

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 974**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 19/08** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/US2013/030636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13712987 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2825553**

54 Título: **Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y uso de las mismas**

30 Prioridad:

**14.03.2012 US 201261610494 P**

**02.11.2012 US 201261721831 P**

**11.01.2013 US 201361751286 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.10.2018**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**PAPADOPOULOS, NICHOLAS, J.;**  
**MURPHY, ANDREW, J.;**  
**ECONOMIDES, ARIS N. y**  
**CYGNAR, KATHERINE, DIANA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 687 974 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

Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y uso de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las proteínas terapéuticas.

10 **Antecedentes**

10 Los tratamientos terapéuticos a menudo requieren la inactivación o el bloqueo de una o más moléculas diana que actúan sobre una célula o cerca de ella. Por ejemplo, los agentes terapéuticos basados en anticuerpos a menudo funcionan uniéndose a un antígeno particular expresado en la superficie de una célula, o a un ligando soluble, interfiriendo de esta manera con la actividad biológica normal del antígeno. Se ha demostrado que los anticuerpos y otras construcciones de unión, que se dirigen contra diversas citocinas (por ejemplo, IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33, etc.), o por ejemplo, contra sus respectivos receptores, son útiles en el tratamiento de una amplia variedad de dolencias y enfermedades humanas. Los agentes terapéuticos de este tipo funcionan típicamente bloqueando la interacción entre la citocina y su receptor para atenuar o inhibir la señalización celular. Sin embargo, en determinados contextos, sería terapéuticamente beneficioso inactivar o inhibir la actividad de una molécula diana de una manera que no implique necesariamente bloquear su interacción física con otro componente. Una manera en la que podría conseguirse dicha atenuación no bloqueante de una molécula diana, sería reducir la concentración extracelular o en la superficie de la membrana de la molécula diana. Aunque en la técnica se conocen estrategias genéticas y basadas en ácidos nucleicos para reducir la cantidad o la concentración de una molécula diana determinada, dichas estrategias están frecuentemente cargadas de complicaciones técnicas sustanciales y de efectos secundarios inesperados en entornos terapéuticos. Por consiguiente, se necesitan estrategias no bloqueantes alternativas para facilitar la inactivación o atenuación de diversas moléculas diana para fines terapéuticos.

30 Robinson M K *et al* (2008), British Journal of Cancer, vol. 99(9), describen una molécula biespecífica de unión a antígeno (bs-scFv ALM) que comprende un dominio de unión a ErbB2 y un dominio de unión a ErbB3 que se dice que proporciona selectividad de direccionamiento potenciada. McDonagh *et al* (2012), Molecular Cancer Therapeutics, vol. 11 (3), describen una molécula biespecífica de unión a antígeno (MM-111) que comprende un dominio de unión a ErbB2 y un dominio de unión a ErbB3 que se dice que inhibe la activación de ErbB3 inducida por heregulina y que presenta actividad antitumoral.

35 El documento US 2010/081796 se refiere a una molécula biespecífica de unión a antígeno (scFab-XGFR2\_2720) que comprende un dominio de unión a EGFR y un dominio de unión a IGF1R. El documento WO 2009/094561 describe ligandos heterobifuncionales que se unen a un receptor diana y su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas al receptor diana. El documento WO 01/09186 describe moléculas multiespecíficas que se unen a un receptor de Fc en la superficie de una célula inmunitaria; las moléculas inducen la destrucción de células diana mediada por células efectoras. El documento WO 2011/147986 describe anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2) y los usos de dichos anticuerpos, en particular su uso en el tratamiento del cáncer. El documento WO 2009/120922 se refiere a antagonistas del receptor B de PDGF (PDGFRB) y de VEGF-A, incluyendo anticuerpos biespecíficos que se unen y neutralizan tanto a PDGFRB como a VEGF-A.

45 **Breve sumario**

50 La presente invención se basa, al menos en parte, en el concepto de atenuar o inactivar una molécula diana facilitando o efectuando un enlace físico entre la molécula diana y una proteína efectora de internalización. A través de este tipo de enlace intermolecular físico, la molécula diana puede forzarse a internalizarse en la célula junto con la proteína efectora de internalización, y a procesarse por la maquinaria de degradación intracelular. Este mecanismo representa una estrategia novedosa e ingeniosa para inactivar o atenuar la actividad de una molécula diana sin bloquear necesariamente la interacción entre la molécula diana y sus compañeros de unión.

55 Por consiguiente, la presente invención proporciona una molécula multiespecífica de unión a antígeno que es capaz de unirse simultáneamente a una molécula diana (D) y a una proteína efectora (E) de internalización. Más específicamente la presente invención proporciona una molécula multiespecífica de unión a antígeno que comprende:

60 un primer dominio (D1) de unión a antígeno; y  
un segundo dominio (D2) de unión a antígeno;

65 en la que D1 se une específicamente a una molécula diana (D) en la que D es una proteína o un polipéptido que se asocia a un tumor, que se expresa preferentemente en la superficie de una célula tumoral; y  
en la que D2 se une a una proteína efectora (E) de internalización que se expresa en la superficie de las células tanto tumorales como no tumorales y en la que E experimenta internalización celular y se procesa mediante una ruta

de degradación intracelular;

en la que D2 se une a E con baja afinidad, de tal manera que la molécula multiespecífica de unión a antígeno, se dirige preferentemente a células tumorales que expresan D y la unión simultánea de la molécula multiespecífica de unión a antígeno con D y E da como resultado la internalización y degradación forzada de D en las células tumorales a través de su enlace físico con E;

en la que la afinidad de unión de D2 por E es al menos 90 % más débil que la afinidad de unión de D1 por D; y en la que E es CD63.

La presente invención también proporciona el uso de moléculas multiespecíficas de unión a antígeno en un método de tratamiento de un tumor en un sujeto.

En el presente documento también se describe una molécula multiespecífica de unión a antígeno que comprende un primer dominio (D1) de unión a antígeno y un segundo dominio (D2) de unión a antígeno, en la que D1 se une específicamente a D y D2 se une específicamente a E, y en la que la unión simultánea de D y E mediante la molécula multiespecífica de unión a antígeno atenúa la actividad de D a un mayor grado que la unión de D solo mediante D1. La atenuación potenciada de la actividad de D puede deberse a la internalización/degradación forzada de D a través de su enlace físico con E; sin embargo, son posibles otros mecanismos de acción y no se excluyen del alcance de la presente divulgación.

En el presente documento también se describen métodos de uso de la molécula multiespecífica de unión a antígeno para inactivar o atenuar la actividad de una molécula diana (D). En particular, en el presente documento se describe un método para inactivar o atenuar la actividad de D poniendo en contacto D y una proteína efectora (E) de internalización, con una molécula multiespecífica de unión a antígeno, en el que la molécula multiespecífica de unión a antígeno comprende un primer dominio (D1) de unión a antígeno y un segundo dominio (D2) de unión a antígeno, en el que D1 se une específicamente a D, y en el que D2 se une específicamente a E; y en el que la unión simultánea de D y E mediante la molécula multiespecífica de unión a antígeno atenúa la actividad de D a un mayor grado que la unión de D solo mediante D1.

En determinadas realizaciones en el presente documento, D1 y/o D2 comprende(n) al menos una región variable de anticuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede ser un anticuerpo biespecífico, en la que D1 comprende un par de la región variable de la cadena pesada (H, *heavy*) y ligera (L, *light*) de un anticuerpo (HCVR/LCVR) que se une específicamente a D, y en la que D2 comprende un par DE HCVR/LCVR que se une específicamente a E. Como alternativa, D1 y/o D2 pueden comprender un péptido o polipéptido que interaccione específicamente con la molécula diana (D) y/o con la proteína efectora (E) de internalización. Por ejemplo, si la molécula diana es un receptor de superficie celular, entonces D1 puede comprender una parte de un ligando que se una específicamente a la molécula diana receptora de la superficie celular. De manera similar, si la proteína efectora de internalización es un receptor de internalización de la superficie celular, entonces D2 puede comprender una parte de un ligando que se una específicamente al receptor de internalización de la superficie celular. En determinadas realizaciones, D1 comprende una región variable de anticuerpo que une específicamente a D, y D2 comprende un péptido o polipéptido que une específicamente a E. En otras realizaciones adicionales, D1 comprende un péptido o polipéptido que se une específicamente a D y D2 comprende una región variable de anticuerpo que se une específicamente a E. Sin embargo, en cualquier configuración, el resultado final es que D y E son capaces de enlazarse físicamente, directa o indirectamente, mediante la unión simultánea de D y E a través de una molécula multiespecífica de unión a antígeno.

Otras realizaciones serán obvias a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

### Breve descripción de las figuras

La **Figura 1 (paneles A-D)** proporciona representaciones esquemáticas de cuatro mecanismos de acción ejemplares, generales para las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno descritas en la presente invención. En cada configuración ilustrada, D1 es un primer dominio de unión a antígeno; D2 es un segundo dominio de unión a antígeno; D es una molécula diana; E es una proteína efectora de internalización y R es un receptor que se internaliza al unirse a E. El **panel A** ilustra la situación en la que tanto D como E están asociadas a la membrana. El **panel B** ilustra la situación en la que D es soluble y E está asociada a la membrana. El **panel C** ilustra la situación en la que D está asociada a la membrana y E es una proteína soluble que interacciona con, y se internaliza en la célula, mediante la interacción de E y R. El **panel D** ilustra la situación en la que D es soluble y E es una proteína soluble que interacciona con, y se internaliza en la célula, a través de la interacción de E y R.

La **Figura 2** muestra los resultados de un experimento de inmunoprecipitación realizado en dos células diferentes (Célula 1, que expresa solo FcγR1 y la Célula 2 que expresa Krm2 y FcγR1) después de la incubación durante diferentes cantidades de tiempo (0, 15, 30 y 60 minutos) con una molécula multiespecífica de unión a antígeno DKK1-mFc.

La **Figura 3** muestra la luminiscencia relativa inducida por IL-4 producida por células HEK293 indicadoras de Stat6-luc en presencia y en ausencia de una proteína multiespecífica de unión a antígeno anti-IL-4R/anti-CD63 ("conjugado de ab") o de construcciones de control ("control 1" y "control 2") a diversas concentraciones de IL-4.

La **Figura 4** muestra los resultados de un experimento realizado de la misma manera que el experimento mostrado en la Figura 3, excepto que la expresión de CD63 se redujo significativamente en la línea celular indicadora

mediante un ARNip dirigido contra CD63.

La **Figura 5** muestra los resultados de un experimento realizado de manera similar a los experimentos mostrados en las Figuras 3 y 4, excepto que las células indicadoras se incubaron con la proteína multiespecífica de unión a antígeno (“conjugado de Ab”) o con construcciones de control (“control 1” y “control 2”) durante 2 horas y durante una noche, antes de la adición del ligando IL-4. La fila superior del gráfico de barras representa los resultados de experimentos realizados en células que expresan niveles normales de CD63 (“sin transfectar”), mientras que la fila inferior del gráfico de barras representa los resultados de experimentos realizados en células en las que la expresión de CD63 se redujo significativamente en la línea celular indicadora mediante un ARNip dirigido contra CD63.

La **Figura 6** muestra los resultados de un experimento realizado de manera similar a los experimentos mostrados en las Figuras 3 y 4, excepto que las células indicadoras se incubaron con la proteína multiespecífica de unión antigénica anti-IL-4R/anti-CD63 (“conjugado de Ab”) o con construcciones de control (“control 1” y “control 2”) durante 15 minutos, 30 minutos, 1 hora o 2 horas antes de la adición del ligando IL-4.

La **Figura 7** muestra los resultados de un experimento en el que las células indicadoras Stat6-luc se trataron con IL-4 10 pM en presencia de diversas diluciones de un anticuerpo biespecífico anti-IL-4R x anti-CD63 (“biespecífico”), o con construcciones de control (monoespecífica anti-IL-4R, o biespecífica ficticia, que solo se unen a IL-4R).

La **Figura 8** muestra los resultados de experimentos en los que células HEK293 se trataron con una construcción SOST marcada con una etiqueta myc y una etiqueta sensible a pH (que produce una señal fluorescente a pH bajo), junto con los diversos anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos mostrados. Los resultados se expresan en relación al número de manchas fluorescentes (es decir, vesículas marcadas) por célula. El **panel A** muestra los resultados después de la incubación en hielo durante 3 horas, el **panel B** muestra los resultados después de 1 hora de incubación a 37 °C y el **panel C** muestra los resultados después de 3 horas de incubación a 37 °C.

La **Figura 9** muestra los resultados de experimentos en los que células HEK293 se trataron con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (**Panel A**) o de *S. minnesota* (**Panel B**) marcado con fluorescencia, junto con un anticuerpo biespecífico anti-CD63 x anti-LPS, anticuerpos de control o solo LPS, durante diversos tiempos, seguido de la inactivación del fluoróforo no internalizado (es decir, unido a la superficie). Por lo tanto, la señal fluorescente refleja el LPS internalizado en las diversas condiciones mostradas. Los resultados se expresan en relación con el número de manchas fluorescentes (es decir, vesículas marcadas) por célula.

### Descripción detallada

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que dicha invención no se limita a los métodos y a las condiciones particulares experimentales que se describen, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el único propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará únicamente limitado por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entiende un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente”, cuando se utiliza en referencia a un valor numérico indicado en particular, significa que el valor puede variar del valor indicado en no más del 1 %. Por ejemplo, como se utiliza en el presente documento, la expresión “aproximadamente 100” incluye 99 y 101 y todos los valores entre ellos (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención puede utilizarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

### Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno

Los presentes inventores han descubierto con sorpresa que la actividad de una molécula diana puede atenuarse enlazando la molécula diana con una proteína efectora de internalización a través de una molécula multiespecífica de unión a antígeno.

Por consiguiente, la presente invención proporciona moléculas multiespecíficas de unión a antígeno como se expone en las reivindicaciones y que comprenden un primer dominio de unión a antígeno (también denominado en el presente documento “D1”) y un segundo dominio de unión a antígeno (también denominado en el presente documento “D2”). Cada uno de D1 y D2 se une con diferentes moléculas. D1 se une específicamente con una molécula diana (D), en la que D es una proteína o un polipéptido que se asocia a un tumor que se expresa preferentemente en la superficie de una célula tumoral.

D2 se une a una proteína efectora (E) de internalización que se expresa en la superficie de células tanto tumorales como no tumorales y en la que E experimenta internalización celular y se procesa mediante una ruta de degradación intracelular. En la presente invención E es CD63. De acuerdo con la presente invención, la unión simultánea de D y E mediante la molécula multiespecífica de unión a antígeno, atenúa la actividad de D a un mayor grado que la unión de D solo mediante D1. Como se indica en el presente documento, la expresión “unión simultánea”, en el contexto

de una molécula multiespecífica de unión a antígeno, significa que la molécula multiespecífica de unión a antígeno es capaz de ponerse en contacto tanto con una molécula diana (D) como con una proteína efectora (E) de internalización durante al menos algún período de tiempo en condiciones fisiológicamente relevantes para facilitar el enlace físico entre D y E. La unión de la molécula multiespecífica de unión a antígeno con los componentes D y E puede ser secuencial; por ejemplo, la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede unirse primero a D y después a E, o puede unirse primero a E y después a D. En cualquier caso, siempre que D y E estén unidas por la molécula multiespecífica de unión a antígeno durante algún período de tiempo (independientemente del orden de unión secuencial), la molécula multiespecífica de unión a antígeno se considerará que se "une simultáneamente" a D y a E para los fines de la presente divulgación. Sin limitarse a la teoría, se cree que la inactivación potenciada de D se debe a la internalización y al redireccionamiento degradativo de D dentro de una célula debido a su enlace físico con E. Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención son por tanto útiles para la inactivación y/o reducción de la actividad y/o concentración extracelular de una molécula diana sin bloquear o antagonizar directamente la función de la molécula diana.

De acuerdo con la presente invención, una molécula multiespecífica de unión a antígeno puede ser un solo polipéptido multifuncional, o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que están asociados entre sí de manera covalente o no covalente. Como resultará obvio en la presente divulgación, cualquier construcción de unión a antígeno que tenga la capacidad de unirse simultáneamente a una molécula D y a una molécula E se considerará como una molécula multiespecífica de unión a antígeno. Cualquiera de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la invención, o variantes de las mismas, se puede construir utilizando técnicas convencionales de biología molecular (por ejemplo, tecnología de ADN recombinante y de expresión de proteínas), como sabrá un experto habitual en la técnica.

#### **Dominios de unión a antígeno**

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención comprenden:

- un primer dominio (D1) de unión a antígeno; y
- un segundo dominio (D2) de unión a antígeno;

en las que D1 se une específicamente a una molécula diana (D) en las que D es una proteína o un polipéptido que se asocia a un tumor que se expresa preferentemente en la superficie de una célula tumoral; y en las que D2 se une a una proteína efectora (E) de internalización que se expresa en la superficie de células tanto tumorales como no tumorales y en las que E experimenta internalización celular y se procesa mediante una ruta de degradación intracelular;

en las que D2 se une a E con baja afinidad, de tal manera que la molécula multiespecífica de unión a antígeno, se dirige preferentemente a células tumorales que expresan D y la unión simultánea de la molécula multiespecífica de unión a antígeno con D y E, da como resultado la internalización y degradación forzada de D en las células tumorales a través de su enlace físico con E;

en las que la afinidad de unión de D2 por E es al menos 90 % más débil que la afinidad de unión de D1 por D; y en las que E es CD63.

La expresión "se une específicamente", o expresiones similares, tal como se indica en el presente documento, significa que el dominio de unión a antígeno forma un complejo con un antígeno particular caracterizado por una constante de disociación ( $K_D$ ) de 500 pM o menor, y no se une a otros antígenos no relacionados en condiciones de ensayo habituales.

Los "antígenos no relacionados" son proteínas, péptidos o polipéptidos que tienen una identidad de aminoácidos menor de 95 % entre sí.

Las categorías ejemplares de dominios de unión a antígeno que pueden utilizarse incluyen anticuerpos, partes de unión a antígeno de anticuerpos, péptidos que interactúan específicamente con un antígeno particular (por ejemplo, peptidocuerpos), moléculas receptoras que interactúan específicamente con un antígeno particular, proteínas que comprenden una parte de unión a ligando de un receptor que se une específicamente a un antígeno particular, armazones de unión a antígeno (por ejemplo DARPins, proteínas de repetición HEAT, proteínas de repetición ARM, proteínas de repetición tetratricopeptídica y otros armazones basados en proteínas de repetición de origen natural, etc., [véase, por ejemplo, Boersma y Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22: 849-857]), y aptámeros o partes de los mismos.

En determinadas realizaciones descritas en el presente documento en las que la molécula diana o la proteína efectora de internalización es una molécula receptora, un "dominio de unión a antígeno" puede comprender o consistir en un ligando o en un parte de un ligando que es específica para el receptor. Por ejemplo, si la molécula diana (D) es IL-4R, el componente D1 de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede comprender el ligando IL-4 o una parte del ligando IL-4 que sea capaz de interactuar específicamente con IL-4R; o si la proteína efectora (E) de internalización es el receptor de transferrina, el componente D2 de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede comprender transferrina o una parte de transferrina que sea capaz de interactuar específicamente con el receptor de transferrina.

En determinadas realizaciones descritas en el presente documento en las que la molécula diana o la proteína efectora de internalización es un ligando que es específicamente reconocido por un receptor particular (por ejemplo, una molécula diana soluble), un "dominio de unión a antígeno" puede comprender o consistir en el receptor o en una parte de unión a ligando del receptor. Por ejemplo, si la molécula diana (D) es IL-6, el componente D1 de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede comprender el dominio de unión a ligando del receptor de IL-6; o si la proteína efectora (E) de internalización es una proteína indirectamente internalizada (como se define ese término en cualquier parte del presente documento), el componente D2 de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede comprender un dominio de unión a ligando de un receptor específico para E.

En la técnica se conocen bien métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente entre sí e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similar. Por ejemplo, un dominio de unión a antígeno incluye polipéptidos que se unen a un antígeno particular (por ejemplo, una molécula diana [D] o una proteína efectora [E] de internalización) o a una parte del mismo con una  $K_D$  menor de aproximadamente 500 pM, menor de aproximadamente 400 pM, menor de aproximadamente 300 pM, menor de aproximadamente 200 pM, menor de aproximadamente 100 pM, menor de aproximadamente 90 pM, menor de aproximadamente 80 pM, menor de aproximadamente 70 pM, menor de aproximadamente 60 pM, menor de aproximadamente 50 pM, menor de aproximadamente 40 pM, menor de aproximadamente 30 pM, menor de aproximadamente 20 pM, menor de aproximadamente 10 pM, menor de aproximadamente 5 pM, menor de aproximadamente 4 pM, menor de aproximadamente 2 pM, menor de aproximadamente 1 pM, menor de aproximadamente 0,5 pM, menor de aproximadamente 0,2 pM, menor de aproximadamente 0,1 pM o menor de aproximadamente 0,05 pM, como se mide en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", tal como se indica en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite analizar interacciones en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones proteicas con una matriz biodetectora, por ejemplo, utilizando el sistema BIAcore™ (Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ).

El término " $K_D$ ", tal como se indica en el presente documento, significa la constante de disociación en equilibrio de una interacción proteína-proteína particular (por ejemplo, una interacción anticuerpo-antígeno). A menos que se indique de otra manera, los valores de  $K_D$  desvelados en el presente documento se refieren a valores de  $K_D$  determinados mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial a una temperatura de 25 °C.

## ANTICUERPOS Y FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS DE UNIÓN A ANTÍGENO

Como se ha indicado anteriormente, un "dominio de unión a antígeno" (D1 y/o D2) puede comprender o consistir en un anticuerpo o en un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. El término "anticuerpo", tal como se indica en el presente documento, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR, siglas de *complementarity determining region*) que se une específicamente a, o interacciona con, un antígeno particular (por ejemplo, D o E). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas ( $H$ ) y dos cadenas ligeras ( $L$ ) interconectadas mediante enlaces disulfuro, así como sus multímeros (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio ( $C_{L1}$ ). Adicionalmente, las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR, del inglés *framework*). Cada una de las regiones  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes realizaciones de la invención, las FR de los anticuerpos de la invención (o parte de unión a antígeno de los mismos) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de manera natural o artificial. Una secuencia consenso de aminoácidos puede definirse basándose en un análisis paralelo de dos o más CDR.

Los componentes D1 y/o D2 de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención pueden comprender o consistir en fragmentos de unión a antígeno de moléculas completas de anticuerpo. Las expresiones "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, tal como se indica en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, que puede obtenerse enzimáticamente, sintéticamente o modificarse genéticamente, que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de moléculas completas de anticuerpo utilizando cualquiera de las técnicas convencionales adecuadas tales como digestión proteolítica o técnicas de modificación por ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y opcionalmente constantes de anticuerpos. Dicho ADN es conocido y/o puede obtenerse fácilmente, por ejemplo, de fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de fagos-anticuerpos), o pueden sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o utilizando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para ordenar uno o más dominios variables y/o

constantes en una configuración adecuada o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o deletar aminoácidos, etc.

Como ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno se incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>; (iii) fragmentos F<sub>d</sub>; (iv) fragmentos F<sub>v</sub>; (v) moléculas de F<sub>v</sub> monocatenarias (scFv, *single-chain Fv*); (vi) fragmentos dAb y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido de CDR3), o un péptido de restricción FR3-CDR3-FR4. Otras moléculas modificadas genéticamente, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos con dominio deletado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos con CDR injertada, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), compuestos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, del inglés *small modular immunopharmaceuticals*), y dominios variables de tipo IgNAR de tiburón, también se incluyen en la expresión "fragmentos de unión de antígeno", tal como se indica en el presente documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos un dominio variable. El dominio variable puede tener cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que sea adyacente a, o esté en fase con, una o más secuencias estructurales. En los fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V<sub>H</sub> asociado a un dominio V<sub>L</sub>, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden situarse unos con respecto a otros en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener dímeros V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> o V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio monomérico V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>.

En determinadas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable enlazado de manera covalente con al menos una región constante. Las configuraciones ejemplares, no limitantes, de dominios variables y constantes que pueden encontrarse en un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H2</sub>; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H3</sub>; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H2</sub>; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H3</sub>; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; y (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ejemplares indicadas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden enlazarse directamente entre sí o pueden enlazarse mediante una región bisagra o enlazadora total o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios constantes y/o variables adyacentes en una sola molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión a antígeno puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio constante y variable indicadas anteriormente en asociación no covalente con otro dominio y/o con uno o más dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> monoméricos (por ejemplo, mediante uno o más enlaces disulfuro).

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención pueden comprender o consistir en anticuerpos humanos y/o anticuerpos humanos recombinantes, o fragmentos de los mismos. La expresión "anticuerpo humano", tal como se indica en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. No obstante, los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular, la CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se indica en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como de un ratón, se hayan injertado sobre secuencias estructurales humanas.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención pueden comprender o consistir en anticuerpos humanos recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se indica en el presente documento, pretende incluir cualquiera de los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (descrita adicionalmente más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante (descrita adicionalmente más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para las secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden y están relacionadas con las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

## ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS

De acuerdo con determinadas realizaciones, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la invención son anticuerpos biespecíficos. En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos y pueden utilizarse para construir las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención. Los formatos biespecíficos ejemplares que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en diacuerpos o en scFv, formatos de fusiones entre IgG-scFv, dominio variable doble (DVD)-Ig, cuadroma, botones en ojales, cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con botones en ojales, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de acción doble (DAF)-IgG y formatos biespecíficos Mab<sup>2</sup> (véase, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11 para una revisión de los formatos anteriores).

## COMPONENTES MULTIMERIZANTES

En determinadas realizaciones, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención, también puede comprender uno o más componentes multimerizantes. Los componentes multimerizantes pueden funcionar para mantener la asociación entre los dominios (D1 y D2) de unión a antígeno. Como se indica en el presente documento, un "componente multimerizante" es cualquier macromolécula, proteína, polipéptido, péptido o aminoácido, que tiene la capacidad de asociarse con un segundo componente multimerizante de la misma, o similar, estructura o constitución. Por ejemplo, un componente multimerizante puede ser un polipéptido que comprende un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. Un ejemplo no limitante de un componente multimerizante es una parte Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como de cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo. En determinadas realizaciones, el componente multimerizante es un fragmento Fc o una secuencia de aminoácidos de 1 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud que contiene al menos un resto de cisteína. En otras realizaciones, el componente multimerizante es un resto de cisteína, o un péptido corto que contiene cisteína. Otros dominios multimerizantes incluyen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una cremallera de leucina, un motivo en hélice-bucle o un motivo helicoidal enrollado.

En determinadas realizaciones, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención comprenden dos dominios multimerizantes, M1 y M2, en las que D1 está unido a M1 y D2 está unido a M2, y en las que la asociación de M1 con M2 facilita el enlace físico de D1 y D2 entre sí en una sola molécula multiespecífica de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, M1 y M2 son idénticos entre sí. Por ejemplo, M1 puede ser un dominio Fc que tiene una secuencia de aminoácidos particular y M2 es un dominio Fc con la misma secuencia de aminoácidos que M1. Como alternativa, M1 y M2 pueden diferir entre sí en una o más posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, M1 puede comprender un primer dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina (Ig) y M2 puede comprender un segundo dominio C<sub>H3</sub> de Ig, en el que el primer y el segundo dominio C<sub>H3</sub> de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en el que al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión de la construcción diana con la proteína A en comparación con una construcción de referencia que tiene secuencias M1 y M2 idénticas. En una realización, el dominio C<sub>H3</sub> de Ig de M1 se une a la proteína A y el dominio C<sub>H3</sub> de Ig de M2 contiene una mutación que reduce o anula la unión con la proteína A, tal como una modificación H95R (según la numeración IMGT de exones; H435R según la numeración de EU). El dominio C<sub>H3</sub> de M2 puede comprender adicionalmente una modificación Y96F (según la numeración IMGT de exones; Y436F según la numeración de EU). Como modificaciones adicionales que pueden encontrarse en el dominio C<sub>H3</sub> de M2 se incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (según la IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I según la EU) en el caso de un dominio Fc de IgG1; N44S, K52N y V82I (según la IMGT; N384S, K392N y V422I según la EU) en el caso de un dominio Fc de IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (según la IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I según la EU) en el caso de un dominio Fc de IgG4.

## PROTEÍNAS EFECTORAS (E) DE INTERNALIZACIÓN

En el presente documento se describen moléculas multiespecíficas de unión a antígeno en las que el componente D2 se une específicamente a una proteína efectora ("E") de internalización. Una proteína efectora de internalización es una proteína que es capaz de internalizarse en una célula o que de otra manera participa en, o contribuye al, tránsito de membrana retrogrado. En algunos casos, la proteína efectora de internalización es una proteína que experimenta transcitosis, esto es, la proteína se internaliza en un lado de una célula y se transporta al otro lado de la célula (por ejemplo, apical-a-basal). En muchas realizaciones, la proteína efectora de internalización es una proteína expresada en la superficie celular o una proteína extracelular soluble. Sin embargo, la presente divulgación también contempla realizaciones en las que la proteína efectora de internalización se expresa dentro de un compartimento intracelular, tal como el endosoma, el retículo endoplasmático, el Golgi, lisosomas, etc. Por ejemplo, las proteínas implicadas en el tránsito de membrana retrógrado (por ejemplo, rutas desde endosomas tempranos/reciclaje a la red trans-Golgi) pueden actuar como proteínas efectoras de internalización. En cualquier caso, la unión de D2 con una proteína efectora de internalización origina la molécula multiespecífica de unión a antígeno y cualquiera de las moléculas asociadas con la misma (por ejemplo, una molécula diana unida mediante D1), para internalizarse también en la célula. Como se explica más adelante, las proteínas efectoras de internalización incluyen proteínas que están directamente internalizadas en una célula, así como proteínas que están indirectamente internalizadas en una célula.

Las proteínas efectoras de internalización que se internalizan directamente en una célula incluyen moléculas asociadas a membrana con al menos un dominio extracelular (por ejemplo, proteínas transmembrana, proteínas ancladas mediante GPI (glucosilfosfatidilinositol), etc.), que experimentan internalización celular y se procesan preferentemente mediante una ruta de degradación y/o de reciclaje intracelular. Como ejemplos no limitantes específicos de proteínas efectoras de internalización que están indirectamente internalizadas en una célula se incluyen, por ejemplo, CD63, MHC-I (por ejemplo, HLA-B27), Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de la proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína 2 similar a la proteína precursora amiloidea (APLP2), receptor de apelina (APLNR), MAL (proteína de mielina y linfocitos, del inglés *Myelin And Lymphocyte protein*, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H<sup>+</sup> de tipo vacuolar, receptor de la toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatión, receptores de leptina, receptores de antioxidantes (*scavenger*) (por ejemplo, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36), etc. En las moléculas de unión de la presente invención E es CD63.

En realizaciones en las que E es una proteína efectora internalizada directamente, el componente D2 de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a E, o un ligando o una parte de un ligando que interacciona específicamente con la proteína efectora. Por ejemplo, si E es Kremen-1 o Kremen-2, el componente D2 puede comprender o consistir en un ligando de Kremen (por ejemplo, DKK1) o en una parte de unión a Kremen del mismo. Como otro ejemplo, si E es una molécula receptora, tal como ASGR1, el componente D2 puede comprender o consistir en un ligando específico para el receptor (por ejemplo, asialo-orosomucoide [ASOR] o Beta-GalNAc) o en una parte de unión al receptor del mismo.

Las proteínas efectoras de internalización que se internalizan indirectamente en una célula, incluyen proteínas y polipéptidos que de por sí no se internalizan, pero que comienzan a internalizarse en una célula después de unirse a, o de otra manera, asociarse a una segunda proteína o polipéptido que se internaliza directamente en la célula. Las proteínas que se internalizan indirectamente en una célula incluyen, por ejemplo, ligandos solubles que son capaces de unirse a una molécula receptora de internalización expresada en la superficie celular. Un ejemplo no limitante de un ligando soluble que se internaliza (indirectamente) es una célula mediante su interacción con una molécula receptora de internalización expresada en la superficie celular es la transferrina. En realizaciones en las que E es transferrina (u otra proteína internalizada indirectamente), la unión de D2 con E, y la interacción de E con el receptor de transferrina (u otra molécula receptora de internalización expresada en la superficie celular), origina la molécula multiespecífica de unión a antígeno completa y cualquiera de las moléculas asociadas al mismo (por ejemplo, una molécula diana unida por D1), para comenzar a internalizarse en la célula simultáneamente con la internalización de E y su compañero de unión.

En realizaciones en las que E es una proteína efectora internalizada indirectamente, tal como un ligando soluble, el componente D2 de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a E, o un receptor o una parte de un receptor que interacciona específicamente con la proteína efectora soluble. Por ejemplo, si E es una citocina, el componente D2 puede comprender o consistir en el receptor de citocina correspondiente o en una parte de unión a ligando del mismo.

#### **MOLÉCULAS DIANA (D)**

El componente D1 de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno descritas en el presente documento, se unen específicamente molécula diana ("D"). Una molécula diana es cualquier proteína, polipéptido, u otra macromolécula, cuya actividad o concentración extracelular se desea atenuar, reducir o eliminar. En muchos casos, la molécula diana con la que se une D1 es una proteína o un polipéptido [es decir, una "proteína diana"]; sin embargo, la presente divulgación también incluye realizaciones en las que la molécula diana ("D") es un hidrato de carbono, una glucoproteína, un lípido, una lipoproteína, un lipopolisacárido, u otro polímero no proteico o molécula no proteica con la que se une D1. De acuerdo con la presente divulgación, D puede ser una proteína diana expresada en la superficie celular o una proteína diana soluble. La unión de la diana con la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede tener lugar en un contexto de superficie celular o extracelular. Sin embargo, en determinadas realizaciones, la molécula multiespecífica de unión a antígeno se une a una molécula diana dentro de la célula, por ejemplo, dentro de un componente intracelular, tal como el retículo endoplasmático, el Golgi, un endosoma, un lisosoma, etc.

Como ejemplos de moléculas diana expresadas en la superficie celular se incluyen receptores expresados en la superficie celular, ligandos unidos a membrana, canales iónicos y cualquier otro componente polipeptídico, monomérico o multimérico, con una parte extracelular que está conectada, o asociada, a una membrana celular. Como ejemplos no limitantes de moléculas diana expresadas en la superficie celular que pueden dirigirse a través de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno descritas en el presente documento se incluyen, por ejemplo, receptores de citocina (por ejemplo, receptores para IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33, etc.), así como dianas de la superficie celular que incluyen otros receptores de transmembrana de tipo 1, tales como PRLR, receptores acoplados a proteína G, tales como GCGR, canales iónicos tales como Nav1.7, ASIC1 o ASIC2, proteínas de superficie no receptoras, tales como MHC-I (por ejemplo, HLA-B\*27), etc.

En realizaciones en las que D es una proteína diana expresada en la superficie celular, el componente D1 de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a D, o un ligando o parte de un ligando que interacciona específicamente con la proteína diana expresada en la superficie celular. Por ejemplo, si D es IL-4R, el componente D1 puede comprender o consistir en IL-4 o en una parte de unión al receptor del mismo.

Como ejemplos de moléculas diana solubles se incluyen citocinas, factores de crecimiento y otros ligandos y proteínas de señalización. Proteínas dianas solubles ejemplares, no limitantes, que pueden dirigirse por las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33, SOST, DKK1, etc. Moléculas diana solubles también incluyen, por ejemplo, moléculas diana no humanas tales como alérgenos (por ejemplo, Fel D1, Betv1, CryJ1), patógenos (por ejemplo, *Candida albicans*, *S. aureus*, etc.) y moléculas patógenas (por ejemplo, lipopolisacárido [LPS], ácido lipoteicoico [LTA], proteína A, toxinas, etc.). En realizaciones en las que D es una molécula diana soluble, el componente D1 de la molécula multiespecífica de unión a antígeno, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a D, o un receptor o una parte de un receptor que interacciona específicamente con la molécula diana soluble. Por ejemplo, si D es IL-4, el componente D1 puede comprender o consistir en IL-4R o en una parte de unión a ligando del mismo.

Las moléculas diana también incluyen antígenos asociados a tumor, como se describe en cualquier parte del presente documento. En la presente invención, la molécula diana "D" es una proteína o un polipéptido que se asocia a un tumor preferencialmente expresado en la superficie de una célula tumoral.

### UNIÓN DEPENDIENTE DE pH

La presente invención proporciona moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden un primer dominio (D1) de unión a antígeno y un segundo dominio (D2) de unión a antígeno, en la que uno o ambos de los dominios (D1 y/o D2) de unión a antígeno se une(n) a su antígeno (D o E) de una manera dependiente de pH. Por ejemplo, un dominio de unión a antígeno (D1 y/o D2) puede presentar unión reducida con su antígeno a un pH ácido en comparación con un pH neutro. Como alternativa, un dominio de unión a antígeno (D1 y/o D2) puede presentar unión potenciada con su antígeno a pH ácido en comparación con un pH neutro. Los dominios de unión a antígeno con características de unión dependientes de pH pueden obtenerse, por ejemplo, explorando una población de anticuerpos con respecto a la unión reducida (o potenciada) con un antígeno particular a un pH ácido en comparación con un pH neutro. De manera adicional, modificaciones del dominio de unión a antígeno a nivel de aminoácido pueden producir dominios de unión a antígeno con características dependientes de pH. Por ejemplo, sustituyendo uno o más aminoácidos de un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, dentro de una CDR) por un resto de histidina, puede obtenerse un dominio de unión a antígeno con unión antigénica reducida a pH ácido con respecto a un pH neutro.

En determinadas realizaciones, la presente invención incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden un componente D1 y/o D2 que se une a su antígeno respectivo (T o E) a pH ácido con una  $K_D$  que es al menos aproximadamente 3, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 veces, o más, mayor que la  $K_D$  del componente D1 y/o D2 para la unión con su antígeno respectivo a pH neutro. La unión dependiente de pH también puede expresarse en relación a la semivida ( $t_{1/2}$ ) del dominio de unión a antígeno para su antígeno a pH ácido en comparación con un pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden un componente D1 y/o D2 que se une a su antígeno respectivo (D o E) a pH ácido con una  $t_{1/2}$  que es al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 veces, o más, menor que la  $t_{1/2}$  del componente D1 y/o D2 para la unión con su antígeno respectivo a pH neutro.

Cuando las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención, que comprenden un componente D1 y/o D2 con unión antigénica reducida a pH ácido en comparación con un pH neutro, se administran a sujetos animales, pueden presentar, en determinadas realizaciones, una eliminación más lenta de la circulación en comparación con moléculas comparables que no presentan características de unión dependientes de pH. De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporcionan moléculas multiespecíficas de unión a antígeno con unión antigénica reducida con cualquiera de D y/o E a pH ácido en comparación con pH neutro, que presentan una eliminación de la circulación al menos 2 veces más lenta con respecto a moléculas de unión a antígeno comparables que no poseen unión antigénica reducida a pH ácido en comparación con pH neutro. La velocidad de eliminación puede expresarse en relación a la semivida del anticuerpo, donde una eliminación más lenta se correlaciona con una semivida más larga.

Como se indica en el presente documento, la expresión "pH ácido" significa un pH de 6,0 o menor. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH de aproximadamente 6,0, 5,95, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0, o menores. Como se indica en el presente documento, la expresión "pH neutro" significa un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

### ATENUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA MOLÉCULA DIANA

Como se indica en cualquier parte del presente documento, y como se demuestra más adelante a través de los ejemplos de trabajo del presente documento, los presentes inventores han descubierto que la unión simultánea de la molécula diana (D) y de una proteína efectora (E) de internalización mediante una molécula multiespecífica de unión a antígeno, atenúa la actividad de la diana, D, a un mayor grado que la unión de D solo mediante el primer componente de dominio (D1) de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno. Como se indica en el presente documento, la expresión "atenúa la actividad de D a un mayor grado que la unión de D solo mediante D1" significa que, en un ensayo en el que la actividad de D puede medirse utilizando células que expresan E, el nivel de actividad de actividad de D medido en presencia de una molécula multiespecífica de unión a antígeno es al menos 10 % menor que el nivel de actividad de D medido en presencia de una construcción de control que contiene D1 en sí mismo (es decir, sin estar físicamente unido al segundo dominio (D2) de unión a antígeno). Por ejemplo, el nivel de actividad de D medido en presencia de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede ser aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % menor que el nivel de actividad de D medido en presencia de una construcción de control que contiene D1 en sí mismo.

Más adelante, en los Ejemplos de trabajo 1 y 2 del presente documento, se muestra un formato de ensayo ilustrativo, no limitante, para determinar si una molécula multiespecífica de unión a antígeno atenúa la actividad de una molécula diana a un mayor grado que la unión de la molécula diana mediante solo el dominio D1. En el Ejemplo 1, por ejemplo, "D" es el receptor de interleucina-4 (IL-4R) y "E" es CD63. La molécula multiespecífica de unión a antígeno del Ejemplo 1 es un conjugado de 2 anticuerpos que comprende un anticuerpo monoclonal, mAb, anti-IL-4R, ligado a un mAb anti-CD63 a través de un enlazador de estreptavidina/biotina. Por tanto, "D1", en esta construcción ejemplar, es el dominio de unión a antígeno (par HCVR/LCVR) del anticuerpo anti-IL-4R, y "D2" es el dominio de unión a antígeno (par HCVR/LCVR) del anticuerpo anti-CD63. Para los experimentos de los Ejemplos 1 y 2, se utilizó un formato de ensayo basado en células, que producía una señal indicadora cuando la actividad de IL-4R se estimulaba mediante la adición del ligando exógeno IL-4. La cantidad de actividad indicadora inducida por IL-4 detectada en presencia de la molécula multiespecífica de unión a antígeno, se comparó con la cantidad de actividad indicadora inducida por IL-4 detectada en presencia de construcciones de control que contenían el anticuerpo anti-IL-4R conectado a una inmunoglobulina de control irrelevante (control 1), o combinado, aunque no físicamente conectado, con el anticuerpo anti-CD63 (control 2). Las construcciones de control producen por tanto la condición en la que la diana, D, está unida solo mediante D1 (es decir, en la que D1 no es de por sí una parte de la molécula multiespecífica de unión a antígeno). Si el grado de actividad de la molécula diana (representado por la señal indicadora) observado en presencia de la molécula multiespecífica de unión a antígeno es al menos 10 % menor que la cantidad de actividad de la molécula diana observada en presencia de una construcción de control que comprende el componente D1 no ligado físicamente al componente D2 (por ejemplo, control 1 o control 2), entonces para los propósitos de la presente divulgación, se llega a la conclusión de que "la unión simultánea de D y E mediante la molécula multiespecífica de unión a antígeno atenúa la actividad D a un mayor grado que la unión de D solo mediante D1".

En algunas realizaciones, la unión de la diana, D, solo mediante D1, puede dar como resultado la atenuación parcial de la actividad de D (como ocurre en el caso del Ejemplo 1, en el que el tratamiento de células indicadoras solo con anticuerpo anti-IL-4R [es decir, controles 1 y 2] causa un pequeño nivel de atenuación de señalización de IL-4 con respecto a células no tratadas). En otras realizaciones, la unión de D solo mediante D1 dará como resultado la atenuación no detectable de la actividad de D; es decir, la actividad biológica de D puede no estar afectada por la unión de D solo mediante D1. Sin embargo, en cualquier caso, la unión simultánea de D y E mediante una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la invención, atenuará la actividad de D a un mayor grado que la unión de D solo mediante D1.

Formatos de ensayo alternativos y variaciones del formato, o de los formatos de ensayo ilustrados en el presente documento, serán obvios para los expertos habituales en la técnica, teniendo en cuenta la naturaleza de la molécula diana específica y de las proteínas efectoras a las que puede dirigirse cualquier molécula multiespecífica de unión a antígeno determinada. En el contexto de la presente invención, puede utilizarse cualquier formato de este tipo para determinar si la unión simultánea de D y E mediante una molécula multiespecífica de unión a antígeno atenúa la actividad de D a un mayor grado que la unión de D solo mediante D1.

## DIRECCIONAMIENTO TUMORAL

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención son útiles para el direccionamiento de células tumorales. En la presente invención, la molécula diana "D" con la cual se une D1 es una proteína o un polipéptido que se asocia a un tumor, que se expresa preferentemente en la superficie de una célula tumoral. En determinados casos, el antígeno asociado a tumor es un antígeno que habitualmente no está internalizado.

Como se indica en el presente documento, la expresión "antígeno asociado a tumor" incluye proteínas o polipéptidos que se expresan preferentemente en la superficie de una célula tumoral. La expresión "se expresa preferentemente", tal como se indica en este contexto, significa que el antígeno se expresa en una célula tumoral a un nivel que es al menos 10 % mayor (por ejemplo, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 150 %, 200 %, 400 %, o más) que el nivel de expresión del antígeno en células no tumorales. En determinadas realizaciones, la molécula diana es un antígeno que se expresa preferentemente en la superficie de una célula

tumoral seleccionada del grupo que consiste en una célula tumoral renal, una célula tumoral de colon, una célula tumoral de mama, una célula tumoral de ovario, una célula tumoral de piel, una célula tumoral de pulmón, una célula tumoral de próstata, una célula tumoral de páncreas, una célula de glioblastoma, una célula tumoral de cabeza y cuello y una célula de melanoma. Como ejemplos no limitantes de antígenos específicos asociados a tumor se incluyen, por ejemplo, AFP, ALK, proteínas BAGE,  $\beta$ -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa carbónica IX, caspasa-8, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, ciclina-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (por ejemplo, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glicicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, proteínas MAGE (por ejemplo, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 y -12), MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivina, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, tirosinasa y uroplaquina-3.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno pueden conjugarse con un fármaco, una toxina, un radioisótopo, o con otra sustancia que sea perjudicial para la viabilidad de una célula. Como alternativa, el fármaco o la toxina puede ser una sustancia que no destruya directamente una célula, sino que la haga más susceptible a la destrucción mediante otros agentes externos. En otras realizaciones adicionales que implican el direccionamiento tumoral, la molécula multiespecífica de unión a antígeno de la invención no está en sí misma conjugada con un fármaco, una toxina o un radioisótopo, sino que se administra en combinación con una segunda molécula de unión a antígeno específica para la diana (D) (en el presente documento denominada "molécula cómplice"), en la que la molécula cómplice está conjugada con un fármaco, una toxina o un radioisótopo. En dichas realizaciones, la molécula multiespecífica de unión a antígeno se unirá preferentemente a un epítipo en la molécula diana (D) que es distinta de y/o no solapante con el epítipo reconocido por la molécula cómplice (es decir, para permitir la unión simultánea de la molécula multiespecífica de unión a antígeno y la molécula cómplice con la diana).

La presente divulgación también incluye combinaciones antitumorales, y métodos terapéuticos, que comprenden: (a) una molécula de unión a antígeno conjugada con una toxina o un fármaco que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor; y (b) una molécula multiespecífica de unión a antígeno que comprende (i) un primer dominio de unión que se une específicamente a una proteína efectora de internalización (por ejemplo, con baja afinidad) y (ii) un segundo dominio de unión que se une específicamente a la molécula de unión a antígeno conjugada con una toxina o un fármaco. En esta realización, la molécula multiespecífica de unión a antígeno actúa enlazando la molécula de unión a antígeno conjugada con toxina o fármaco con la proteína efectora de internalización, actuando por tanto enlazando físicamente el antígeno asociado a tumor con la proteína efectora de internalización. Por consiguiente, la internalización del anticuerpo anti antígeno asociado a tumor marcado con toxina mediante su conexión con la proteína efectora de internalización daría como resultado la destrucción de la célula tumoral diana.

De acuerdo con determinadas realizaciones de las moléculas de direccionamiento tumoral de la invención, la molécula multiespecífica de unión a antígeno (o anticuerpo cómplice) puede conjugarse con uno o más fármacos citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en: caliqueamicina, esperamicina, metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cisplatino etopósido, bleomicina, 5-fluorouracilo, estramustina, vincristina, etopósido, doxorubicina, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, orataxel, docetaxel, dolastatina 10, auristatina E, auristatina PHE y compuestos basados en maitansina (por ejemplo, DM1, DM4, etc.). La molécula multiespecífica de unión a antígeno (o anticuerpo cómplice) también puede, o como alternativa puede, conjugarse con una toxina tal como la toxina diftérica, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas *Phytolaca americana*, etc. La molécula multiespecífica de unión a antígeno (o anticuerpo cómplice) también puede, o como alternativa puede, conjugarse con uno o más radioisótopos seleccionados del grupo que consiste en  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{121}\text{Pb}$ ,  $^{224}\text{Ra}$  y  $^{223}\text{Ra}$ . Por tanto, la invención incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que son conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, siglas del inglés *antibody-drug conjugates*) o conjugados de anticuerpo-radioisótopo (ARC, siglas del inglés *antibody-radioisotope conjugates*).

En la presente invención, el componente D2 se une con baja actividad a la proteína efectora "E" de internalización, de tal manera que la molécula multiespecífica de unión a antígeno se dirige preferentemente a células tumorales que expresan el antígeno "D" asociado a tumor. La afinidad de unión del componente D2 por la proteína efectora (E) de internalización es al menos 90 % más débil que la afinidad de unión del componente D1 por la molécula diana (D). En determinadas realizaciones, unión de "baja afinidad" significa que el componente D2 interacciona con la proteína efectora (E) de internalización con una  $K_D$  mayor de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

La unión simultánea de una molécula multiespecífica de unión a antígeno con una proteína efectora de internalización y un antígeno asociado a tumor, dará como resultado la internalización preferencial de la molécula multiespecífica de unión a antígeno en las células tumorales. Si, por ejemplo, la molécula multiespecífica de unión a antígeno está conjugada con un fármaco, una toxina o un radioisótopo (o si la molécula multiespecífica de unión a antígeno se administra en combinación con un anticuerpo cómplice que se conjuga con un fármaco, una toxina o un

radioisótopo), la internalización dirigida del antígeno asociado a tumor en la célula tumoral mediante su enlazamiento con la molécula multiespecífica de unión a antígeno, dará como resultado la destrucción celular tumoral extremadamente específica.

## 5 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula multiespecífica de unión a antígeno. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con transportadores, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan transferencia, suministro, tolerancia y características similares, mejoradas.

En el presente documento también se describen métodos para la inactivación o atenuación de la actividad de una molécula diana (D). Los métodos comprenden poner en contacto una molécula diana con una molécula multiespecífica de unión a antígeno como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, el método comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende una molécula multiespecífica de unión a antígeno, para el cual es deseable y/o beneficioso inactivar, atenuar o de otra manera disminuir la concentración extracelular de una molécula diana.

En la técnica se conocen diversos sistemas de suministro y pueden utilizarse para administrar a un paciente las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Los métodos de administración que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en embolada, por absorción a través de los recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.), y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Por ejemplo, una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede suministrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa convencional. Además, con respecto al suministro subcutáneo, también puede utilizarse un dispositivo de suministro de tipo pluma para administrar a un paciente una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

### 30 Ejemplos

Para ofrecer a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo preparar y utilizar los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento, se proponen los siguientes ejemplos que no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran que es su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) aunque deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se expresa en grados centígrados y la presión es la presión atmosférica o casi atmosférica.

#### 40 **Ejemplo 1. Uso de una molécula multiespecífica de unión a antígeno para inducir la degradación de un receptor de superficie celular mediante enlazamiento con una proteína efectora de internalización**

Como un experimento demostrativo preliminar (*proof-of-concept*) inicial, se creó una molécula multiespecífica de unión a antígeno que era capaz de unirse (a) a una molécula efectora de internalización y (b) a una molécula diana receptora de la superficie celular. En este ejemplo, la proteína efectora de internalización es Kremen-2 (Krm2) y la molécula diana receptora de la superficie celular es un receptor de Fc (FcγR1 [Fc-gamma-R1]).

Las moléculas Kremen (Krm1 y Krm2) son proteínas de la superficie celular que se sabe que intervienen en la señalización de WNT direccionando la internalización y degradación de las moléculas de señalización LRP5 y LRP6 de la ruta de WNT. La internalización de las moléculas LRP5/6 se realiza a través de la proteína de interacción soluble DKK1. En particular, la molécula DKK1 enlaza las moléculas Kremen con las moléculas LRP5/6 en la superficie celular y debido a este enlace, la internalización de Kremen conduce la internalización y degradación de LRP5 y LRP6. (Véase Li *et al.*, PLoS One 5(6):e11014).

Los presentes inventores pretendían aprovechar las propiedades de unión con Kremen de DKK1 y las propiedades de internalización de Kremen para inducir la internalización de FcγR1. Para facilitar la internalización/degradación, mediada por Kremen, de FcγR1, se construyó una molécula multiespecífica de unión a antígeno que consistía en DKK1 fusionada a una Fc de ratón (DKK1-mFc, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1).

En primer lugar se realizó un experimento para determinar si DKK1-mFc podía experimentar endocitosis en las células en una manera dependiente de Kremen. Para este experimento se utilizaron dos líneas celulares: Célula-1, una línea celular HEK293 modificada por ingeniería genética que expresa FcγR1 pero no Kremen-2 y Célula-2, una línea celular HEK293 modificada por ingeniería genética que expresa tanto FcγR1 como Kremen-2. A las líneas celulares respectivas se añadió una dilución 1:10 de medio acondicionado con DKK1-mFc y se dejó incubar a 37 °C durante 90 minutos. Después de un tiempo de incubación de 90 minutos, las células se tiñeron con anticuerpo anti IgG de ratón marcado con Alexa-488 para detectar la molécula DKK1-mFc. Utilizando microscopía de fluorescencia se observó que

prácticamente no había ninguna molécula DKK1-mFc en la línea celular Célula-1 (que no expresaba Kremen); sin embargo, en la línea celular Célula-2 que expresaba Kremen-2 se detectaron cantidades sustanciales de DKK1-mFc. Por tanto, estos resultados muestran que la molécula multiespecífica de unión a antígeno DKK1-mFc puede internalizarse en las células de una manera dependiente de Kremen.

A continuación, se realizó un experimento de evolución temporal para determinar si DKK1-mFc podía inducir la degradación de FcγR1 de una manera dependiente de Kremen. A continuación se indica una breve descripción del protocolo experimental: Célula-1 (que solo expresa FcγR1) y Célula-2 (que expresa Kremen-2 y FcγR1) se trataron con NHS-Sulfo-Biotina (N-hidroxisulfosuccinimidobiotina) 2 mg/ml durante 15 minutos en hielo para marcar todas las proteínas expresadas en la superficie celular. Después, las células se lavaron y resuspendieron en 400 μl de medio y se dividió en cuatro partes alícuotas de 100 μl que se trataron con DKK1-mFc durante diversas cantidades de tiempo (0 min, 15 min, 30 min y 60 min) a 37 °C. Después de la incubación con DKK1-mFc, las células se sedimentaron y se trataron con inhibidores de proteasa. Los lisados de las células de los diferentes puntos de incubación temporales se sometieron a inmunoprecipitación de FcγR1. Para la inmunoprecipitación de FcγR1, se añadió anticuerpo de ratón anti-FcγR1 a los lisados celulares y se incubó durante 1 hora a 4 °C. Después, se añadieron perlas de proteína G y la mezcla se incubó durante 1 hora a 4 °C. Después, las perlas se lavaron y las proteínas se eluyeron y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana y se exploraron con estreptavidina marcada con HRP para revelar cantidades relativas de proteína FcγR1 que quedaba expuesta en la superficie en cada muestra. En la figura 2 se muestran los resultados.

Como se ilustra en la figura 2, la cantidad de proteína FcγR1 expuesta en la superficie en las muestras Célula-1 (que expresan FcγR1 pero no Kremen-2) permaneció relativamente constante, independientemente de la cantidad de tiempo que las células estaban expuestas a DKK1-mFc. En cambio, la cantidad de proteína FcγR1 expuesta en la superficie en las muestras Célula-2 (que expresan tanto Kremen-2 como FcγR1) disminuyó sustancialmente al aumentar los tiempos de incubación con DKK1-mFc. Por lo tanto, este experimento demuestra que DKK1-mFc induce la degradación de la proteína FcγR1, expresada en la superficie celular, de una manera dependiente de Kremen-2.

En su conjunto, los resultados anteriores muestran que una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se une simultáneamente a una molécula diana de la superficie celular (FcγR1) y a una proteína efectora de internalización (Kremen-2), puede inducir la degradación de la molécula diana de una manera dependiente de la proteína efectora.

### **Ejemplo 2. La actividad de IL-4R se atenúa utilizando una molécula multiespecífica de unión a antígeno con especificidad por IL-4R y CD63**

En un conjunto adicional de experimentos demostrativos preliminares, se construyó una molécula multiespecífica de unión a antígeno que podía unirse simultáneamente a una molécula diana expresada en la superficie celular (es decir, IL-4R) y a una proteína efectora de internalización expresada en la superficie celular (es decir, CD63). El propósito de estos experimentos era determinar si la actividad de IL-4R en la célula podría atenuarse a un mayor grado enlazando físicamente IL-4R con una molécula efectora que se internaliza y se dirige para la degradación dentro del lisosoma (en este caso, CD63). En otras palabras, este ejemplo se diseñó para analizar si la internalización y degradación normal de CD63 podía utilizarse para forzar la internalización y el direccionamiento degradativo de IL-4R en una célula.

En primer lugar, se construyó una molécula multiespecífica de unión a antígeno que podía unirse tanto a IL-4R como a CD63. Específicamente, un anticuerpo anti-IL-4R conjugado con estreptavidina y un anticuerpo anti-CD63 biotinilado (marcado con biotina) se combinaron a una proporción de 1:1 para producir un conjugado anti-IL-4R:anti-CD63 (es decir, una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se une específicamente tanto a IL-4R como a CD63). El anticuerpo anti-IL-4R utilizado en este ejemplo es un mAAb (anticuerpo monoclonal) completamente humano suscitado contra el dominio extracelular de IL-4R. (El anticuerpo anti-IL-4R comprende una región variable de cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 4). El anticuerpo anti-CD63 utilizado en este ejemplo es el mAAb anti-CD63 humano, clon MEM-259, obtenido en Biolegend (San Diego, CA), catálogo n.º 312002.

También se crearon dos construcciones de control: Control-1 = anticuerpo anti-IL-4R conjugado con estreptavidina combinado a una proporción de 1:1 con anticuerpo IgG1kappa de ratón de control biotinilado; y Control-2 = anticuerpo anti-IL-4R conjugado con estreptavidina combinado a una proporción de 1:1 con anticuerpo anti-CD63 no biotinilado. El anticuerpo anti-IL-4R, utilizado en las construcciones experimentales y de control para este ejemplo, es un anticuerpo que se sabe que se une específicamente a IL-4R y que bloquea, solo parcialmente, la señalización mediada por IL-4.

La línea celular experimental utilizada en este ejemplo es una línea celular HEK293 que contiene una construcción indicadora STAT6-luciferasa y STAT6 adicional ("células HEK293/STAT6-luc"). Las células utilizadas en este experimento expresan tanto IL-4R como CD63 en su superficie. Cuando se trata con IL-4 en ausencia de cualquier inhibidor, esta línea celular produce una señal quimioluminiscente detectable dependiente de la dosis que refleja el grado de señalización mediada por IL-4.

En un experimento inicial, la molécula multiespecífica experimental anti-IL-4R/anti-CD63, o las construcciones de control, se añadieron a las células HEK293/STAT6-luc, de tal manera que la concentración final de anticuerpo anti-IL-4R en el medio fuera de 12,5 nM. La señal indicadora se midió a concentraciones en aumento de IL-4 en presencia y en ausencia de construcciones experimentales y de control (figura 3). Como se observa en la figura 3, la molécula multiespecífica anti-IL-4R/anti-CD63 ("conjugado de ab") inhibió la señalización mediada por IL-4 a un grado significativamente mayor que cualquiera de las construcciones de control.

Para confirmar que el efecto observado en la figura 3 era dependiente de CD63, se realizó el mismo experimento descrito anteriormente, excepto que la expresión de CD63 se redujo significativamente en la línea celular indicadora utilizando un ARNip dirigido contra CD63. Al reducir significativamente la expresión de CD63, no volvió a observarse actividad inhibidora potenciada de la molécula multiespecífica anti-IL-4R/anti-CD63 (figura 4). Este resultado sugiere que la capacidad de la molécula multiespecífica anti-IL-4R/anti-CD63 para atenuar la señalización mediada por IL-4 se debe a la unión simultánea de la molécula multiespecífica con IL-4R y CD63 y a la internalización y degradación consecuente de todo el complejo de anticuerpo IL-4R-CD63.

Se realizaron experimentos similares en los que, antes de la adición de IL-4, se permitió que la molécula multiespecífica anti-IL-4R/anti-CD63, o las construcciones de control, se incubasen con la línea celular indicadora HEK293/STAT6-luc durante diversas cantidades de tiempo. En un primer conjunto de dichos experimentos, se permitió que las moléculas se incubasen con la línea celular indicadora durante 0 horas (es decir, añadida simultáneamente con IL-4), 2 horas, o durante una noche, antes de la adición de IL-4 50 pM. La actividad luciferasa se midió seis horas después de la adición de IL-4. Los resultados se muestran en la figura 5, panel superior ("no transfected"). En otro conjunto de experimentos, se realizó un protocolo similar, excepto que se permitió que las moléculas experimentales o de control se incubasen con la línea celular indicadora durante 15 minutos, 30 minutos, 1 hora o 2 horas, antes de la adición de IL-4 50 pM. Los resultados se muestran en la figura 6.

Los resultados resumidos en las figuras 5 y 6 muestran que la molécula multiespecífica anti-IL-4R/anti-CD63 puede inhibir la señalización mediada por IL-4, y que este efecto inhibitorio se potencia con tiempos de incubación más prolongados. Al igual que sucedía con el conjunto de experimentos inicial, se confirmó, utilizando un ARNip dirigido contra CD63, que el efecto inhibitorio de la molécula multiespecífica anti-IL-4R/anti-CD63 era dependiente de la expresión de CD63 (figura 5 panel inferior ["ARNip contra CD63"]).

Resumiendo, este ejemplo proporciona una demostración preliminar adicional de la inhibición de la actividad de una molécula diana, utilizando una molécula multiespecífica de unión a antígeno que puede unirse simultáneamente tanto a la molécula diana (en este caso IL-4R), como a una proteína efectora de internalización (en este caso CD63), para de este modo causar la internalización y el direccionamiento degradativo de la molécula diana en una célula. Dicho de otra manera, la unión simultánea de IL-4R y CD63 a través de la molécula multiespecífica de unión a antígeno ejemplar, atenúa la actividad de IL-4R a un grado sustancialmente mayor (es decir, > 10 %) que la unión de IL-4R a través de solo las construcciones de control.

### **Ejemplo 3. Un anticuerpo biespecífico anti-IL-4R x anti-CD63 atenúa la actividad de IL-4R de una manera dependiente de CD63**

Los experimentos del ejemplo 2 del presente documento, muestran que una molécula multiespecífica, anti-IL-4R/anti-CD63, inhibe la señalización mediada por IL-4 de una manera dependiente de CD63. En estos experimentos, la molécula multiespecífica de unión a antígeno consiste en dos anticuerpos monoclonales distintos (anti-IL-4R y anti-CD63) que están conectados mediante un enlace de biotina-estreptavidina. Para confirmar que los resultados observados con esta molécula multiespecífica de unión a antígeno, demostrativa preliminar, eran generalizables a otros formatos de molécula multiespecífica de unión a antígeno, se construyó un verdadero anticuerpo biespecífico.

Para construir un anticuerpo biespecífico se utilizó tecnología estándar de anticuerpo biespecífico que consiste en un primer brazo específico de IL-4R y en un segundo brazo específico de CD63. El brazo específico de IL-4R contenía una cadena pesada anti-IL-4R emparejada con una cadena ligera específica de CD63. La cadena ligera específica de CD63 se emparejó con la cadena pesada específica de IL-4R, exclusivamente por comodidad a la hora de realizar la construcción; no obstante, el emparejamiento de la cadena pesada anti-IL-4R con la cadena ligera anti-CD63 conservó especificidad completa por IL-4R y no presentó unión con CD63. El brazo específico de CD63 contenía una cadena pesada anti-CD63 emparejada con una cadena ligera anti-CD63 (la misma cadena ligera que la utilizada en el brazo de IL-4R). La cadena pesada anti-IL-4R (que comprende la SEQ ID NO: 3) procedía del anticuerpo anti-IL-4R completo como el utilizado en el ejemplo 2; sin embargo, las cadenas pesada y ligera anti-CD63 procedían del anticuerpo anti-CD63 denominado H5C6, obtenido en el Developmental Studies Hybridoma Bank (Universidad de Iowa, Departamento de Biología, ciudad de Iowa, IA). Como con el anticuerpo anti-IL-4R completo utilizado en el Ejemplo 2, el componente anti-IL-4R del anticuerpo biespecífico utilizado en este ejemplo mostró solo en sí mismo actividad de bloqueo a IL-4R moderada.

Para evaluar la actividad de bloqueo del anticuerpo biespecífico anti-IL-4R x anti-CD63 se realizó un ensayo de luciferasa IL-4. En resumen, se añadieron diluciones en serie del anticuerpo biespecífico anti-IL-4R x anti-CD63 o

moléculas de control a las células indicadoras HEK293/STAT6-luc (véase el ejemplo 2). En condiciones normales, estas células producen una señal luciferasa detectable cuando se tratan con IL-4. Después, para este experimento, se añadió IL-4 10 pM a las células y la actividad luciferasa se cuantificó para cada dilución de anticuerpo utilizado. Los controles utilizados en este ensayo fueron: (a) anticuerpo biespecífico ficticio que se une a IL-4R con un brazo y que tiene un brazo anti-CD63 no funcional (es decir, que contiene una cadena pesada anti-IL-4R y una cadena pesada anti-CD63, ambas emparejadas con la cadena ligera anti-IL-4R); (b) anticuerpo monoespecífico anti-IL-4R y (c) solo tampón (PBS) (sin anticuerpo). En la figura 7 se muestran los resultados. Como se muestra en la figura 7, para las muestras de control utilizadas, la actividad luciferasa permanecía relativamente alta incluso a las concentraciones más altas de anticuerpo, mientras que para el anticuerpo biespecífico, la actividad luciferasa disminuía significativamente a medida que aumentaba la concentración de anticuerpo. Estos resultados confirman que la unión simultánea de IL-4R y CD63 a través de un anticuerpo biespecífico causa inhibición sustancial de actividad de IL-4R.

#### **Ejemplo 4. Internalización de SOST utilizando una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se une simultáneamente a SOST y a CD63**

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de moléculas multiespecíficas de unión a antígeno para promover la internalización de la molécula diana soluble SOST (esclerostina). Para estos experimentos, la molécula diana era una proteína de fusión que consistía en una proteína SOST humana etiquetada con un resto pHrodo™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) y una etiqueta myc. El resto pHrodo™ es un colorante sensible a pH que es prácticamente no fluorescente a pH neutro y que en un entorno ácido, tal como el endosoma, muestra fluorescencia brillante. Por lo tanto, la señal fluorescente puede utilizarse como un indicador de internalización celular de la proteína fusión SOST. Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno utilizadas en estos experimentos eran anticuerpos biespecíficos con especificidad de unión tanto por CD63 (una proteína efectora de internalización) como por la proteína de fusión SOST (una molécula diana soluble), como se describe con más detalle en líneas posteriores.

Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: Resumiendo, células HEK293 se sembraron a 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos revestidas de poli-D-lisina (Greiner Bio-One, Monroe, NC). Después de dejar que las células se sedimentasen durante la noche, los medios se reemplazaron por medios que contenían anticuerpo (5 µg/ml, como se describe más adelante), SOST etiquetada con pHrodo™-myc (5 µg/ml), heparina (10 µg/ml) y Hoechst 33342. Después, las células se incubaron durante 3 horas en hielo o durante 3 horas a 37 °C. Todas las células se lavaron dos veces en PBS antes de la adquisición de las imágenes y se realizó un recuento del número de manchas fluorescentes por célula, así como de la intensidad de fluorescencia correspondiente, para establecer el grado de internalización celular de la molécula SOST etiquetada con pHrodo-myc en presencia de diversas construcciones de anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en este ejemplo eran los siguientes: (1) el anticuerpo monoespecífico anti-CD63 (clon H5C6, Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa, Departamento de Biología, Ciudad de Iowa, IA); (2) el anticuerpo anti-myc (clon 9E10, Schiweck *et al.*, 1997, FEBS Lett. 414(1):33-38); (3) el anticuerpo anti-SOST (un anticuerpo que tiene las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo denominado "Ab-B" en la patente de Estados Unidos n.º 7.592.429); (4) el anticuerpo biespecífico anti-CD63 x anti-myc (es decir, una molécula multiespecífica de unión a antígeno que comprende un brazo anti-CD63 procedente del anticuerpo H5C6 y un brazo anti-myc procedente de 9E10); (5) el anticuerpo biespecífico n.º 1 anti-CD63 x anti-SOST (es decir, una molécula multiespecífica de unión a antígeno que comprende un brazo anti-CD63 procedente del anticuerpo H5C6 y un brazo anti-SOST procedente del anticuerpo "Ab-B") y (6) el anticuerpo biespecífico n.º 2 anti-CD63 x anti-SOST (es decir una molécula multiespecífica de unión a antígeno que comprende un brazo anti-CD63 procedente del anticuerpo H5C6 y un brazo anti-SOST procedente del anticuerpo denominado "Ab-20" en la patente de Estados Unidos n.º 7.592.429). Los anticuerpos biespecíficos utilizados en estos experimentos se ensamblaron utilizando la metodología denominada "botones en ojales" (véase, por ejemplo, Ridgway *et al.*, 1996, Protein Eng. 9(7):617-621).

En la figura 8 se muestran los resultados de los experimentos de internalización. La figura 8 muestra el número manchas (vesículas marcadas) por célula, en las diversas condiciones de tratamiento ensayadas. En su conjunto, los resultados de estos experimentos demuestran que las construcciones biespecíficas, que se unen simultáneamente a CD63 y a SOST (bien directamente o a través de la etiqueta myc), producen una mayor cantidad de internalización de SOST, como se refleja a través de la intensidad de fluorescencia y del número de manchas fluorescentes por célula a lo largo del tiempo a una temperatura de 37 °C. Por tanto, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno utilizadas en este experimento pueden dirigir de un modo eficaz la internalización de una molécula diana soluble.

#### **Ejemplo 5. Cambios en la densidad mineral ósea en ratones tratados con una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se une a CD63 y a SOST**

A continuación, una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD63 x anti-SOST, como se describe en el ejemplo 4, se sometió a ensayo para analizar su capacidad de aumentar la densidad mineral ósea en ratones. En estos experimentos se utilizaron cinco grupos de ratones (aproximadamente 6 ratones por grupo). Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: (I) ratones de control negativos no tratados; (II) ratones tratados con un anticuerpo monoespecífico anti-SOST bloqueante que se sabe que aumenta la densidad mineral ósea en sí mismo (control positivo); (III) ratones tratados con un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD63 y a SOST pero que

no inhibe la actividad de SOST en sí mismo o solamente inhibe un poco la actividad de SOST en sí mismo; (IV) ratones tratados con un anticuerpo parental anti-CD63 (es decir, un anticuerpo monoespecífico que contiene el mismo dominio de unión a antígeno anti-CD63 como en el anticuerpo biespecífico); y (V) ratones tratados con un anticuerpo parental anti-SOST (es decir, un anticuerpo monoespecífico que contiene el mismo dominio de unión a antígeno anti-SOST como en el anticuerpo biespecífico). La cantidad de anticuerpo administrada a los ratones en cada grupo fue de aproximadamente 10 a 25 mg/kg.

Se esperaba que los ratones del grupo III (tratados con un anticuerpo biespecífico anti-SOST x anti-CD63) presentasen un aumento en la densidad mineral ósea que fuese al menos comparable al observado en los ratones del grupo II (tratados con un anticuerpo anti-SOST bloqueante conocido), aunque el componente anti-SOST del anticuerpo biespecífico no inhibe la actividad de SOST por sí mismo (según lo confirmado por los ratones del grupo V que se esperaba que *no* presentasen un aumento en la densidad mineral ósea). Se cree que el incremento en la densidad mineral ósea que se esperaba en los ratones del grupo III está impulsado por la internalización, mediada por CD63, de SOST, como se observa en los experimentos celulares del ejemplo 4 anterior.

#### **Ejemplo 6. Internalización celular de lipopolisacárido (LPS) mediada por una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se une simultáneamente a LPS y a CD63**

Este ejemplo ilustra el uso de una molécula multiespecífica unión de antígeno para dirigir la internalización de una molécula diana no proteica, en concreto lipopolisacárido (LPS). El LPS es un componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que se sabe que contribuye al choque séptico. Los anticuerpos anti-LPS se han investigado como posibles agentes de tratamiento para septicemia. Los experimentos del presente ejemplo se diseñaron para evaluar la capacidad de una molécula multiespecífica de unión a antígeno para promover la internalización de LPS.

La molécula multiespecífica de unión a antígeno en este ejemplo era un anticuerpo biespecífico con un brazo dirigido contra LPS (diana) y otro brazo dirigido contra CD63 (proteína efectora de internalización). El brazo anti-LPS procedía del anticuerpo conocido como WN1 222-5. (DiPadova *et al.*, 1993, *Infection and Immunity* 61(9):3863-3872; Muller-Loennies *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278(28):25618-25627; Gomery *et al.*, 2012, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 109(51):20877-20882; US 5.858.728). El brazo anti-CD63 procedía del anticuerpo H5C6 (véase el ejemplo 4). El anticuerpo biespecífico anti-LPS x anti-CD63 (es decir, la molécula multiespecífica de unión a antígeno) se ensambló utilizando la metodología denominada "botones en ojales" (véase, por ejemplo, Ridgway *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9(7):617-621).

En estos experimentos se utilizaron dos tipos de LPS: El LPS procedente de *E. coli* y el LPS procedente de *Salmonella minnesota*. Ambas versiones se obtuvieron como moléculas marcadas con fluorescencia (LPS marcado con ALEXA-FLUOR®-488-, Life Technologies, Carlsbad, CA).

Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: células HEK293 se sembraron en placas de 96 pocillos de adquisición de imágenes revestidas con PDL. Después de reposar durante la noche, los medios se reemplazaron con medio reciente. Se añadió LPS (procedente de *E. coli* o de *S. minnesota*) marcado con fluorescencia en medio regular. A continuación, a las muestras se añadió el anticuerpo biespecífico anti-LPS x anti-CD63, o los semi-anticuerpos de control emparejados con Fc ficticio. Después de diversos tiempos de incubación a 37 °C (de 1 hora y 3 horas) o en hielo (3 horas), las células de las muestras tratadas con LPS se procesaron de la siguiente manera: se lavaron – se inactivaron con anticuerpo anti-ALEXA-FLUOR®-488 – se lavaron y se fijaron. El anticuerpo anti-ALEXA-FLUOR®-488 inactiva la fluorescencia del fluoróforo no internalizado (es decir, unido a la superficie). Por tanto, cualquier fluorescencia observada en las muestras tratadas con anticuerpo inactivador se debe al LPS internalizado. Se midió el nivel de fluorescencia de cada muestra a los diferentes puntos temporales.

La figura 9 expresa los resultados de estos experimentos en relación con el número de vesículas marcadas por célula. Como se muestra en la figura 9, solo las células tratadas con el anticuerpo biespecífico anti-CD63 x anti-LPS mostraron cantidades significativas de vesículas marcadas que aumentaron a lo largo del tiempo. Las células tratadas con LPS marcado y con los anticuerpos de control no presentaron cantidades apreciables de vesículas fluorescentes, lo que indica que en estas condiciones de tratamiento el LPS no está internalizado.

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que un anticuerpo biespecífico anti-LPS x anti-CD63 causa internalización de LPS en las células de una manera que requiere la unión simultánea de LPS y CD63. Por consiguiente estos resultados confirman el uso de moléculas multiespecíficas de unión a antígeno, para promover la internalización celular de moléculas diana, tales como LPS, para el tratamiento de enfermedades y trastornos tales como la septicemia.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y uso de las mismas

ES 2 687 974 T3

<130> 7650A-WO  
 <140> A asignar  
 <141> Presentado en este documento  
 5  
 <150> 61/610.494  
 <151> 14-03-2012  
 10  
 <150> 61/721.831  
 <151> 02-11-2012  
 <150> 61/751.286  
 <151> 11-01-2013  
 15  
 <160> 4  
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0  
 <210> 1  
 <211> 502  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Sintética  
 25  
 <400> 1

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

ES 2 687 974 T3

Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys  
 195 200 205  
 Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg  
 210 215 220  
 Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly  
 225 230 235 240  
 Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn  
 245 250 255  
 Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His Gly Pro Gly Glu Pro Arg  
 260 265 270  
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn  
 275 280 285  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp  
 290 295 300  
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 305 310 315 320  
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn  
 325 330 335  
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn  
 340 345 350  
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp  
 355 360 365  
 Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro  
 370 375 380  
 Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala  
 385 390 395 400  
 Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys  
 405 410 415  
 Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile  
 420 425 430  
 Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn  
 435 440 445  
 Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys  
 450 455 460  
 Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys  
 465 470 475 480  
 Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe  
 485 490 495  
 Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 500

<210> 2  
 <211> 496  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintética

10

<400> 2

Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Arg Val Phe Val Ala Met  
 1 5 10 15  
 Val Ala Ala Ala Leu Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Val Ser Ala Thr  
 20 25 30  
 Leu Asn Ser Val Leu Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro Pro  
 35 40 45  
 Leu Gly Gly Ala Ala Gly His Pro Gly Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro

ES 2 687 974 T3

	50					55					60				
Gly	Ile	Leu	Tyr	Pro	Gly	Gly	Asn	Lys	Tyr	Gln	Thr	Ile	Asp	Asn	Tyr
65					70					75					80
Gln	Pro	Tyr	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Glu	Glu	Cys	Gly	Thr	Asp	Glu	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Ser	Pro	Thr	Arg	Gly	Gly	Asp	Ala	Gly	Val	Gln	Ile	Cys	Leu
			100					105					110		
Ala	Cys	Arg	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Cys	Met	Arg	His	Ala	Met	Cys	Cys
			115					120				125			
Pro	Gly	Asn	Tyr	Cys	Lys	Asn	Gly	Ile	Cys	Val	Ser	Ser	Asp	Gln	Asn
	130					135					140				
His	Phe	Arg	Gly	Glu	Ile	Glu	Glu	Thr	Ile	Thr	Glu	Ser	Phe	Gly	Asn
145				150						155					160
Asp	His	Ser	Thr	Leu	Asp	Gly	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Leu	Ser	Ser
				165					170						175
Lys	Met	Tyr	His	Thr	Lys	Gly	Gln	Glu	Gly	Ser	Val	Cys	Leu	Arg	Ser
			180					185					190		
Ser	Asp	Cys	Ala	Ser	Gly	Leu	Cys	Cys	Ala	Arg	His	Phe	Trp	Ser	Lys
		195					200					205			
Ile	Cys	Lys	Pro	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	Gln	Val	Cys	Thr	Lys	His	Arg
	210					215					220				
Arg	Lys	Gly	Ser	His	Gly	Leu	Glu	Ile	Phe	Gln	Arg	Cys	Tyr	Cys	Gly
225					230					235					240
Glu	Gly	Leu	Ser	Cys	Arg	Ile	Gln	Lys	Asp	His	His	Gln	Ala	Ser	Asn
				245					250						255
Ser	Ser	Arg	Leu	His	Thr	Cys	Gln	Arg	His	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr
			260					265						270	
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
		275					280					285			
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
	290					295					300				
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
305					310					315					320
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
				325					330						335
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
			340					345					350		
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
		355					360					365			
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
	370					375					380				
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
385					390					395					400
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
				405					410						415
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
			420					425					430		
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
	435						440					445			
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
	450				455						460				
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
465					470						475				480
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
				485					490						495

ES 2 687 974 T3

<211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintética

<400> 3

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
      20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35          40          45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Phe Arg Asp Ser Val
      50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala His Tyr Tyr Cys
      85          90          95
Ala Lys Glu Ser Ser Ser Trp Tyr Phe Tyr His Gly Leu Asp Val Trp
      100          105          110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115          120
  
```

10

<210> 4  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Sintética

<400> 4

20

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Ser Leu Leu His Ser
      20          25          30
Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35          40          45
Pro His Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
      50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Val Gly Thr Tyr Phe Cys Met Gln Ser
      85          90          95
Leu Gln Ala Pro Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile
      100          105          110
Lys Arg
  
```

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula multiespecífica de unión a antígeno que comprende:

- 5 un primer dominio (D1) de unión a antígeno; y  
un segundo dominio (D2) de unión a antígeno;

en la que D1 se une específicamente a una molécula diana (D) en la que D es una proteína o un polipéptido que se asocia a tumor preferentemente expresado en la superficie de una célula tumoral; y

10 en la que D2 se une a una proteína efectora (E) de internalización que se expresa en la superficie de células tanto tumorales como no tumorales y en la que E experimenta internalización celular y se procesa mediante una ruta de degradación intracelular;

15 en la que D2 se une a E con baja afinidad de tal manera que la molécula multiespecífica de unión a antígeno se dirige preferentemente a células tumorales que expresan D y la unión simultánea de la molécula multiespecífica de unión a antígeno con D y E da como resultado la internalización y degradación forzada de D en las células tumorales a través de su unión física con E;

en la que la afinidad de unión de D2 por E es de al menos 90 % menor que la afinidad de unión D1 por D; y en la que E es CD63.

20 2. La molécula multiespecífica de unión a antígeno de la reivindicación 1, en la que la molécula multiespecífica de unión a antígeno está conjugada con un fármaco, una toxina o un radioisótopo.

3. La molécula multiespecífica de unión a antígeno de la reivindicación 1, en la que D se selecciona del grupo que consiste en IL-4R, IL-6R, PRLR, HLA-B27, AFP, ALK, proteínas BAGE,  $\beta$ -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa carbónica IX, caspasa-8, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, ciclina-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (por ejemplo, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, proteínas MAGE (por ejemplo, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 y -12), MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Mucl6 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivina, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, tirosinasa y uroplaquina-3.

4. La molécula multiespecífica de unión a antígeno de la reivindicación 1, en la que:

- 35 (a) D1 y/o D2 presenta(n) unión dependiente de pH con su antígeno;  
(b) D1 y/o D2 comprende(n) al menos una región variable de anticuerpo;  
(c) D1 procede de una molécula de unión a antígeno que se une a D pero no la inactiva sustancialmente por sí misma;  
40 (d) D2 comprende una parte de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD63; o  
(e) D1 comprende un ligando, o una parte de un ligando, que se une específicamente a D.

5. La molécula multiespecífica de unión a antígeno de la reivindicación 4(a), en la que D1 se une a D con menor afinidad a pH ácido que a pH neutro; y/o en la que D2 se une a E con menor afinidad a pH ácido que a pH neutro.

45 6. La molécula multiespecífica de unión a antígeno de la reivindicación 4(b), en la que D1 y/o D2 comprende(n) una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera (LCVR), en la que preferentemente la molécula multiespecífica de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico.

7. La molécula multiespecífica de unión a antígeno de la reivindicación 4(d), en la que D1 comprende una parte de unión a antígeno de un anticuerpo anti-IL-4R.

8. La molécula multiespecífica de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un método de tratamiento de un tumor en un sujeto.

55 9. Una molécula multiespecífica de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, comprendiendo el método administrar al sujeto la molécula multiespecífica de unión a antígeno y una segunda proteína de unión a antígeno que se une específicamente a D y un epítipo que no se solapa con el epítipo al cual se une D1.

60 10. La molécula multiespecífica de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la segunda proteína de unión a antígeno está conjugada con un fármaco, una toxina o un radioisótopo.

11. La molécula multiespecífica de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la molécula multiespecífica de unión a antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que D2 interacciona con E con una KD de 10 nM-1  $\mu$ m medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial a 25 °C.

65

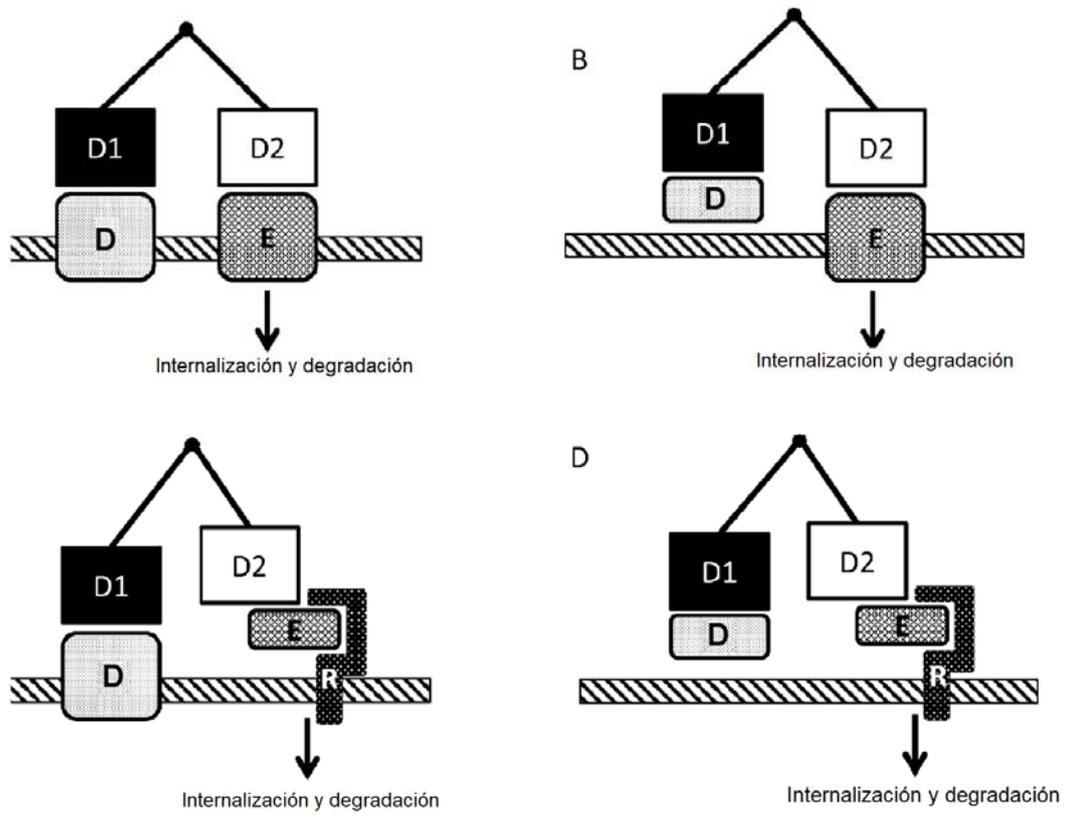


Figura 1

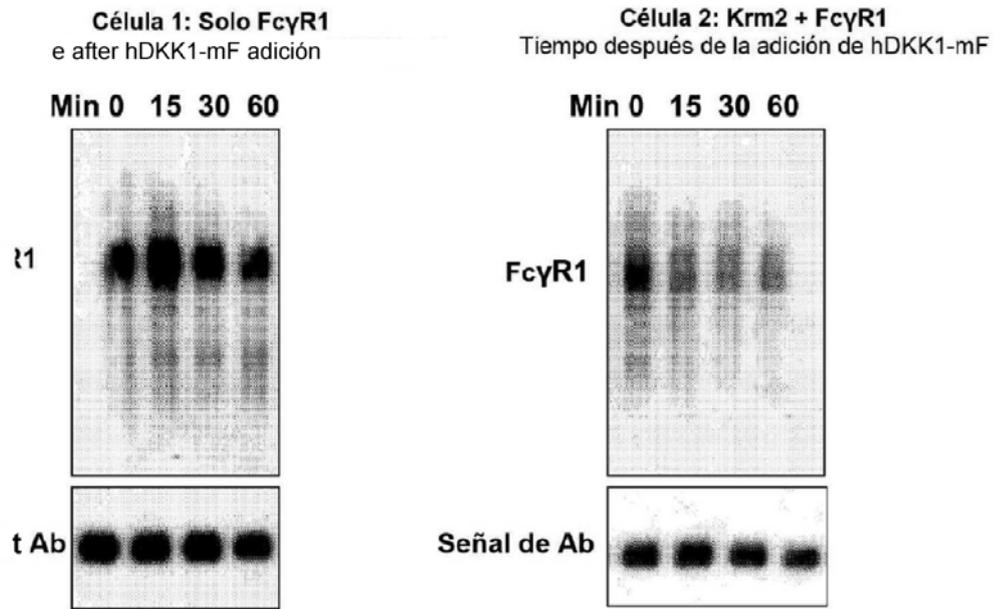


Figura 2

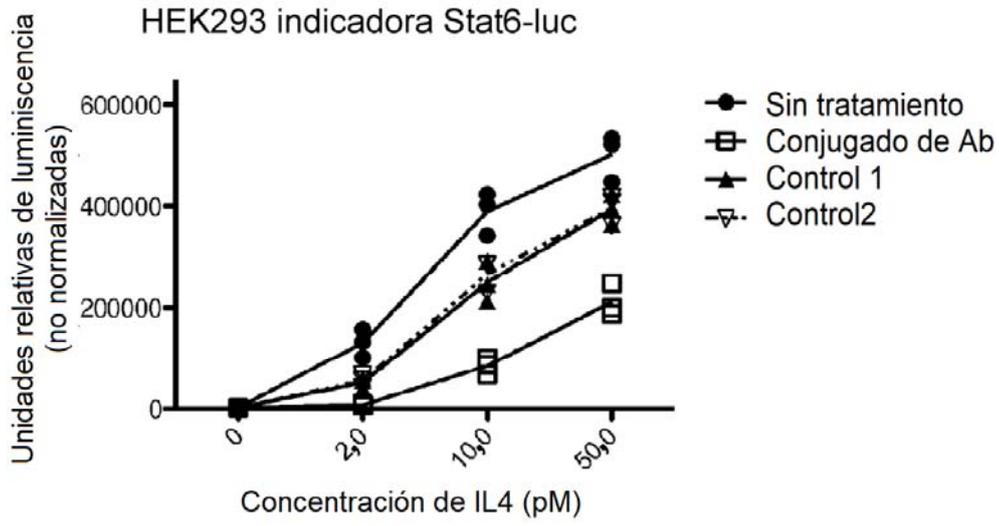


Figura 3

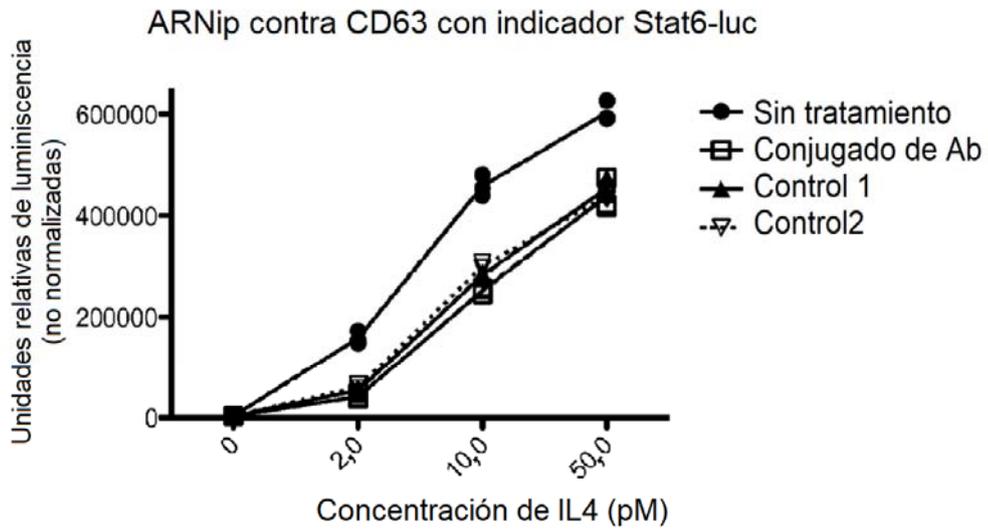


Figura 4

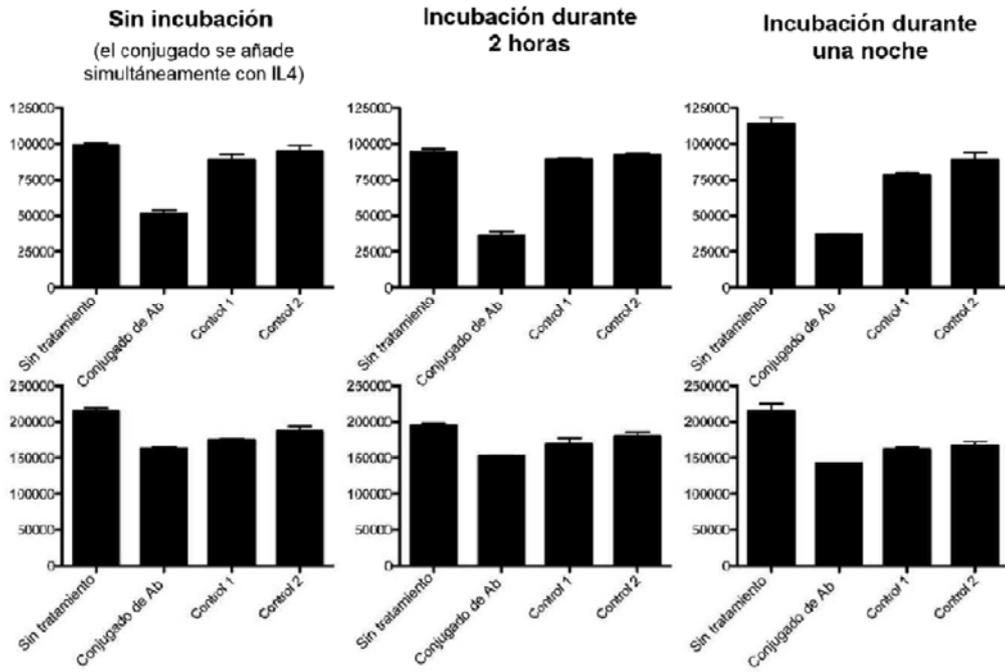
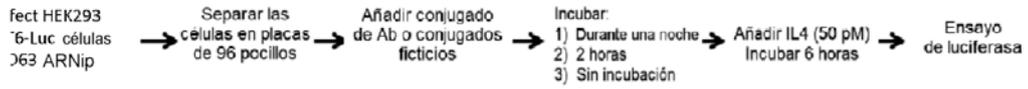


Figura 5

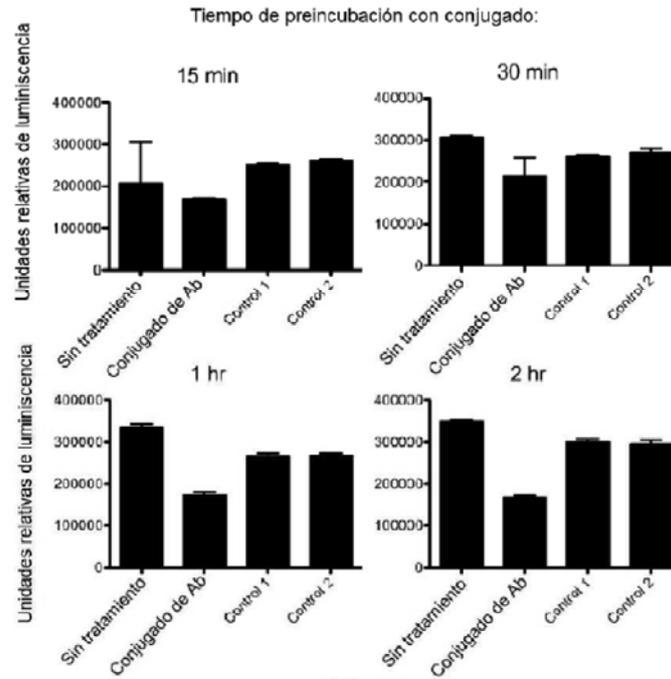
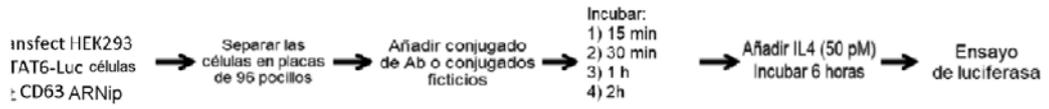


Figura 6

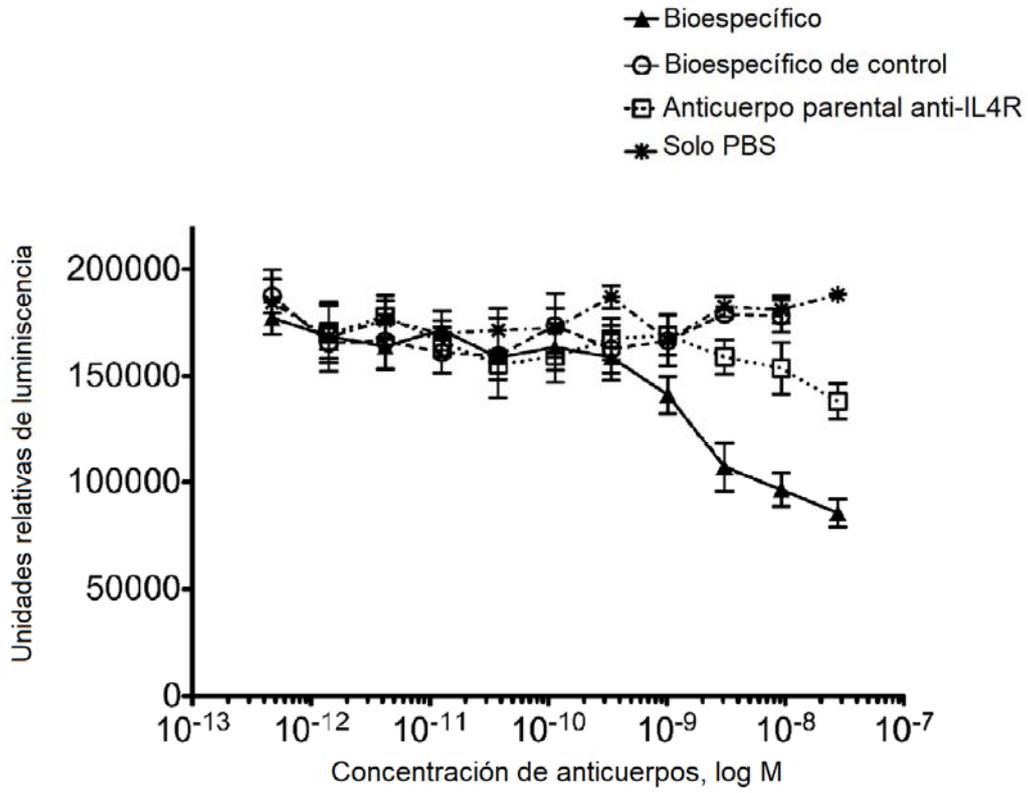
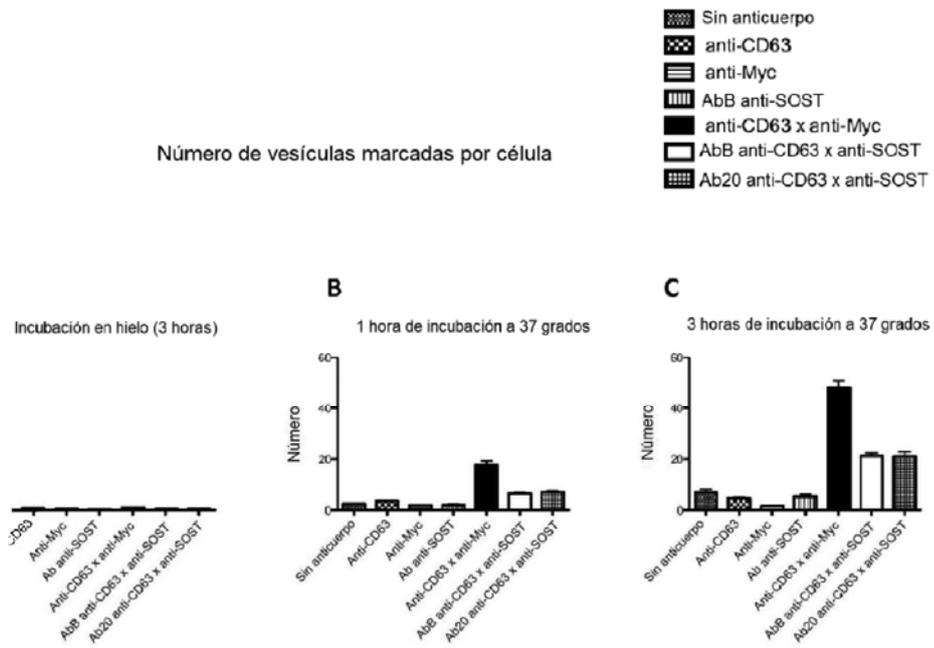


Figura 7



**Figura 8**

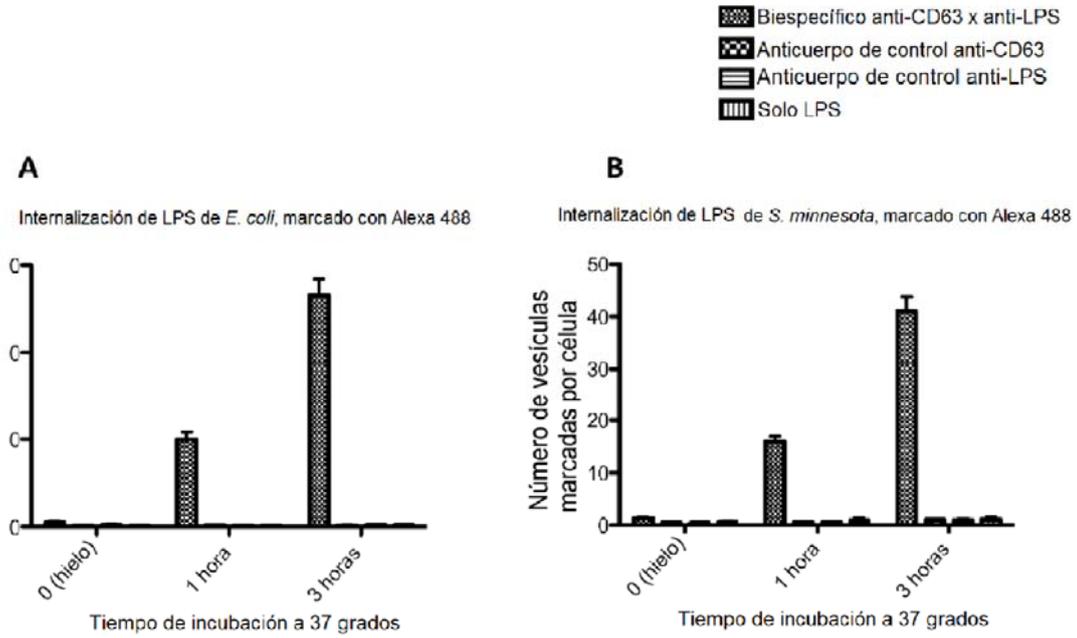


Figura 9