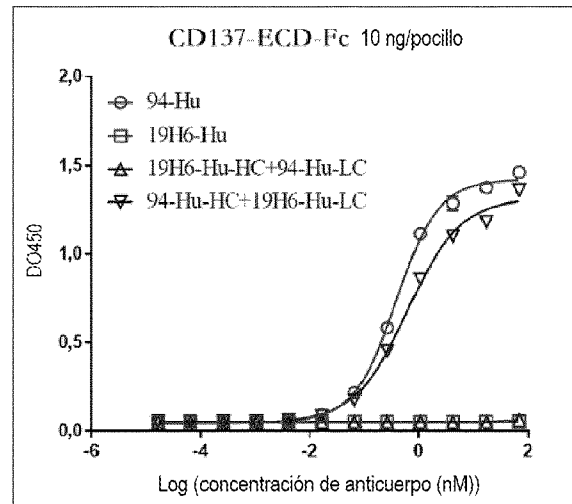


Fig. 21B

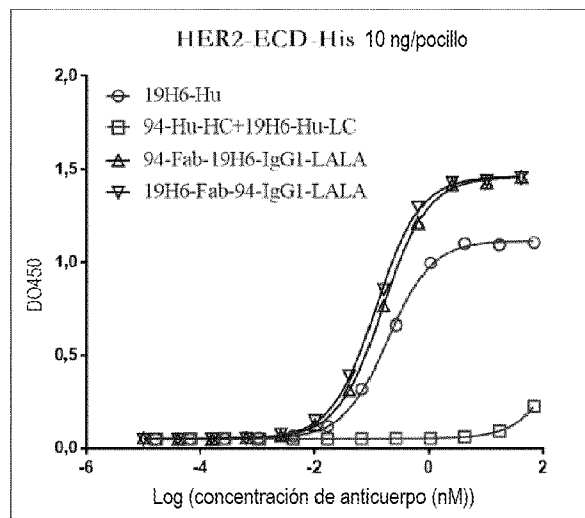


Fig. 22A

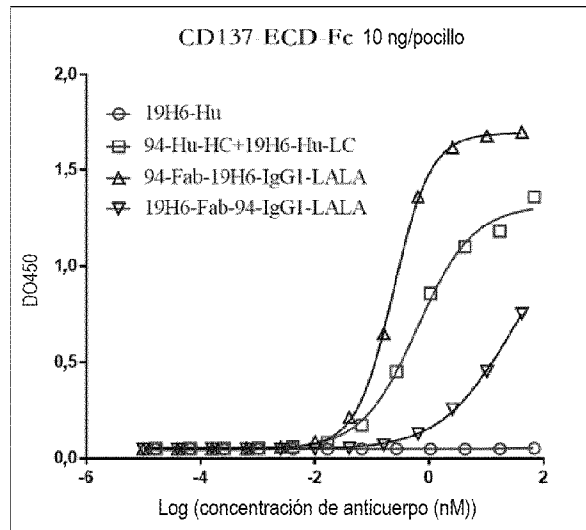


Fig. 22B

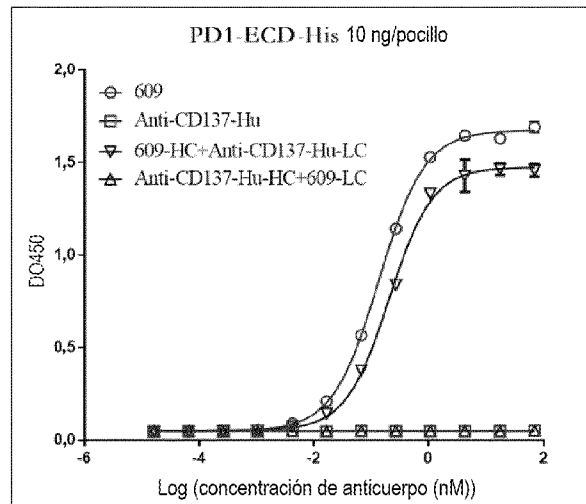


Fig. 23A

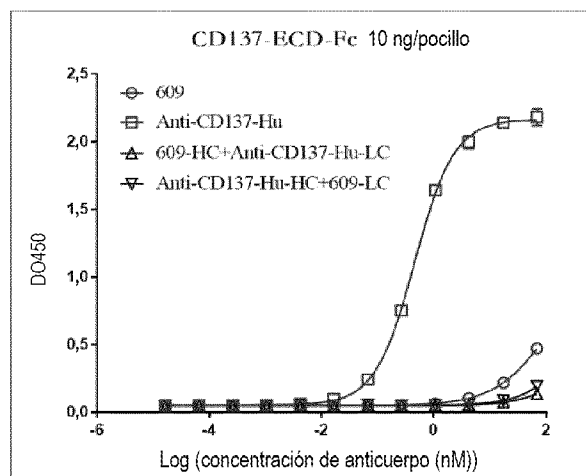


Fig. 23B

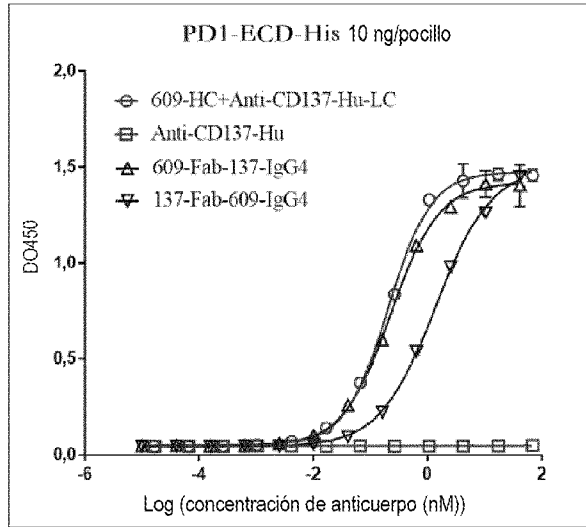


Fig. 24A

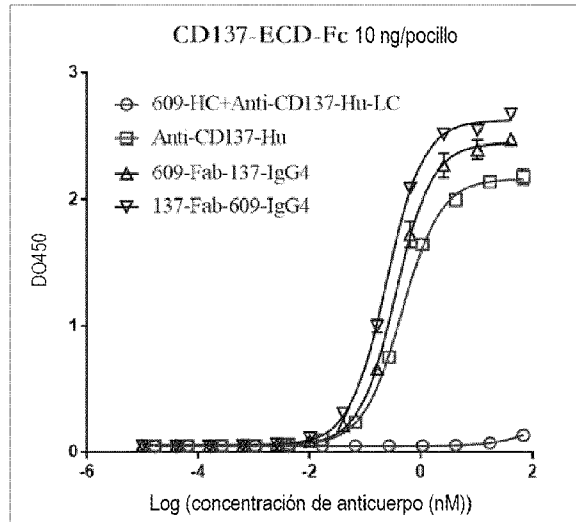


Fig. 24B

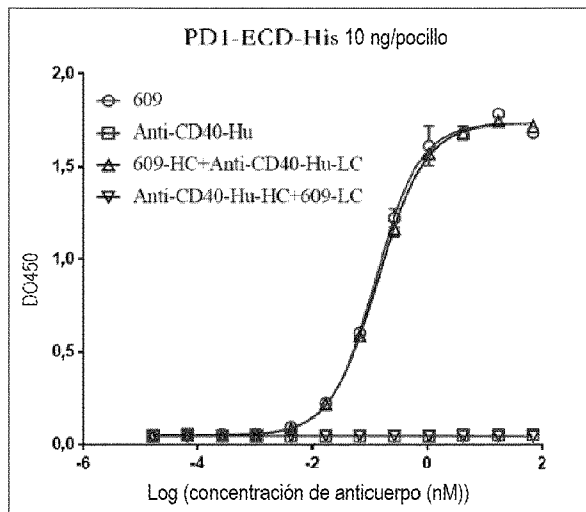


Fig. 25A

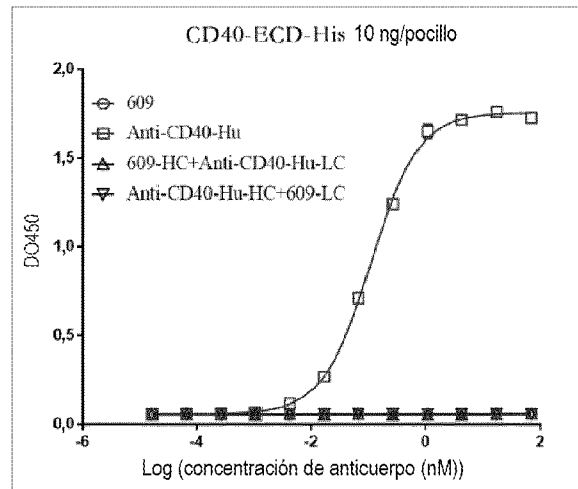


Fig. 25B

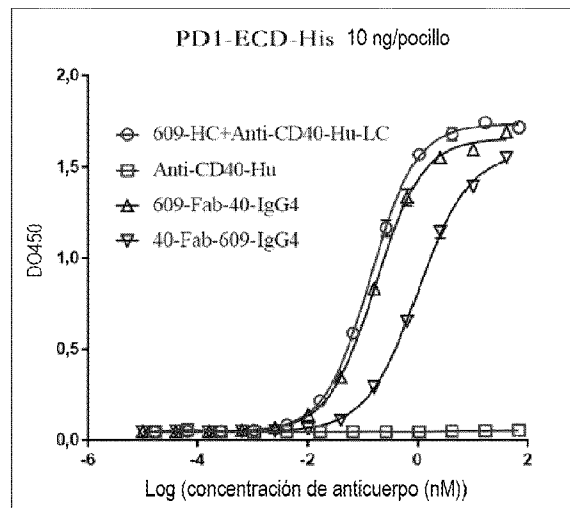


Fig. 26A

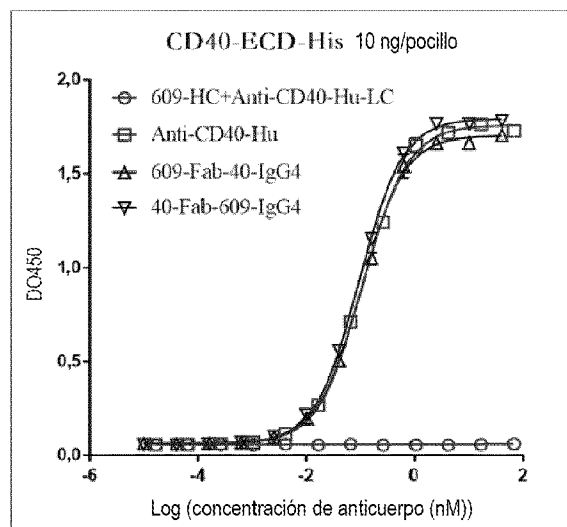


Fig. 26B

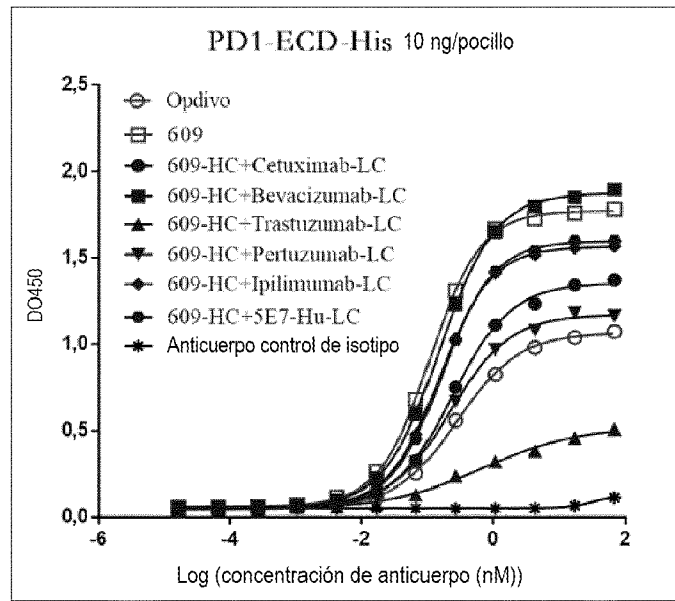


Fig. 27

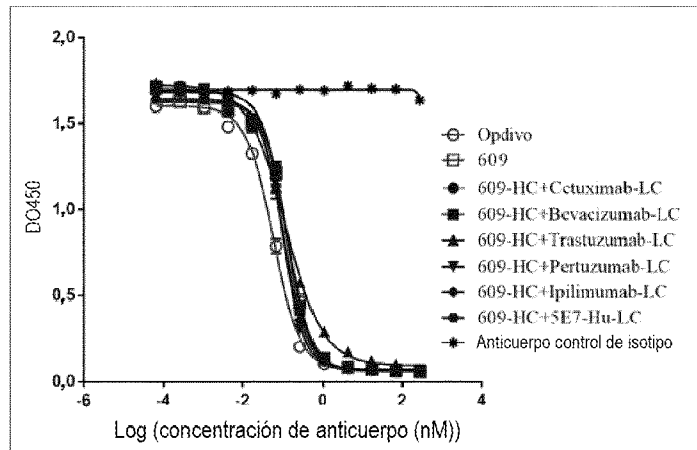


Fig. 28

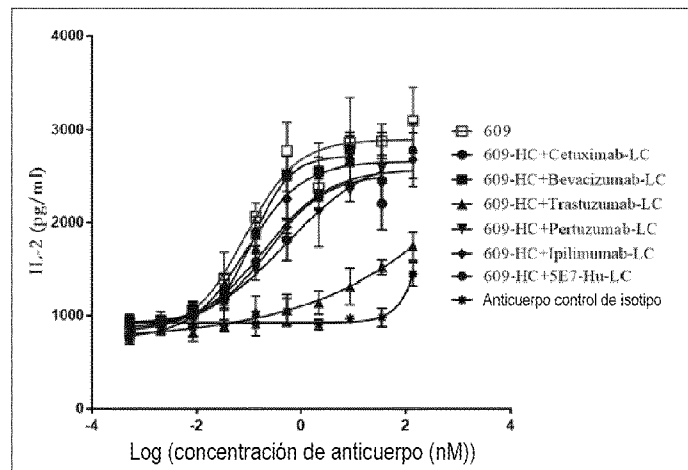


Fig. 29

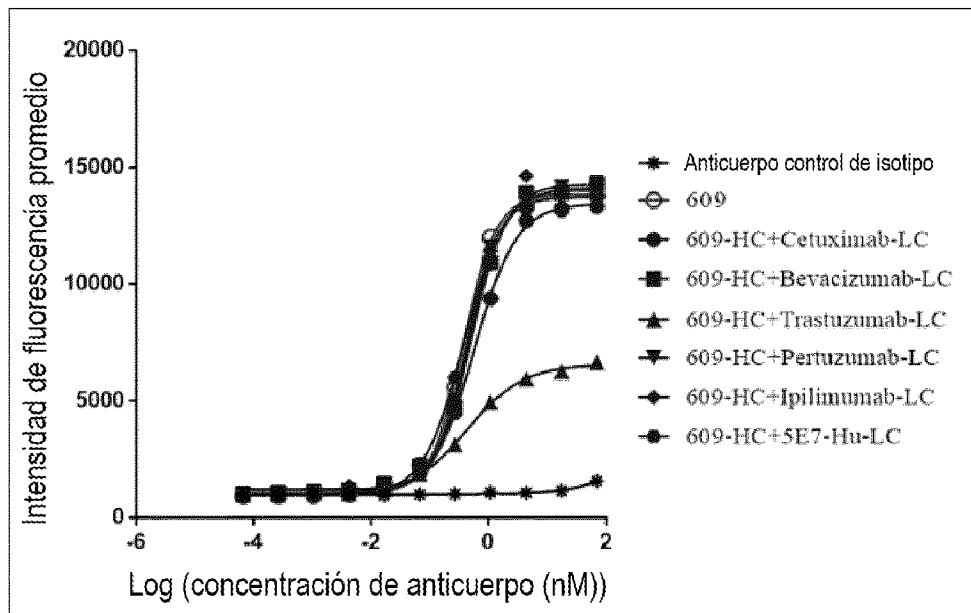


Fig. 30

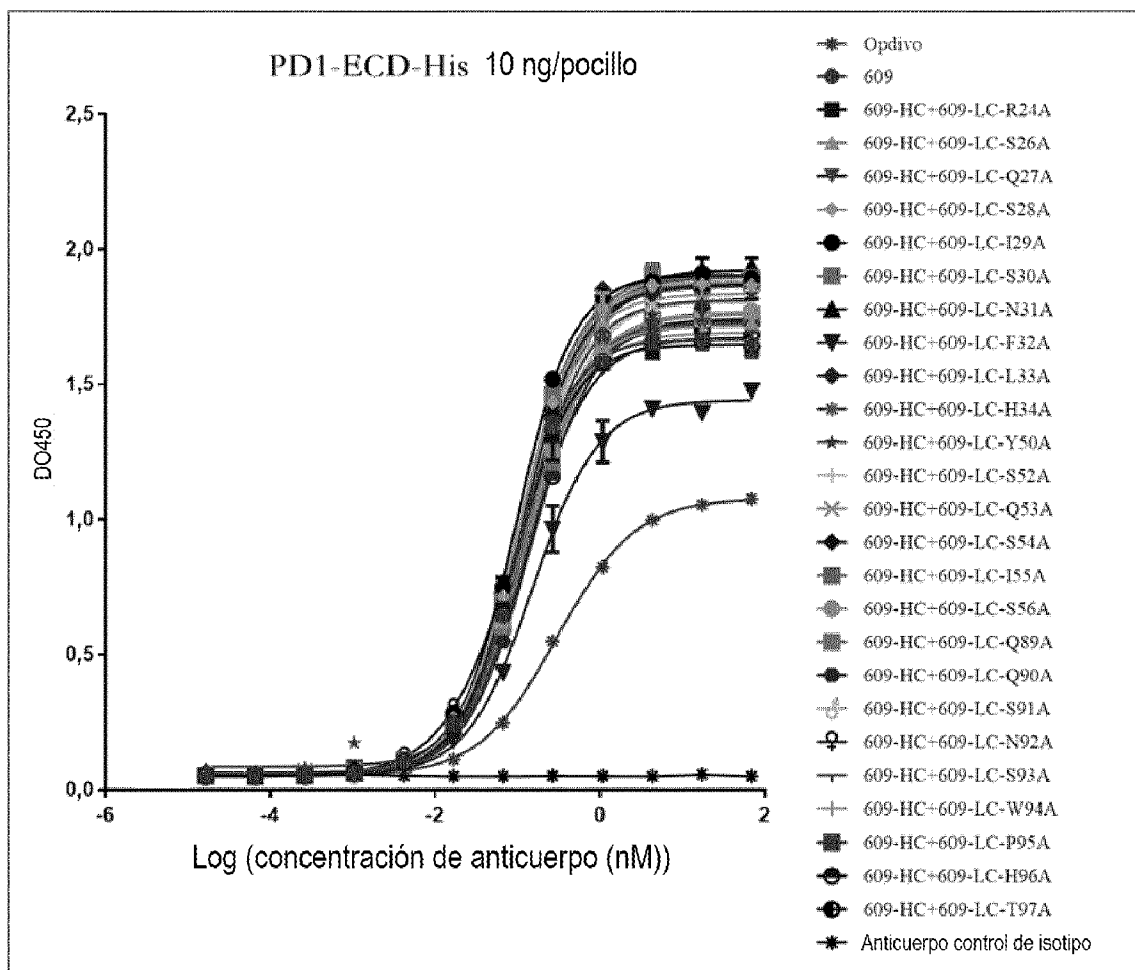


Fig. 31

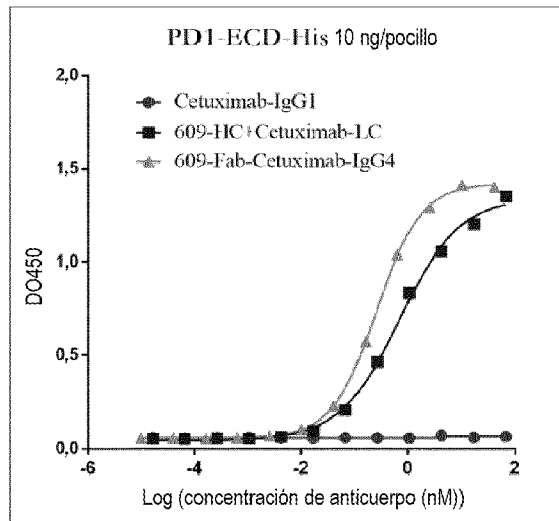


Fig. 32A

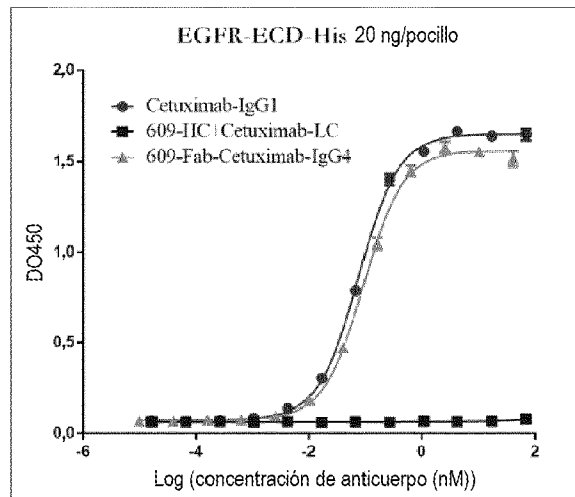


Fig. 32B

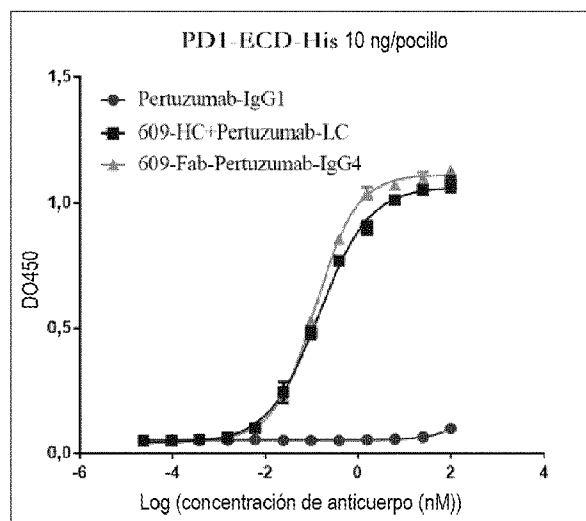


Fig. 33A

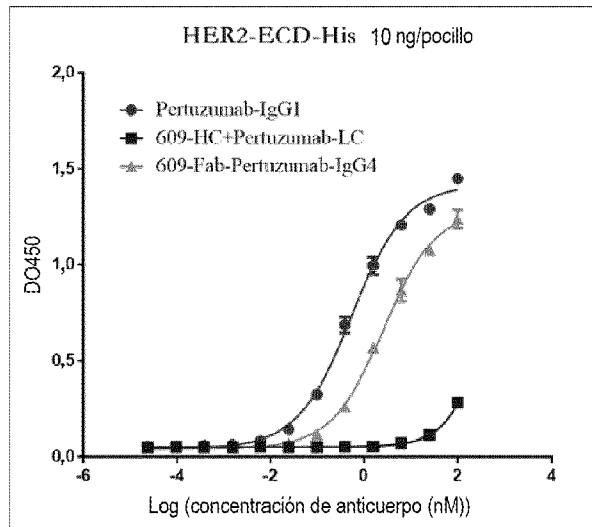


Fig. 33B

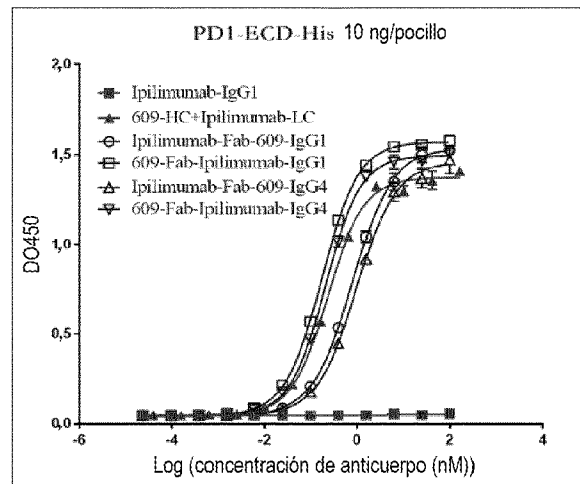


Fig. 34A

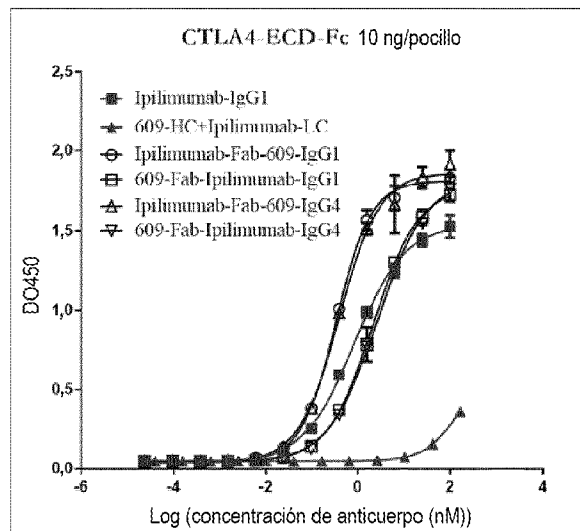


Fig. 34B

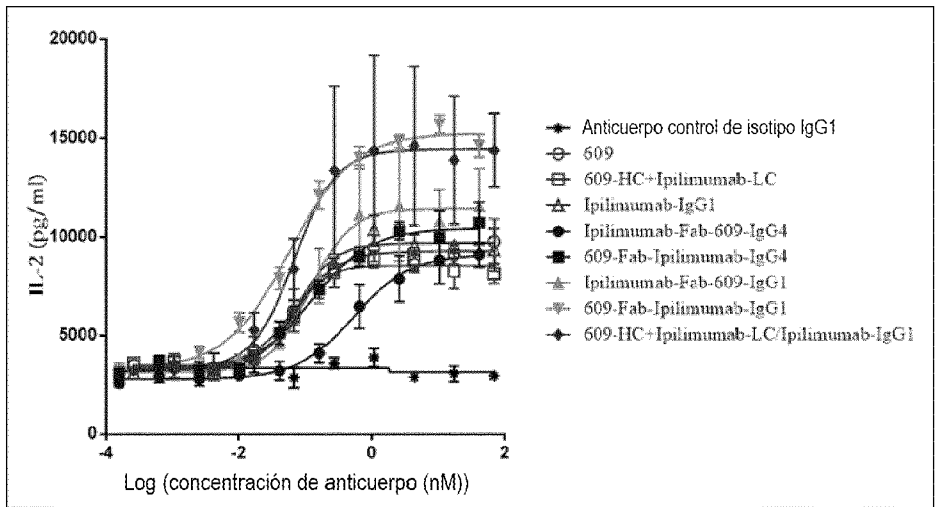


Fig. 35

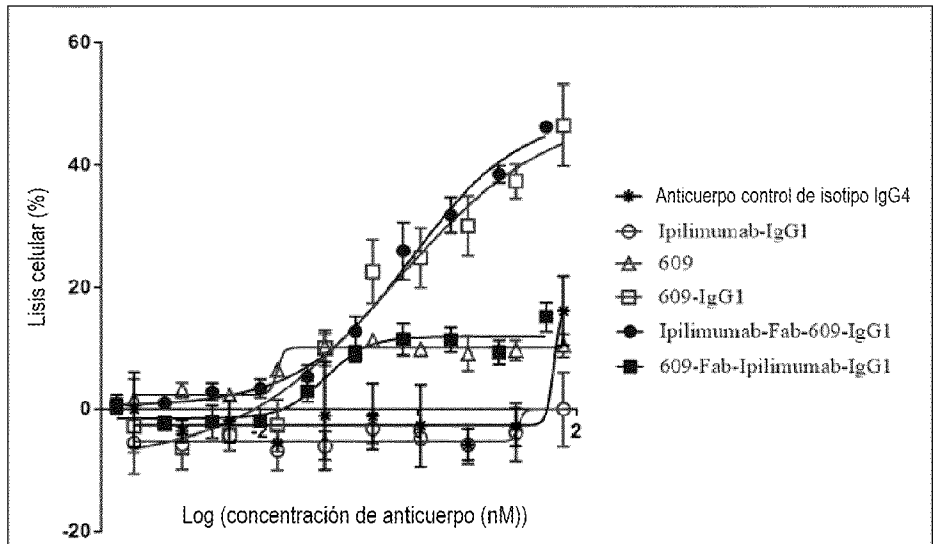


Fig. 36

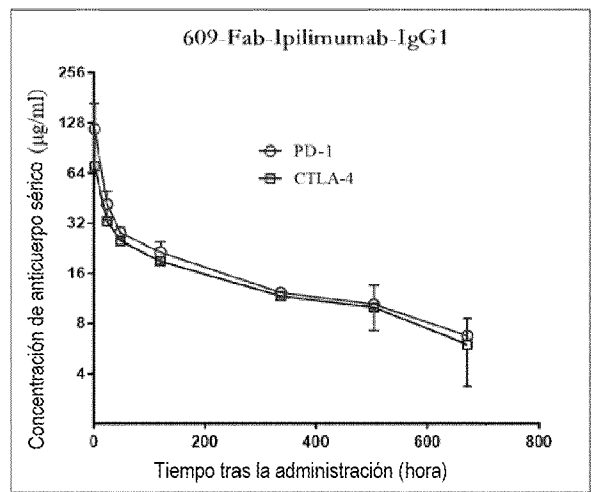


Fig. 37

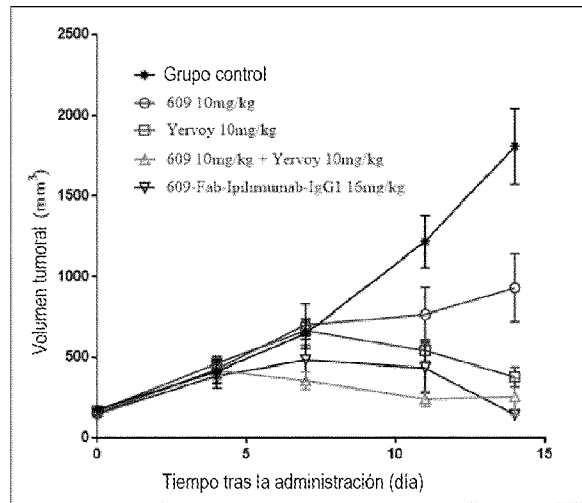


Fig. 38

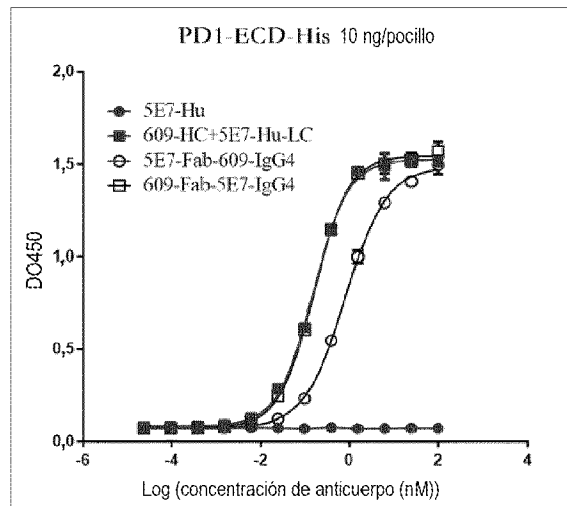


Fig. 39A

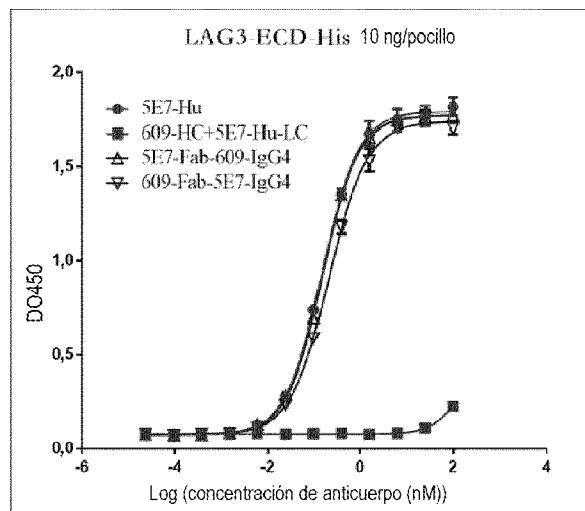


Fig. 39B

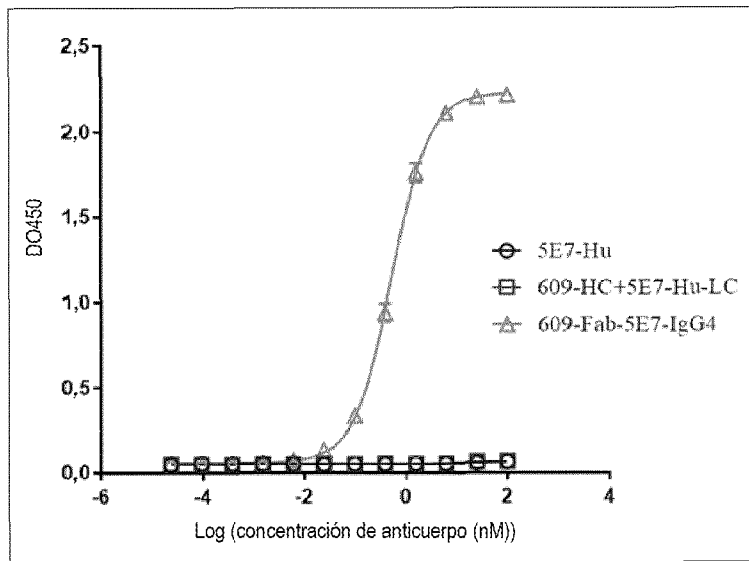


Fig. 40

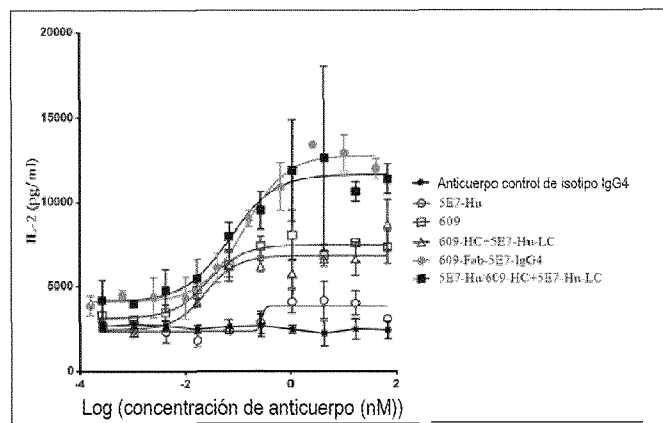


Fig. 41

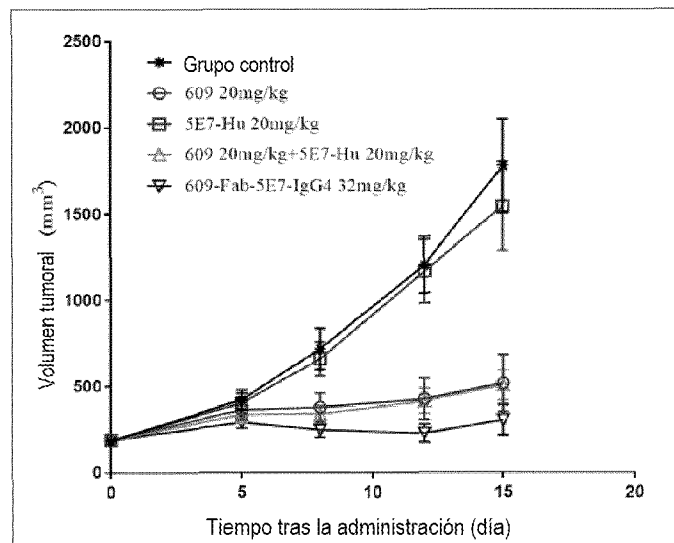


Fig. 42

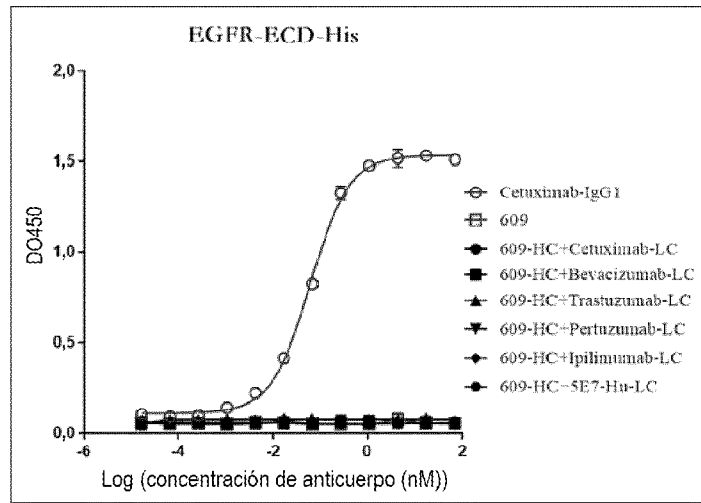


Fig. 43A

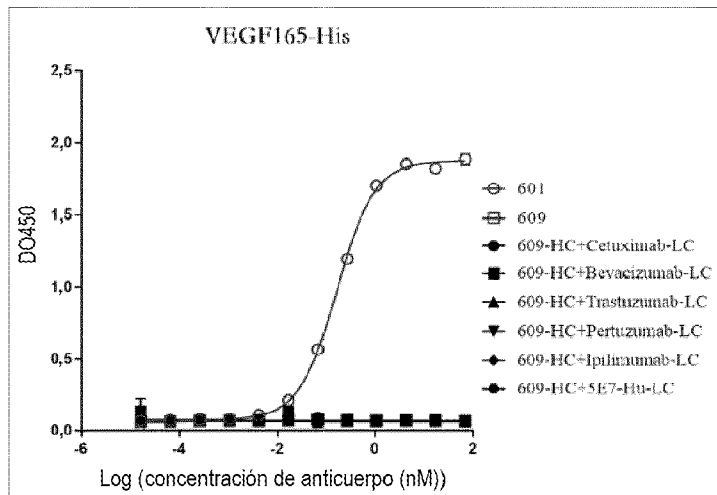


Fig. 43B

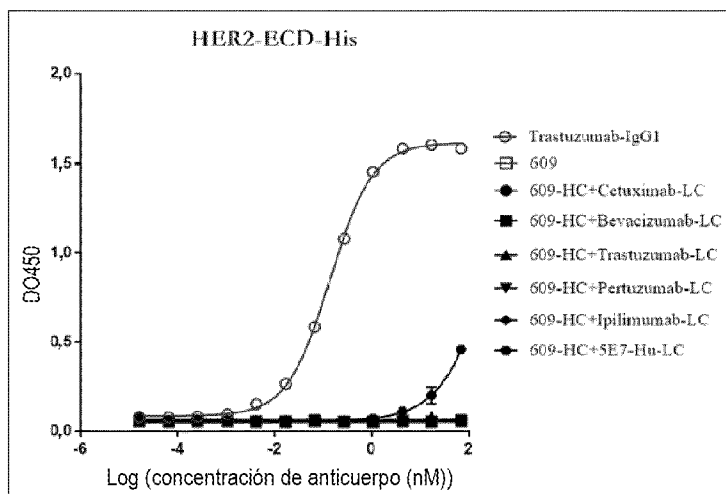


Fig. 43C

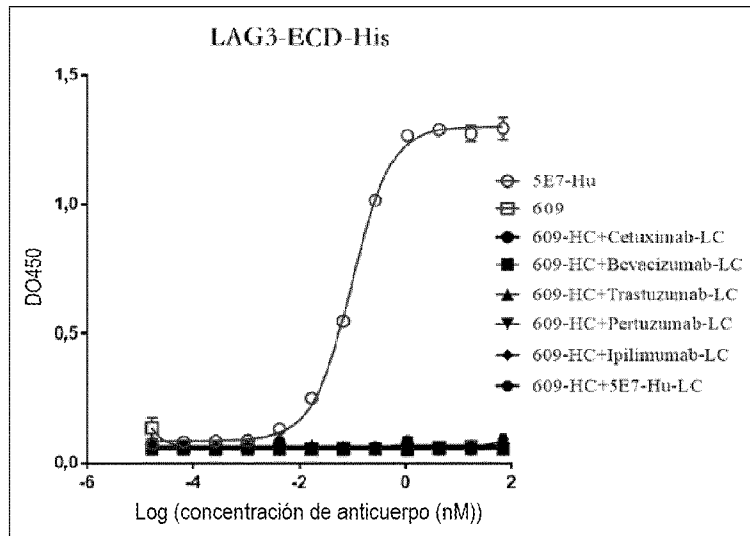


Fig. 43D

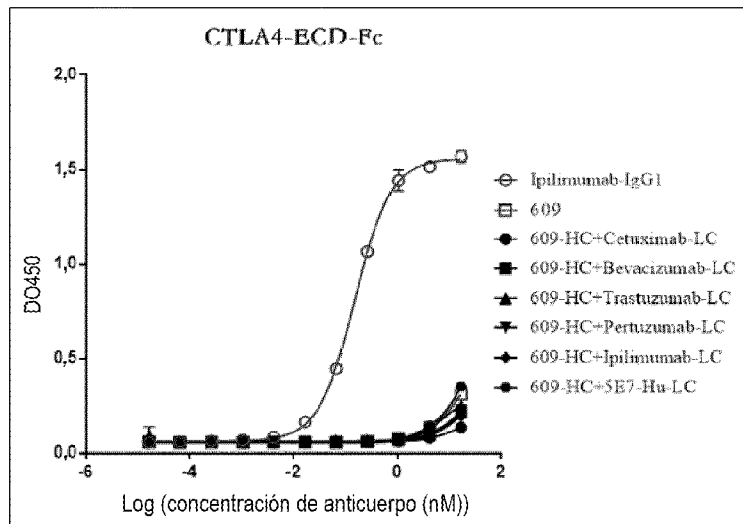


Fig. 43E

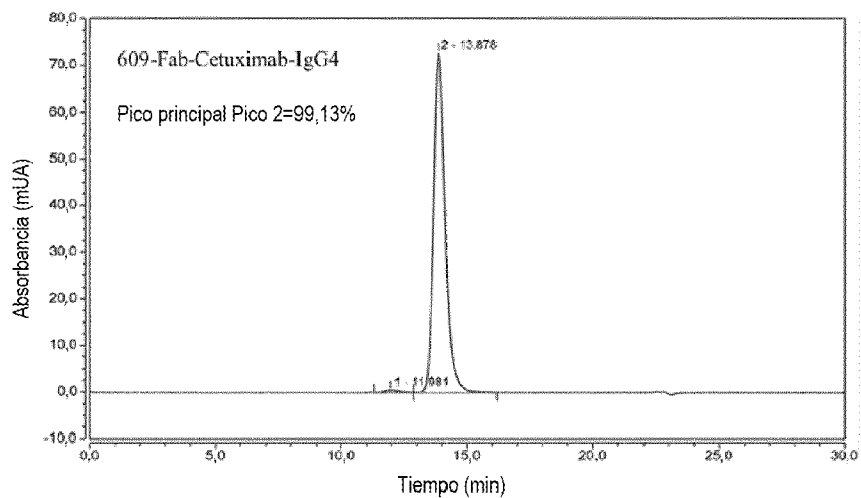


Fig. 44A

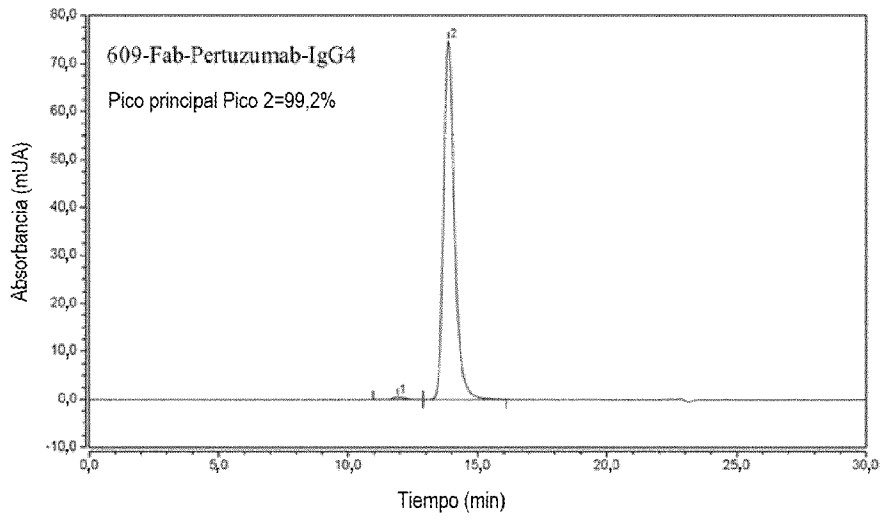


Fig. 44B

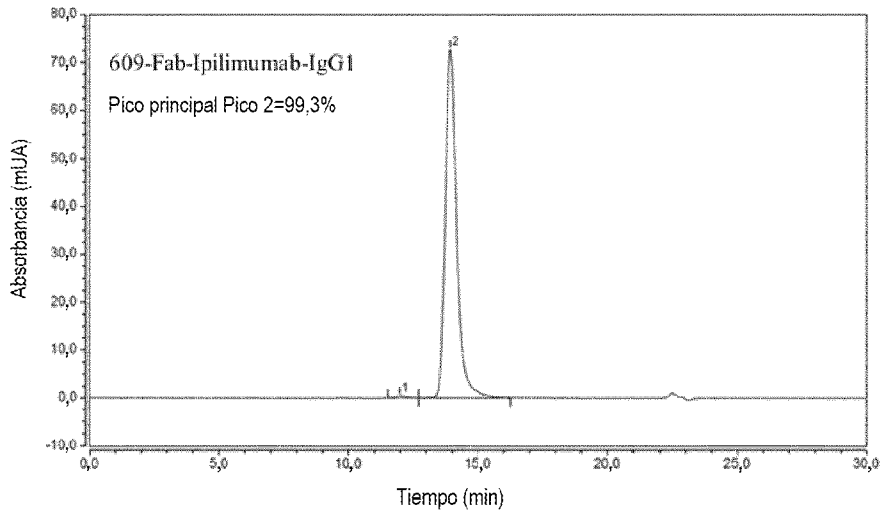


Fig. 44C

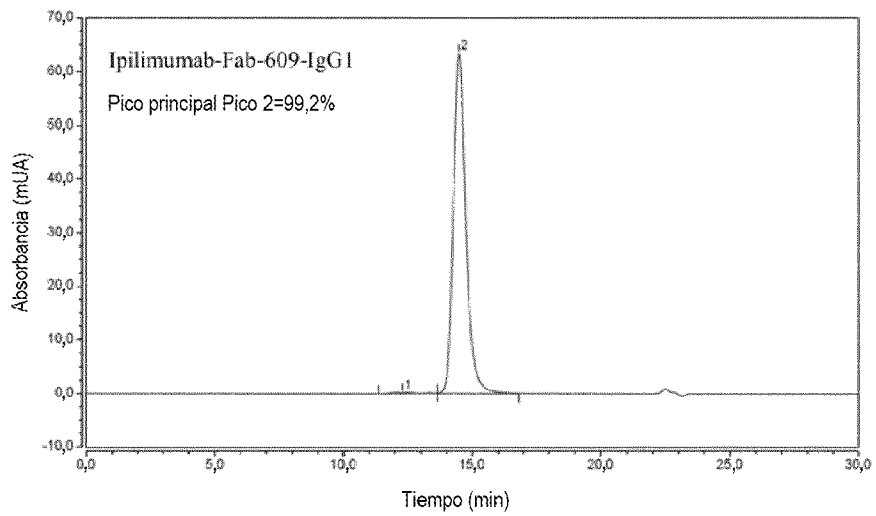


Fig. 44D

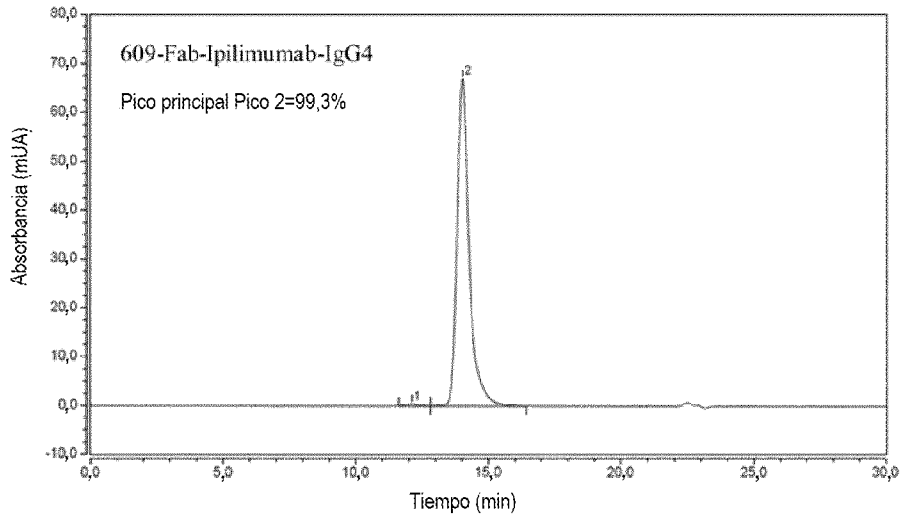


Fig. 44E

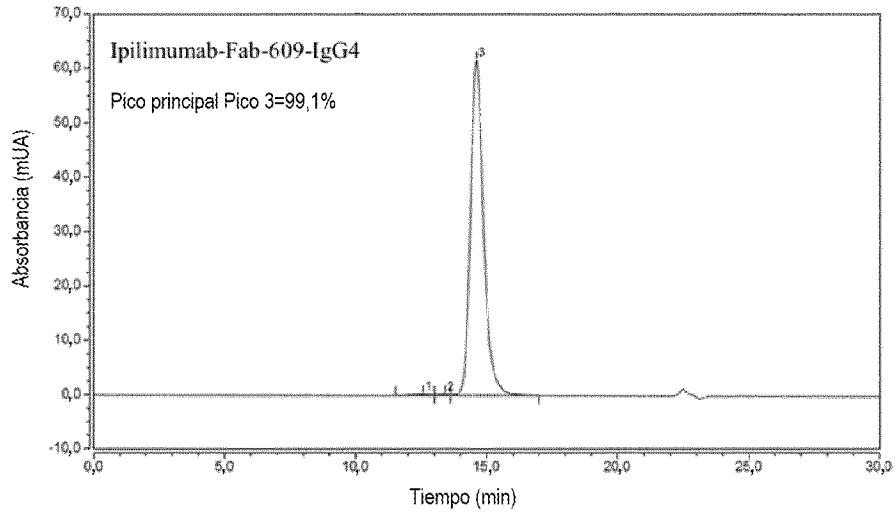


Fig. 44F

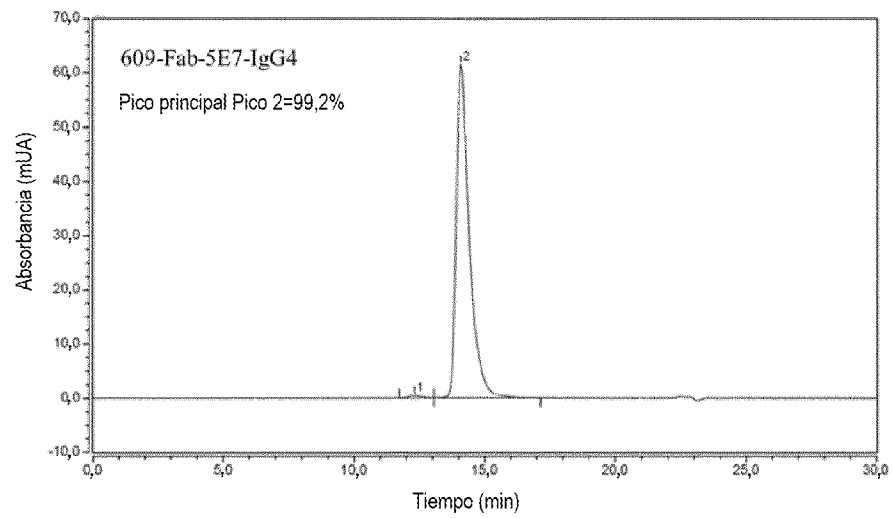


Fig. 44G

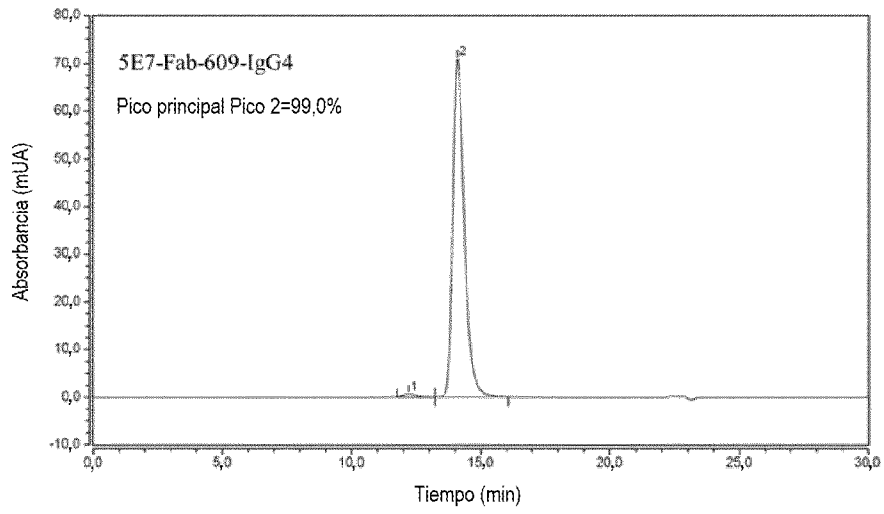


Fig. 44H

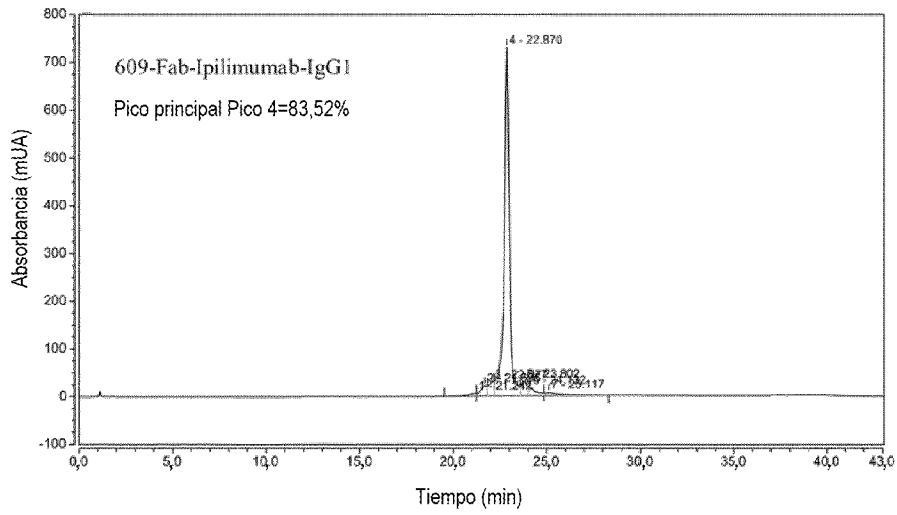


Fig. 45A

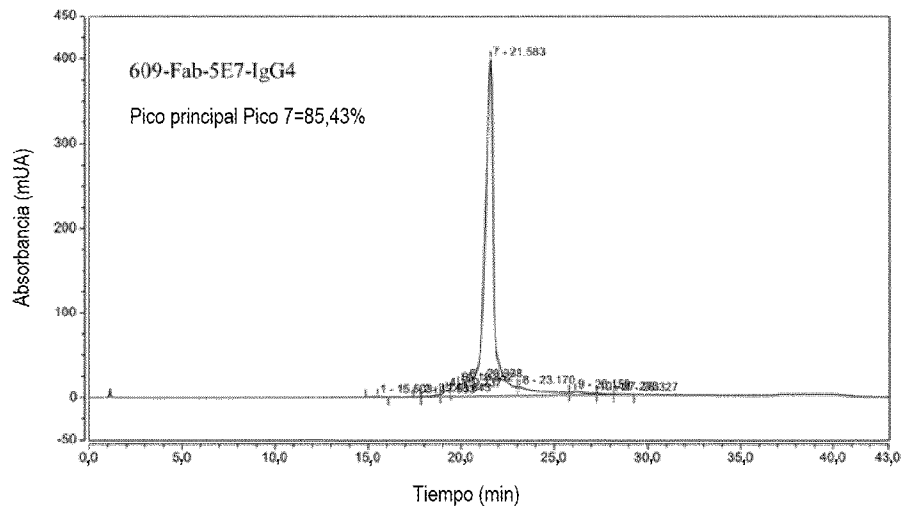


Fig. 45B

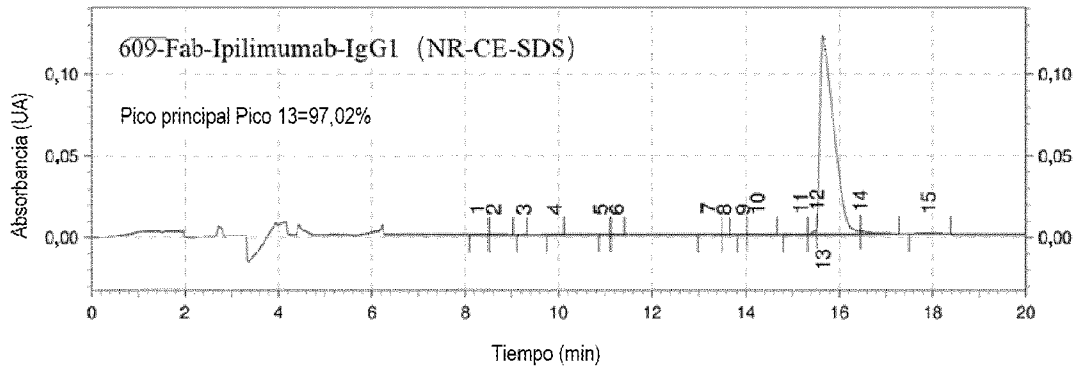


Fig. 46A

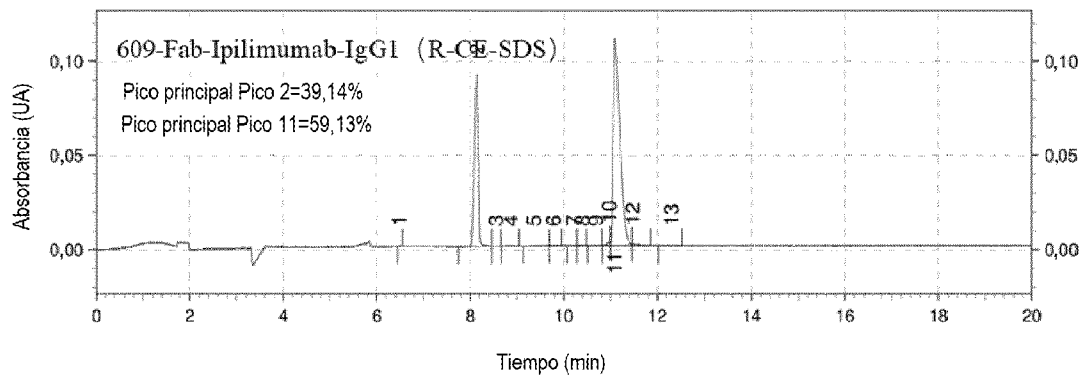


Fig. 46B

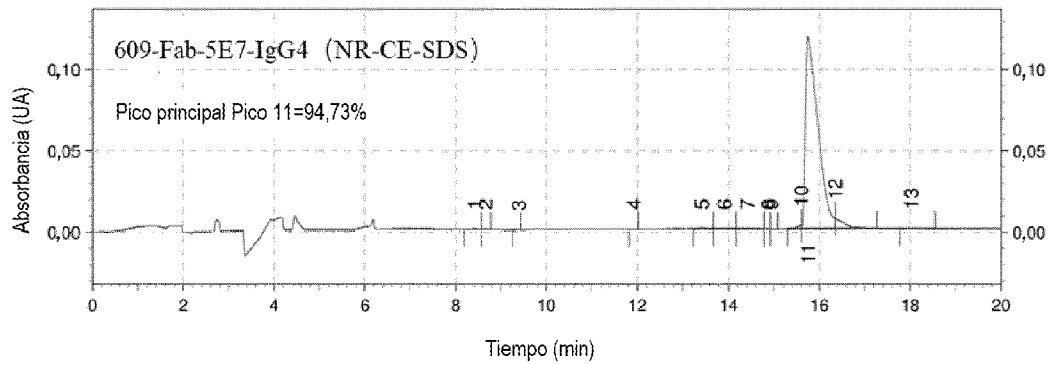


Fig. 46C

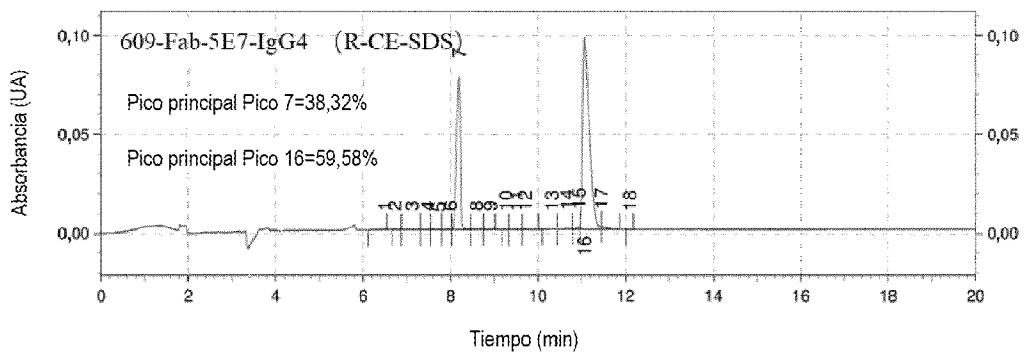


Fig. 46D