

ANTICUERPOS QUE SE UNEN A STEAP-1

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a anticuerpos que se unen a STEAP-1, incluyendo moléculas de unión a antígeno biespecíficas, por ejemplo, para activar linfocitos T. Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos y a vectores y células hospedadoras que comprenden dichos polinucleótidos. La invención se refiere además a métodos para producir los anticuerpos y a métodos para usarlos en el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes

STEAP-1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata-1) es una proteína de la superficie celular de 339 aminoácidos que en tejidos normales se expresa predominantemente en células de la próstata. La expresión de la proteína STEAP-1 se mantiene a altos niveles en diversos estados de cáncer de próstata y STEAP-1 también está muy sobreexpresada en otros cánceres humanos tales como pulmón y colon. El perfil de expresión de STEAP-1 en tejidos normales y cancerosos sugirió su uso potencial como diana terapéutica, por ejemplo, para inmunoterapia. El documento WO 2008/052187 informa sobre anticuerpos anti-STEAP-1 e inmunoconjugados de los mismos. En el documento WO 2014/165818 se describe un anticuerpo biespecífico STEAP-1/CD3 (scFv)₂.

Existe la necesidad de fármacos adicionales para tratar diversos tipos de cáncer y metástasis de cáncer de próstata, pulmón y colon. Los fármacos particularmente útiles para este fin incluyen anticuerpos que se unen a STEAP-1, en particular anticuerpos biespecíficos que se unen a STEAP-1 en células diana y un antígeno activador de linfocitos T tal como CD3 en linfocitos T. La unión simultánea de dicho anticuerpo a sus dos dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y el linfocito T, provocando la activación de cualquier linfocito T citotóxico y posterior lisis de la célula diana.

Con fines terapéuticos, un requisito importante que deben cumplir los anticuerpos es una estabilidad suficiente tanto *in vitro* (para el almacenamiento del fármaco) como *in vivo* (después de la administración al paciente).

Modificaciones como la desamidación de asparagina, isomerización de aspartato, formación de succinimida y oxidación de triptófano son degradaciones típicas de los anticuerpos recombinantes y pueden afectar tanto a la estabilidad *in vitro* como a las funciones biológicas *in vivo*.

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos, incluyendo anticuerpos biespecíficos, que se unen a STEAP-1 y son resistentes a la degradación, por ejemplo, mediante la formación

de succinimida y, por tanto, muestran buena estabilidad. Los anticuerpos (biespecíficos) proporcionados combinan además buena eficacia y capacidad de producción con baja toxicidad y propiedades farmacocinéticas favorables.

Sumario de la invención

5 Los presentes inventores han desarrollado un nuevo anticuerpo con propiedades mejoradas, inesperadas, que se une a STEAP-1. En particular, el anticuerpo es resistente a la degradación, por ejemplo, mediante la formación de succinimida, y por tanto particularmente estable según sea necesario para fines terapéuticos. Asimismo, los inventores han desarrollado moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a STEAP-1 y un antígeno activador de linfocitos T,
10 que incorporan el nuevo anticuerpo de STEAP-1.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en donde el anticuerpo muestra menos de aproximadamente 5 % de degradación de succinimida después de 4 semanas a pH 7,4, 37 °C, y/o menos de aproximadamente 10 % de degradación de succinimida después de 4 semanas a pH 6,0, 40 °C, según lo determinado por la
15 espectrometría de masas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las
20 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9. En una realización, el VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada
25 del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y el VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, en particular un IgG₁. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En otra realización, el anticuerpo es un fragmento de
30 anticuerpo seleccionado del grupo de una molécula Fv, una molécula scFv, una molécula Fab y una molécula F(ab')₂. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.

La invención también proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica, que comprende (a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno comprende una región
35 variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad

de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9 y (b) un segundo resto de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno. En una realización, el VH del primer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y la VL del primer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En una realización, el segundo antígeno es CD3, en particular CD3ε. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende una HCDR 1 de la SEQ ID NO: 15, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 16 y una HCDR 3 de la SEQ ID NO: 17, y un VL que comprende una LCDR 1 de la SEQ ID NO: 18, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 19 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 20. En una realización, el VH del segundo resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, y el VL del segundo resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22. En una realización, el primer y/o el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1, en particular los dominios variables VL y VH, de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí. En una realización, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde en el dominio constante el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat), y en el dominio constante CH1 el aminoácido en la posición 147 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico. En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab y (i) el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno o (ii) el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena

pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un tercer resto de unión a antígeno. En una realización, el tercer resto de antígeno es idéntico al primer resto de unión a antígeno. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad. En una realización, el primer, el segundo y, cuando esté presente, el tercer resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab; y (i) el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc o (ii) el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc; y el tercer resto de unión a antígeno, cuando esté presente, se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc IgG, en particular un IgG₁. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En una realización, un resto de aminoácido en el dominio CH₃ de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH₃ de la primera subunidad que puede posicionarse en una cavidad dentro del dominio CH₃ de la segunda subunidad y un resto de aminoácido en el dominio CH₃ de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor, generando de este modo una cavidad en el dominio CH₃ de la segunda subunidad en la que puede posicionarse la protuberancia en el dominio CH₃ de la primera subunidad. En una realización, el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora.

Según otro aspecto de la invención, se proporcionan uno o más polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención. La invención proporciona además uno o más vectores de expresión que comprenden el(los) polinucleótido(s) aislado(s) de la invención y una célula hospedadora que comprende el(los) polinucleótido(s) aislado(s) o el(los) vector(es) de expresión de la invención. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula eucariota, en particular una célula de mamífero.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a STEAP-1, que comprende las etapas de a) cultivar la célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y b) recuperar el anticuerpo. La invención también abarca un anticuerpo que se une a STEAP-1 producido por el método de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también abarca métodos para usar el anticuerpo, la molécula de unión a antígeno biespecífica y la composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo, molécula de unión a antígeno biespecífica o composición farmacéutica según la invención para su uso como medicamento. En un aspecto se proporciona un anticuerpo, molécula de unión a antígeno biespecífica o composición farmacéutica según la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En una realización específica, la enfermedad es cáncer.

También se proporciona el uso de un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad; así como un método para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la enfermedad es cáncer. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el individuo es preferentemente un mamífero, en particular, un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Configuraciones ejemplares de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención. (A, D) Ilustración de la molécula "1+1 CrossMab". (B, E) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con un orden alternativo de componentes Crossfab y Fab ("invertido"). (C, F) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab". (G, K) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab" con un orden alternativo de componentes Crossfab y Fab ("invertido"). (H, L) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab". (I, M) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con dos CrossFabs. (J, N) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con dos CrossFabs y un orden alternativo de los componentes Crossfab y Fab ("invertido"). (O, S) Ilustración de la molécula "Fab-Crossfab". (P, T) Ilustración de la molécula "Crossfab-Fab". (Q, U) Ilustración de la molécula "(Fab)₂-Crossfab". (R, V) Ilustración de la molécula "Crossfab-(Fab)₂". (W, Y) Ilustración de la molécula "Fab-(Crossfab)₂". (X, Z) Ilustración de la molécula "(Crossfab)₂-Fab". Punto negro: modificación opcional en el dominio Fc que promueve la heterodimerización. ++, --: aminoácidos de cargas opuestas introducidos opcionalmente en los dominios CH1 y CL. Las moléculas Crossfab se representan como moléculas que comprenden un intercambio de regiones VH y VL, pero pueden, en realizaciones en las que no se introducen

modificaciones de carga en los dominios CH1 y CL, comprender como alternativa un intercambio de los dominios CH1 y CL.

Figura 2. Ilustración de las moléculas de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) preparadas en los Ejemplos. Todas las moléculas de anticuerpos TCB ensayadas se produjeron como "2+1 IgG CrossFab, invertido" con modificaciones de carga (intercambio de VH/VL en el agente de unión a CD3, modificaciones de carga en agentes de unión a STEAP1, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K).

Figura 3. Análisis de secuencia de los dominios variables de vandortuzumab. (A) Predicción de las posiciones de puntos calientes en la secuencia. (B) Anotación de las regiones CDR y los puntos calientes predichos en las secuencias de dominio variable de vandortuzumab.

Figura 4. Lisis mediada por linfocitos T de células LnCAP que expresan STEAP-1 después de 24 h (A) o 48 h (B), inducida por diferentes moléculas de anticuerpos TCB de STEAP-1 (E:T = 10:1, células efectoras PBMC humanas). Se representan triplicados con SD.

Figura 5. Activación de Jurkat, según lo determinado por luminiscencia, tras la unión simultánea de diferentes moléculas de anticuerpos TCB de STEAP-1 a CD3 humano en células indicadoras Jurkat-NFAT y STEAP-1 humano en células LnCAP (A) o 22Rv1 (B). La línea celular CHO-K1 STEAP-1-negativa actuó como control (C). Se representan triplicados con SD.

Figura 6. Unión de moléculas de anticuerpos TCB de STEAP-1 a células CHO-hSTEAP1 que expresan STEAP-1 humano (A) y células Jurkat NFAT que expresan CD3 (B).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos se usan en el presente documento como se usan en general en la técnica, a menos que se definan de otro modo a continuación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Son ejemplos de moléculas de unión a antígeno inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos, de los mismos.

El término "biespecífico" significa que la molécula de unión a antígeno es capaz de unirse de manera específica a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Normalmente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En determinadas

realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica es capaz de unirse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, en particular a dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

El término "valente" como se usa en el presente documento indica la presencia de un número específico de sitios de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno. Como tal, la expresión "unión monovalente a un antígeno" indica la presencia de un (y no más de un) sitio de unión a antígeno específico para el antígeno en la molécula de unión a antígeno.

Un "sitio de unión a antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más restos de aminoácidos, de una molécula de unión a antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende restos de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina nativa normalmente tiene dos sitios de unión a antígeno, una molécula Fab tiene normalmente un único sitio de unión a antígeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "resto de unión a antígeno" se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. En una realización, un resto de unión a antígeno es capaz de dirigir la entidad a la que está unido (por ejemplo, un segundo resto de unión a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que porta el determinante antigénico. En otra realización, un resto de unión a antígeno es capaz de activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno del complejo de receptor de linfocitos T. Los restos de unión a antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos como se define adicionalmente en el presente documento. Los restos de unión a antígeno particulares incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, los restos de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes de anticuerpo como se define adicionalmente en el presente documento y se conoce en la técnica. Las regiones constantes de cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ o μ . Las regiones constantes útiles de cadena ligera incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ .

Como se usa en el presente documento, la expresión "determinante antigénico" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional compuesta de diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, que forma un complejo de resto de unión a antígeno-antígeno. Pueden encontrarse determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, sobre las superficies de células tumorales, sobre las superficies de células infectadas por virus, sobre las superficies de otras células enfermas, sobre la superficie de células inmunitarias, libres en el suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (MEC). Las

proteínas denominadas antígenos en el presente documento (por ejemplo, STEAP-1, CD3) pueden ser cualquier forma nativa de las proteínas de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, monos cynomolgus) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique otra cosa. En una realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia en el presente documento a una proteína específica, la expresión abarca la proteína de "longitud completa", no procesada, así como cualquier forma de la proteína que resulte de su procesamiento en la célula. La expresión también abarca variantes de origen natural de la proteína, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. Una proteína humana ilustrativa útil como antígeno es CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 185), NCBI RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 24 para la secuencia humana; o UniProt n.º Q95LI5 (versión 69), NCBI GenBank n.º BAB71849.1, SEQ ID NO: 25 para la secuencia de cynomolgus [*Macaca fascicularis*] o STEAP-1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata 1; véase UniProt n.º Q9UHE8 (versión 137); NCBI RefSeq n.º NP_036581.1, SEQ ID NO: 23 para la secuencia humana). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención se une a un epítipo de CD3 o STEAP-1 que se conserva entre los antígenos CD3 o STEAP-1 de diferentes especies. En realizaciones particulares, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención se une a STEAP-1 humano.

Por "unión específica" se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y puede distinguirse de interacciones no deseadas o inespecíficas. La capacidad de un resto de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico puede medirse bien mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otras técnicas con las que está familiarizado un experto en la materia, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (RPS) (analizada, por ejemplo, en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En una realización, el alcance de la unión de un resto de unión a antígeno a una proteína no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión de un resto de unión a antígeno al antígeno según se mide, por ejemplo, por RPS. En determinadas realizaciones, un resto de unión a antígeno que se une al antígeno, o una molécula de unión a antígeno que comprende ese resto de unión a antígeno, tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"Afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un receptor) y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique otra cosa, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1

entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, un resto de unión a antígeno y un antígeno o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede estar representada en general por la constante de disociación (K_D), que es la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{off} y k_{on} , respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la relación entre las constantes de velocidad siga siendo la misma. La afinidad puede medirse mediante métodos bien establecidos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Un método particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmón superficial (RPS).

10 "Unión reducida", por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, según se mide, por ejemplo, mediante RPS. Para mayor claridad, la expresión incluye también la reducción de la afinidad a cero (o por debajo del límite de detección del método analítico), es decir, abolición completa de la interacción. Por el contrario, "unión aumentada" se refiere a un aumento en la afinidad de unión para la
15 interacción respectiva.

Un "antígeno de linfocitos T activadores" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico expresado en la superficie de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, que es capaz de inducir la activación de linfocitos T tras la interacción con una molécula de unión a antígeno. De manera específica, la interacción de una molécula de unión a
20 antígeno con un antígeno activador de linfocitos T puede inducir la activación de linfocitos T al desencadenar la cascada de señalización del complejo receptor de linfocitos T. En una realización particular, el antígeno activador de linfocitos T es CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 144), NCBI RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 24 para la secuencia humana; o UniProt n.º Q95LI5 (versión 49), NCBI GenBank n.º
25 BAB71849.1, SEQ ID NO: 25 para la secuencia de cynomolgus [*Macaca fascicularis*]).

"Activación de linfocitos T" como se usa en el presente documento se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionadas entre: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de la molécula efectora citotóxica, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Los ensayos adecuados
30 para medir la activación de linfocitos T son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

Un "antígeno de célula diana", como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico presentado sobre la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor, tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral. En una
35 realización particular, el antígeno de célula diana es STEAP-1, en particular STEAP-1 humano.

Como se usa en el presente documento, los términos "primero", "segundo" o "tercero" con respecto a moléculas Fab, etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. No se pretende que el uso de estos términos confiera un orden u orientación específicos de la molécula de unión a antígeno biespecífica a menos que esto se indique explícitamente.

Por "fusionado" se entiende que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad del dominio Fc) están unidos por enlaces peptídicos, bien directamente o a través de uno o más conectores peptídicos.

Una "molécula Fab" se refiere a una proteína que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada (la "cadena pesada de Fab") y el dominio VL y CL de la cadena ligera (la "cadena ligera de Fab") de una inmunoglobulina.

Por una molécula Fab "cruzada" (también denominada "Crossfab") se entiende una molécula Fab en donde los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian (es decir, se reemplazan entre sí), es decir, la molécula Fab cruzada comprende una cadena peptídica compuesta por el dominio variable de cadena ligera VL y el dominio constante de cadena pesada 1 CH1 (VL-CH1, en dirección de N a C-terminal) y una cadena peptídica compuesta por el dominio variable de cadena pesada VH y el dominio constante de cadena ligera CL (VH-CL, en dirección de N a C-terminal). Para mayor claridad, en una molécula Fab cruzada en la que se intercambian los dominios variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab, la cadena peptídica que comprende el dominio constante de cadena pesada 1 CH1 se denomina en el presente documento la "cadena pesada" de la molécula Fab (cruzada). Por el contrario, en una molécula Fab cruzada en la que se intercambian los dominios constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab, la cadena peptídica que comprende el dominio variable de cadena pesada VH se denomina en el presente documento la "cadena pesada" de la molécula Fab (cruzada).

En contraste con esto, por molécula Fab "convencional" se entiende una molécula Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta por los dominios variables y constantes de cadena pesada (VH-CH1, en dirección de N a C-terminal) y una cadena ligera compuesta por los dominios variables y constantes de cadena ligera (VL-CL, en dirección de N a C-terminal).

La expresión "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo de origen natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que están unidas por enlaces disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), también denominado dominio pesado

variable o región variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) también denominados región constante de cadena pesada. De manera similar, del extremo N al C, cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL), también denominado dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL),
 5 también denominado región constante de cadena ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina puede asignarse a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales pueden dividirse adicionalmente en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena ligera de una inmunoglobulina puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ),
 10 basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, unidos a través de la región bisagra de inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales,
 15 anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo en tanto que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos y/o se unen al
 20 mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes en general en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo
 25 monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente
 30 invención pueden producirse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los loci de inmunoglobulina humana, estando dichos métodos y otros métodos ilustrativos para producir anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento.

35 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su ambiente natural, es decir, que no está en su medio natural. No es necesario un nivel particular de purificación.

Por ejemplo, un anticuerpo aislado puede extraerse de su ambiente nativo o natural. Los anticuerpos producidos de forma recombinante expresados en células hospedadoras se consideran aislados para los fines de la invención, como también anticuerpos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente por cualquier técnica adecuada. Como tales, se aíslan los anticuerpos y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica a más del 95 % o 99 % de pureza según se determina mediante, por ejemplo, métodos electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de métodos de evaluación de la pureza de anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto", y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativa.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de un único dominio. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.*, *Nat Med* 9, 129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y patentes de los Estados Unidos n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítipo de unión a receptor de rescate y que tienen semivida *in vivo* aumentada, véase patente de los Estados Unidos n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat Med* 9, 129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.*, *Nat Med* 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de un único dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 6.248.516 B1). Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como

se describe en el presente documento.

La expresión "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria de parte o la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión a antígeno puede proporcionarse mediante, por ejemplo, uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo a su antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Como se usa en el presente documento en relación con secuencias de región variable, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Como se usa en el presente documento, las posiciones de aminoácidos de todas las regiones y dominios constantes de la cadena pesada y ligera se numeran según el sistema de numeración de Kabat descrito en Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), denominado "numeración según Kabat" o "numeración de Kabat" en el presente documento. Específicamente, el sistema de numeración de Kabat (véase páginas 647-660 de Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) se usa para el dominio constante de cadena ligera CL del isotipo kappa y lambda y el sistema de numeración del índice EU de Kabat (véase páginas 661-723) se usa para los dominios constantes de cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y CH3), que se aclara adicionalmente en el presente documento al referirse a "numeración según el índice EU de Kabat" en este caso.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable ("regiones determinantes de complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables") y/o contienen los restos de contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR ilustrativas en el presente

documento incluyen:

- (a) bucles hipervariables que aparecen en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));
- 5 (b) CDR que aparecen en los restos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));
- (c) contactos de antígeno que se producen en los restos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al. J. Mol. Biol.* 262: 10 732-745 (1996)); y
- (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los restos de aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique otra cosa, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos de FR) se numeran en el presente documento según Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

"Marco conservado" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en el siguiente orden en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Dichos dominios variables se denominan en el presente documento "región variable humanizada". Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo procedente de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de anticuerpos. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, de un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcadas por la presente invención

son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente a partir de la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o la unión a receptor de Fc (FcR).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o procedente de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos de unión a antígeno no humanos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humano procede de un mamífero transgénico no humano, por ejemplo un ratón, una rata o un conejo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humano procede de una línea celular de hibridoma. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos también se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en el presente documento.

La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos pueden además dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

La expresión "dominio Fc" o "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG podrían variar ligeramente, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para extenderse desde Cys226 o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, los anticuerpos producidos por las células hospedadoras pueden padecer una escisión postraducciona de uno o más, en particular uno o dos, aminoácidos del extremo C de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula hospedadora mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica una cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa o puede incluir una variante escindida de la cadena pesada de longitud completa (también denominada en el presente documento una "cadena pesada variante escindida"). Este puede ser el caso donde los dos aminoácidos C-terminales finales de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración según el índice EU de Kabat). Por lo tanto, la lisina C-terminal (Lys447) o la glicina (Gly446) y lisina (K447) C-terminal, de la región Fc pueden o no estar presentes. Las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas que incluyen dominios Fc (o una subunidad de un dominio

Fc como se define en el presente documento) se indican en el presente documento sin dipéptido de glicina-lisina C-terminal si no se indica otra cosa. En una realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento, comprendido en un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención, comprende un dipéptido de glicina-lisina C-terminal adicional (G446 y K447, numeración según el índice EU de Kabat). En una realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento, comprendido en un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención, comprende un resto de glicina C-terminal adicional (G446, numeración según el índice EU de Kabat). Las composiciones de la invención, tales como las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, comprenden una población de anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención. La población de anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas puede comprender moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida. La población de anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas puede consistir en una mezcla de moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida, en donde al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas tienen una cadena pesada variante escindida. En una realización de la invención, una composición que comprende una población de anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención comprende un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un dipéptido de glicina-lisina C-terminal adicional (G446 y K447, numeración según el índice EU de Kabat). En una realización de la invención, una composición que comprende una población de anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención comprende un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un resto de glicina C-terminal adicional (G446, numeración según el índice EU de Kabat). En una realización de la invención, dicha composición comprende una población de anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas comprendidas por moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento; moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un resto de glicina C-terminal adicional (G446, numeración según el índice EU de Kabat); y moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en el presente documento con un dipéptido de glicina-lisina C-terminal adicional (G446 y K447, numeración según el índice EU de Kabat). A menos que se especifique otra cosa en el presente documento, la numeración de los restos de

aminoácidos en la región Fc o en la región constante es según el sistema de numeración de EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (véase también anteriormente). Una "subunidad" de un dominio Fc como se usa en el presente documento se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C-terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, con capacidad de autoasociación estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio IgG Fc comprende un dominio constante IgG CH2 y un dominio constante IgG CH3.

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una manipulación de la cadena principal peptídica o las modificaciones postraduccionales de una subunidad del dominio Fc que reduce o impide la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad del dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una asociación promotora de modificaciones como se usa en el presente documento incluye en particular modificaciones separadas hechas a cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desea asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en donde las modificaciones son complementarias entre sí para promover la asociación de las dos subunidades del dominio Fc. Por ejemplo, una asociación promotora de modificación puede alterar la estructura o carga de una o ambas de las subunidades del dominio Fc para hacer que su asociación sea estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por tanto, se produce (hetero)dimerización entre un polipéptido que comprende la primera subunidad del dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad del dominio Fc, que podrían no ser idénticos en el sentido de que otros componentes fusionados con cada una de las subunidades (por ejemplo, restos de unión a antígeno) no son iguales. En algunas realizaciones, la asociación promotora de modificación comprende una mutación de aminoácidos en el dominio Fc, específicamente una sustitución de aminoácidos. En una realización particular, la asociación promotora de modificación comprende una mutación de aminoácidos separada, específicamente una sustitución de aminoácidos, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

La expresión "funciones efectoras" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión a receptor de Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígeno mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, regulación negativa de receptores superficiales celulares (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Como se usa en el presente documento, se considera que las expresiones "modificar por ingeniería genética, modificado por ingeniería genética, modificación por ingeniería genética" incluyen cualquier manipulación de la cadena principal peptídica o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido recombinante o de origen natural o fragmento del mismo.

- 5 La modificación técnica incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

Se entiende que la expresión "mutación de aminoácidos" como se usa en el presente documento abarca sustituciones, supresiones, inserciones y modificaciones de aminoácidos. Puede realizarse cualquier combinación de sustitución, supresión, inserción y modificación para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc o asociación aumentada con otro péptido. Las supresiones e inserciones de la secuencia de aminoácidos incluyen supresiones e inserciones de aminoácidos amino y/o carboxilo terminales. Son mutaciones de aminoácidos particulares las sustituciones de aminoácidos. Con el fin de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, se prefieren en particular sustituciones de aminoácidos no conservativas, es decir, reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene diferentes propiedades estructurales y/o químicas. Las sustituciones de aminoácidos incluyen el reemplazo por aminoácidos de origen no natural o por derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Se pueden generar mutaciones de aminoácidos utilizando métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que los métodos para alterar el grupo de cadena lateral de un aminoácido por métodos distintos a la ingeniería genética, tales como modificación química, también pueden ser útiles. Se pueden usar diversas designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación de aminoácidos. Por ejemplo, una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina puede indicarse como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles públicamente, tales como BLAST, BLAST-2, Clustal W, software Megalign

(DNASTAR) o el paquete de programas FASTA. Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros necesarios para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de

5 secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa ggsearch del paquete FASTA versión 36.3.8c o posterior con una matriz de comparación BLOSUM50. El paquete de programas FASTA fue escrito por W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227- 258; y Pearson *et al.* (1997) Genomics 46: 24-

10 36 y está disponible públicamente en http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml. Como alternativa, se puede utilizar un servidor público accesible en http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi para comparar las secuencias, utilizando el programa ggsearch (proteína global:proteína) y las opciones predeterminadas (BLOSUM50; abierto: -10; ext: -2; Ktup = 2) para garantizar que se

15 realiza una alineación global, en lugar de local. El porcentaje de identidad de aminoácidos se proporciona en el encabezado de alineación de salida.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN de origen vírico o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no

20 convencional (por ejemplo, un enlace de amida, tal como se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (APN)). La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido

25 nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su ambiente natural. Por ejemplo, a efectos de la presente invención, se considera aislado un polinucleótido recombinante contenido en un vector que codifica un polipéptido. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Un polinucleótido aislado

30 incluye una molécula polinucleotídica contenida en células que normalmente contienen la molécula polinucleotídica, pero la molécula polinucleotídica está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas de hebra positiva y negativa y formas

35 bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención comprenden además dichas moléculas producidas de forma sintética. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como

un promotor, un sitio de unión a ribosomas o un terminador de la transcripción.

"Polinucleótido aislado (o ácido nucleico) que codifica [por ejemplo, un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención]" se refiere a una o más moléculas polinucleotídicas que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha(s) molécula(s) polinucleotídica(s) en un solo vector o vectores separados, y dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula hospedadora.

La expresión "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante puede incorporarse en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plasmídico, virus o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, la parte de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinadas realizaciones, el casete de expresión comprende secuencias polinucleotídicas que codifican anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

La expresión "vector" o "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que está asociado operativamente en una célula diana. La expresión incluye el vector en forma de una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión se encuentra dentro de la célula, se produce la molécula de ácido ribonucleico o proteína que está codificada por el gen mediante la maquinaria de transcripción y/o traducción celular. En una realización, el vector de expresión de la invención comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora" y "cultivo de células hospedadoras" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula primaria transformada y la descendencia procedente de esta independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula progenitora, pero puede contener mutaciones. Se incluye en el presente documento la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica explorada o

seleccionada en la célula transformada originalmente. Una célula hospedadora es cualquier tipo de sistema celular que pueda usarse para generar los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, tales como células HEK, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal.

Un "receptor de Fc activador" es un receptor de Fc que después de la interacción con un dominio Fc de un anticuerpo induce acontecimientos de señalización que estimulan a la célula portadora de receptores para realizar funciones efectoras. Los receptores de Fc activadores humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que conduce a la lisis de células diana recubiertas de anticuerpos por células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las que se unen específicamente anticuerpos o derivados de los mismos que comprenden una región Fc, generalmente a través de la parte de proteína que está en dirección N-terminal de la región Fc. Como se usa en el presente documento, la expresión "ADCC reducida" se define como una reducción en el número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, por el mecanismo de ADCC definido anteriormente y/o un aumento en la concentración de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, necesario para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, por el mecanismo de ADCC. La reducción en ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células hospedadoras, usando los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento convencionales (que son conocidos por los expertos en la materia), pero que no se ha modificado por ingeniería genética. Por ejemplo, la reducción en ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución de aminoácidos que reduce ADCC, es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución de aminoácidos en el dominio Fc. Los ensayos adecuados para medir la ADCC son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, publicación de PCT n.º WO 2006/082515 o publicación de PCT n.º WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad

terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene los efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en tal forma que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la composición.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica con el objetivo de alterar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se trate y puede realizarse bien para profilaxis o bien durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, la terapia combinada, las contraindicaciones y/o las advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

Descripción detallada de las realizaciones

La invención proporciona anticuerpos y moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a STEAP-1, en particular STEAP-1 humano, y son resistentes a la degradación, por ejemplo, mediante la formación de succinimida, y por tanto particularmente estables según sea necesario para fines terapéuticos. Además, las moléculas también tienen otras propiedades favorables para aplicación terapéutica, por ejemplo, con respecto a la eficacia y/o seguridad, así como a la

capacidad de producción.

Anticuerpo de STEAP-1

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en donde el anticuerpo muestra menos de aproximadamente 5 % de degradación de succinimida después de 4 semanas a pH 7,4, 37 °C, y/o menos de aproximadamente 10 % de degradación de succinimida después de 4 semanas a pH 6,0, 40 °C, según lo determinado por la espectrometría de masas. En una realización, el anticuerpo muestra menos de aproximadamente 3 % de degradación de succinimida, en particular menos de aproximadamente 1 % de degradación de succinimida, después de 4 semanas a pH 7,4, 37 °C, según lo determinado por la espectrometría de masas. En una realización, el anticuerpo muestra menos de aproximadamente 7,5 % de degradación de succinimida, en particular menos de aproximadamente 5 % de degradación de succinimida, después de 4 semanas a pH 6,0, 40 °C, según lo determinado por la espectrometría de masas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a STEAP-1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9.

En una realización particular, el anticuerpo comprende un VH que comprende una HCDR 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de la SEQ ID NO: 6, y un VL que comprende una LCDR 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización, el VH es un VH humanizado y/o el VL es un VL humanizado. En una realización, el anticuerpo comprende CDR como en cualquiera de las realizaciones anteriores y comprende además un marco conservado humano aceptor, por ejemplo, un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano.

En una realización, el VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y el VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.

96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el anticuerpo comprende una secuencia de VH que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13,
5 y una secuencia de VL que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En determinadas realizaciones, una secuencia de VH o VL que tiene al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o supresiones en relación con la secuencia de referencia, pero un
10 anticuerpo que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a STEAP-1. En determinadas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o suprimido un total de 1 a 10 aminoácidos en las SEQ ID NO: 11, 12 o 13 y/o se han sustituido, insertado y/o suprimido un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o supresiones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en
15 las FR). Opcionalmente, el anticuerpo comprende la secuencia de VH en las SEQ ID NO: 11, 12 o 13 y/o la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 14, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En una realización, el anticuerpo comprende un VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13
20 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el anticuerpo comprende una secuencia de VH seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 14.

En una realización particular, el anticuerpo comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la
25 SEQ ID NO: 14.

En una realización particular, el anticuerpo comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el anticuerpo comprende una región constante humana. En una realización,
30 el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina que comprende una región constante humana, en particular, una molécula de inmunoglobulina de clase IgG que comprende un dominio CH1, CH2, CH3 y/o CL humano. Se proporcionan secuencias ejemplares de dominios constantes humanos en las SEQ ID NO: 39 y 40 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y la SEQ ID NO: 41 (dominios constantes de cadena pesada de IgG1 humana CH1-CH2-CH3).

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 o la SEQ ID NO: 40, en particular la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En particular, la región constante de cadena pesada puede comprender mutaciones de aminoácidos en el dominio Fc como se describe en el presente documento.

10 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, en particular un IgG₁. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

En una realización, el anticuerpo comprende un dominio Fc, en particular un dominio Fc de IgG, más en particular un dominio Fc de IgG₁. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano. El dominio Fc del anticuerpo puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, descrito en el presente documento en relación con el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención.

En otra realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo de una molécula Fv, una molécula scFv, una molécula Fab y una molécula F(ab')₂; en particular, una molécula Fab. En otra realización, el fragmento de anticuerpo es un diacuerpo, un triacuerpo o un tetracuerpo.

En un aspecto adicional, el anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones posteriores.

25 Variantes de glucosilación

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glucosilado. La adición o supresión de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede realizarse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se creen o eliminen uno o más sitios de glucosilación.

30 Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el oligosacárido unido al mismo. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido ramificado biantenarico que está unido generalmente mediante un enlace N al Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil

glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

- 5 En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen un oligosacárido no fucosilado, es decir, una estructura de oligosacárido que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dicho oligosacárido no fucosilado (también denominado oligosacárido "afucosilado") es en particular un oligosacárido ligado a N que carece de un resto de fucosa unido al primer GlcNAc en el tallo de la estructura de oligosacárido biantenarico. En
- 10 una realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc en comparación con un anticuerpo nativo o parental. Por ejemplo, la proporción de oligosacáridos no fucosilados puede ser de al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 80 % o incluso aproximadamente 100 % (es decir, no están
- 15 presentes oligosacáridos fucosilados). El porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es la cantidad (promedio) de oligosacáridos que carecen de restos de fucosa, en relación con la suma de todos los oligosacáridos unidos a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) según lo medido por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2006/082515, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de
- 20 asparagina localizado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración EU de restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse a aproximadamente ± 3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichos anticuerpos que tienen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc pueden tener
- 25 unión al receptor Fc γ RIIIa mejorada y/o función efectora mejorada, en particular, función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, documentos US 2003/0157108; US 2004/0093621.

- Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos con fucosilación reducida incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); documentos US 2003/0157108; y WO 2004/056312,
- 30 especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares con un gen desactivado, tales como células CHO con el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, desactivado (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87:614-622 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y documento WO2003/085107) o células con actividad reducida o anulada de una síntesis de GDP-fucosa o proteína transportadora (véase, por ejemplo,
 - 35 documentos US2004259150, US2005031613, US2004132140, US2004110282).

En una realización adicional, se proporcionan variantes de anticuerpos con oligosacáridos

bisecados, por ejemplo, en los que se bisecciona un oligosacárido biantenarino unido a la región Fc del anticuerpo mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada como se ha descrito anteriormente. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en Umana *et al.*, Nat Biotechnol 17, 176-180
 5 (1999); Ferrara *et al.*, Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006); documentos WO 99/54342; WO 2004/065540, WO 2003/011878.

También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos
 10 WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

Variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína

En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, por ejemplo, "tioMab", en los que uno o más restos de un anticuerpo se substituyen con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos substituidos se
 15 encuentran en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la substitución de esos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos farmacológicos o conectores-restos farmacológicos, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento.-Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína pueden
 20 generarse como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 7.521.541, 8.30.930, 7.855.275, 9.000.130 o el documento WO2016040856.

Derivados de anticuerpos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales que son
 25 conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido
 30 maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier
 35 peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al

anticuerpo puede variar y, si se unen más de un polímero, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo para mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una
5 terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que pueden calentarse selectivamente por exposición a la radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero sin limitación,
10 longitudes de onda que no dañan las células ordinarias, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que se destruyen las células próximas al anticuerpo-resto no proteico.

Inmunconjugados

La invención también proporciona inmunconjugados que comprenden un anticuerpo anti-STEAP-1 como se describe en el presente documento conjugado (unido químicamente) con uno
15 o más agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o isótopos radiactivos.

En una realización, un inmunconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en el
20 que un anticuerpo está conjugado con uno o más de los agentes terapéuticos mencionados anteriormente. El anticuerpo está típicamente conectado a uno o más de los agentes terapéuticos mediante conectores. Se expone una descripción general de la tecnología ADC incluyendo ejemplos de agentes terapéuticos y fármacos y conectores en *Pharmacol Review* 68:3-19 (2016).

En otra realización, un inmunconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el
25 presente documento conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitación, cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, sarcina alfa, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*,
30 curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Está disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Los
35 ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos

de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, tc99m o I123 o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, IRM), tal como, de nuevo, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden prepararse conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil por ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de los Estados Unidos n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan de forma expresa, pero sin limitación, dichos conjugados preparados con reactivos reticuladores, incluyendo, pero sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos).

Anticuerpos multiespecíficos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes, es decir, diferentes epítomos en diferentes antígenos o diferentes epítomos en el mismo antígeno. En determinadas realizaciones, el anticuerpo multiespecífico tiene tres o más especificidades de unión. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es por STEAP-1 y las otras (dos o más) especificidades son por

cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos (o más) epítomos diferentes de STEAP-1. Los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos o células en células que expresan STEAP-1. Los anticuerpos multiespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)) y modificación técnica de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 5.731.168 y Atwell *et al.*, *J. Mol. Biol.* 270:26 (1997)). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden prepararse mediante la manipulación de efectos de dirección electrostática para preparar moléculas heterodiméricas-Fc de anticuerpos (véase, por ejemplo, documento WO 2009/089004); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992) y documento WO 2011/034605); usando la tecnología de cadena ligera habitual para sortear el problema del emparejamiento erróneo de la cadena ligera (véase, por ejemplo, documento WO 98/50431); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocatenario (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

También se incluyen en el presente documento anticuerpos modificados por ingeniería genética con tres o más sitios de unión a antígeno, incluyendo, por ejemplo, "anticuerpos de pulpo", o DVD-Ig (véase, por ejemplo, documentos WO 2001/77342 y WO 2008/024715). Se pueden encontrar otros ejemplos de anticuerpos multiespecíficos con tres o más sitios de unión a antígeno en los documentos WO 2010/115589, WO 2010/112193, WO 2010/136172, WO2010/145792 y WO 2013/026831. El anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo también incluye un "FAB de acción doble" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a STEAP-1 así como otro antígeno diferente o dos epítomos diferentes de STEAP-1 (véase, por ejemplo, documentos US 2008/0069820 y WO 2015/095539).

Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden proporcionar en forma asimétrica con un cruce de dominio en una o más ramas de unión de la misma especificidad de antígeno, es decir, intercambiando los dominios VH/VL (véase, por ejemplo, documentos WO 2009/080252 y WO

2015/150447), los dominios CH1/CL (véase, por ejemplo, documento WO 2009/080253) o las ramas de Fab completas (véase, por ejemplo, documentos WO 2009/080251, WO 2016/016299, véase también Schaefer *et al.*, PNAS, 108 (2011) 1187-1191 y Klein *et al.*, MAbs 8 (2016) 1010-20). Las ramas de Fab asimétricas también se pueden modificar por ingeniería genética mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos con carga o sin carga en interfaces de dominio para dirigir el emparejamiento de Fab correcto. Véase, por ejemplo, documento WO 2016/172485.

Se conocen en la técnica diversos formatos moleculares adicionales para anticuerpos multiespecíficos y se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, Spiess *et al.*, Mol Immunol 67 (2015) 95-106).

Un tipo particular de anticuerpos multiespecíficos, también incluido en el presente documento, son anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse simultáneamente a un antígeno de superficie en una célula diana, por ejemplo, una célula tumoral, y a un componente invariante, de activación, del complejo receptor de linfocitos T (TCR), tal como CD3, para la redirección de linfocitos T para destruir células diana. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, en particular un anticuerpo biespecífico, en donde una de las especificidades de unión es para STEAP-1 y la otra es para CD3.

Los ejemplos de formatos de anticuerpos biespecíficos que pueden ser útiles para este fin incluyen, pero sin limitación, las moléculas denominadas "BiTE" (de interacción con linfocitos T biespecíficos) en donde dos moléculas de scFv están fusionadas por un conector flexible (véase, por ejemplo, documentos WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261 y WO2008/119567, Nagorsen y Bäuerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)); diacuerpos (Holliger *et al.*, Prot Eng 9, 299-305 (1996)) y derivados de los mismos, tales como diacuerpos en tándem ("TandAb"; Kipriyanov *et al.*, J Mol Biol 293, 41-56 (1999)); moléculas "DART" (redirección de afinidad doble) que se basan en el formato de diacuerpo pero presentan un enlace disulfuro C-terminal para estabilización adicional (Johnson *et al.*, J Mol Biol 399, 436-449 (2010)) y denominadas triomab, que son moléculas de IgG híbridas enteras de ratón/rata (revisado en Seimetz *et al.*, Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010)). Los formatos de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T particulares incluidos en el presente documento se describen en los documentos WO 2013/026833, WO2013/026839, WO 2016/020309; Bacac *et al.*, Oncoimmunology 5(8) (2016) e1203498.

Moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a STEAP-1 y un segundo antígeno

La invención también proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica, es decir, una

molécula de unión a antígeno que comprende al menos dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos (un primer y un segundo antígeno).

Según realizaciones particulares de la invención, los restos de unión a antígeno comprendidos en la molécula de unión a antígeno biespecífica son moléculas Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos de una cadena pesada y una ligera, comprendiendo cada uno un dominio variable y uno constante). En una realización, el primer y/o el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab. En una realización, dicha molécula Fab es humana. En una realización particular, dicha molécula Fab es humanizada. En otra realización más, dicha molécula Fab comprende dominios constantes humanos de cadena pesada y ligera.

Preferentemente, al menos uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab cruzada. Dicha modificación reduce el emparejamiento incorrecto de cadenas pesadas y ligeras de diferentes moléculas Fab, mejorando de este modo el rendimiento y la pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención en producción recombinante. En una molécula Fab cruzada particular útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención, se intercambian los dominios variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab (VL y VH, respectivamente). Incluso con este intercambio de dominio, sin embargo, la preparación de la molécula de unión a antígeno biespecífica puede comprender determinados productos secundarios debido a una interacción denominada de tipo Bence Jones entre cadenas pesadas y ligeras emparejadas erróneamente (véase Schaefer *et al*, PNAS, 108 (2011) 11187-11191). Para reducir adicionalmente el emparejamiento erróneo de cadenas pesadas y ligeras de diferentes moléculas Fab y por tanto aumentar la pureza y el rendimiento de la molécula de unión a antígeno biespecífica deseada, los aminoácidos cargados con cargas opuestas pueden introducirse en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL de la(s) molécula(s) Fab que se unen al primer antígeno (STEAP-1) o la molécula Fab que se une al segundo antígeno (por ejemplo, un antígeno activador de linfocitos T tal como CD3), como se describe adicionalmente en el presente documento. Se realizan modificaciones de carga en la(s) molécula(s) Fab convencional(es) comprendida(s) en la molécula de unión a antígeno biespecífica (tal como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 1 A-C, G-J) o en la(s) molécula(s) Fab de cruce de VH/VL comprendida(s) en la molécula de unión a antígeno biespecífica (tal como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 D-F, K-N) (pero no en ambos). En realizaciones particulares, las modificaciones de carga se realizan en la(s) molécula(s) Fab convencional(es) comprendida(s) en la molécula de unión a antígeno biespecífica (que en realizaciones particulares se unen al primer antígeno, es decir, STEAP-1).

En una realización particular según la invención, la molécula de unión a antígeno biespecífica es capaz de unirse simultáneamente al primer antígeno (es decir, STEAP-1) y el segundo

antígeno (por ejemplo, un antígeno activador de linfocitos T, en particular, CD3). En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica es capaz de entrecruzar un linfocito T y una célula diana mediante la unión simultánea de STEAP-1 y un antígeno activador de linfocitos T. En una realización aún más particular, dicha unión simultánea da como resultado

5 lisis de la célula diana, en particular una célula tumoral que expresa STEAP-1. En una realización, dicha unión simultánea da como resultado activación del linfocito T. En otras realizaciones, dicha unión simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionado del grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de la molécula efectora citotóxica, actividad citotóxica y

10 expresión de marcadores de activación. En una realización, la unión de la molécula de unión a antígeno biespecífica al antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, sin unión simultánea a STEAP-1 no da como resultado activación de linfocitos T.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica es capaz de redirigir la actividad citotóxica de un linfocito T a una célula diana. En una realización particular, dicha redirección

15 es independiente de la presentación del antígeno peptídico mediada por MHC por la célula diana y/o la especificidad del linfocito T.

En particular, un linfocito T según cualquiera de las realizaciones de la invención es un linfocito T citotóxico. En algunas realizaciones, el linfocito T es un linfocito T $CD4^+$ o $CD8^+$, en particular un linfocito T $CD8^+$.

20 Primer resto de unión a antígeno

La molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno, en particular una molécula Fab, que se une a STEAP-1 (primer antígeno). En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos restos de unión a antígeno, en particular moléculas Fab, que se unen a STEAP-1. En una realización

25 particular de este tipo, cada uno de estos restos de unión a antígeno se une al mismo determinante antigénico. En una realización aún más particular, todos estos restos de unión a antígeno son idénticos, es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos que incluyen las mismas sustituciones de aminoácidos en el dominio CH1 y CL como se describe en el presente documento (si las hubiera). En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica

30 comprende no más de dos restos de unión a antígeno, en particular moléculas Fab, que se unen a STEAP-1.

En realizaciones particulares, el(los) grupo(s) de unión a antígeno que se une(n) a STEAP-1 es/son una molécula Fab convencional. En dichas realizaciones, el(los) grupo(s) de unión a antígeno que se une(n) a un segundo antígeno es una molécula Fab cruzada como se describe

35 en el presente documento, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL

o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí.

En realizaciones alternativas, el(los) grupo(s) de unión a antígeno que se une(n) a STEAP-1 es/son una molécula Fab cruzada como se describe en el presente documento, es decir, una
 5 molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En dichas realizaciones, el(los) grupo(s) de unión a antígeno que se une(n) a un segundo antígeno es(son) una molécula Fab convencional.

El resto de unión a STEAP-1 es capaz de dirigir la molécula de unión a antígeno biespecífica a
 10 un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que expresa STEAP-1.

El primer resto de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno biespecífica puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, descritas en el presente documento en relación con el anticuerpo que se une a STEAP-1, a menos que desde el punto de vista científico sea claramente irrazonable o imposible.

15 Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica, que comprende (a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ
 20 ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9 y (b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno.

25 En una realización particular, el primer resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende una HCDR 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de la SEQ ID NO: 6, y un VL que comprende una LCDR 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno es (procedente de) un anticuerpo
 30 humanizado. En una realización, el VH es un VH humanizado y/o el VL es un VL humanizado. En una realización, el primer resto de unión a antígeno comprende CDR como en cualquiera de las realizaciones anteriores y comprende además un marco conservado humano aceptor, por ejemplo, un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano.

En una realización, el VH del primer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y la VL del primer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el primer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y una secuencia de VL que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el primer resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el primer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de VH seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 14.

En una realización particular, el primer resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización particular, el primer resto de unión a antígeno comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el primer resto de unión a antígeno comprende una región constante humana. En una realización, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región constante humana, en particular un dominio humano CH1 y/o CL. Se proporcionan secuencias ejemplares de dominios constantes humanos en las SEQ ID NO: 39 y 40 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y la SEQ ID NO: 41 (dominios constantes de cadena pesada de IgG₁ humana CH1-CH2-CH3). En algunas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno comprende una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 o la SEQ ID NO: 40, en particular la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39. En particular, la región constante de cadena ligera puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en "modificaciones de carga" y/o puede comprender la supresión o sustituciones de uno o más (en particular dos) aminoácidos N-terminales si está en una molécula Fab cruzada.

En algunas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia del dominio CH1 comprendida en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En particular, la región constante de cadena pesada (específicamente el dominio CH1) puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en "modificaciones de carga".

Segundo resto de unión a antígeno

La molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno, en particular una molécula Fab, que se une a un segundo antígeno (diferente de STEAP-1).

En realizaciones particulares, el resto de unión a antígeno que se une al segundo antígeno es una molécula Fab cruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En dichas realizaciones, el(los) resto(s) de unión a antígeno que se une(n) al primer antígeno (es decir, STEAP-1) es(son) preferiblemente una molécula Fab convencional. En realizaciones donde hay más de un resto de unión a antígeno, en particular molécula Fab, que se une a STEAP-1 comprendido en la molécula de unión a antígeno biespecífica, el resto de unión a antígeno que se une al segundo antígeno es preferiblemente una molécula Fab cruzada y los restos de unión a antígeno que se unen a STEAP-1 son moléculas Fab convencionales.

En realizaciones alternativas, el resto de unión a antígeno que se une al segundo antígeno es una molécula Fab convencional. En dichas realizaciones, el(los) resto(s) de unión a antígeno que se une(n) al primer antígeno (es decir, STEAP-1) es una molécula Fab cruzada como se describe en este documento, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En realizaciones donde hay más de un resto de unión a antígeno, en particular molécula Fab, que se une a un segundo antígeno comprendido en la molécula de unión a antígeno biespecífica, el resto de unión a antígeno que se une a STEAP-1 es preferiblemente una molécula Fab cruzada y los restos de unión a antígeno que se unen al segundo antígeno son moléculas Fab convencionales.

En algunas realizaciones, el segundo antígeno es un antígeno activador de linfocitos T (también denominado en el presente documento "resto de unión a antígeno activador de linfocitos T o molécula Fab de unión a antígeno activadora de linfocitos T"). En una realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica no comprende más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T. En una realización, la

molécula de unión a antígeno biespecífica proporciona unión monovalente al antígeno activador de linfocitos T.

En realizaciones particulares, el segundo antígeno es CD3, en particular CD3 humano (SEQ ID NO: 24) o CD3 de cynomolgus (SEQ ID NO: 25), más en particular CD3 humano. En una
5 realización, el segundo resto de unión a antígeno reacciona de forma cruzada (es decir, se une específicamente a) CD3 humano y de cynomolgus. En algunas realizaciones, el segundo antígeno es la subunidad épsilon de CD3 (CD3 épsilon).

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende una HCDR 1 de la SEQ ID NO: 15, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 16, una HCDR 3 de la SEQ ID NO: 17, una LCDR 1
10 de la SEQ ID NO: 18, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 19 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 20.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende una HCDR 1 de la SEQ ID NO: 15, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 16 y una HCDR 3 de la SEQ ID NO: 17, y un VL que comprende una LCDR 1 de la SEQ ID NO: 18, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 19 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 20.

15 En algunas realizaciones, el segundo resto de unión a antígeno es (procedente de) un anticuerpo humanizado. En una realización, el VH es un VH humanizado y/o el VL es un VL humanizado. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende CDR como en cualquiera de las realizaciones anteriores y comprende además un marco conservado humano aceptor, por ejemplo, un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso
20 humano.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende una secuencia de VL que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.
25

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y una secuencia de VL que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
30 NO: 22.

En una realización, el VH del segundo resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, y el VL del segundo resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

- 5 En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 21 y la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 22.

- En una realización, el segundo resto de unión a antígeno comprende una región constante humana. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región constante humana, en particular un dominio humano CH1 y/o CL. Se proporcionan secuencias ejemplares de dominios constantes humanos en las SEQ ID NO: 39 y 10 40 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y la SEQ ID NO: 41 (dominios constantes de cadena pesada de IgG₁ humana CH1-CH2-CH3). En algunas realizaciones, el segundo resto de unión a antígeno comprende una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 15 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 o la SEQ ID NO: 40, en particular la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39. En particular, la región constante de cadena ligera puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en "modificaciones de carga" y/o puede comprender la supresión o sustituciones de uno o más (en particular dos) aminoácidos N-terminales si está en una molécula 20 Fab cruzada. En algunas realizaciones, el segundo resto de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia del dominio CH1 comprendida en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En particular, la región constante de cadena pesada (específicamente el dominio CH1) puede comprender 25 mutaciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en "modificaciones de carga".

- En algunas realizaciones, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1, en particular los dominios variables VL y VH, de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí 30 (es decir, según dicha realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab cruzada en donde se intercambian los dominios variables o constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab). En una de dichas realizaciones, el primer (y el tercero, si lo hay) resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional.

- En una realización, no está presente más de un resto de unión a antígeno que se une al segundo 35 antígeno (por ejemplo, un antígeno activador de linfocitos T tal como CD3) en la molécula de

unión a antígeno biespecífica (es decir, la molécula de unión a antígeno biespecífica proporciona unión monovalente al segundo antígeno).

Modificaciones de carga

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención pueden comprender
 5 sustituciones de aminoácidos en moléculas Fab comprendidas en las mismas que son particularmente eficaces para reducir el emparejamiento erróneo de cadenas ligeras con cadenas pesadas no coincidentes (productos secundarios de tipo Bence-Jones), que puede producirse en la producción de moléculas de unión a antígeno bi/multiespecíficas basadas en Fab con un intercambio VH/VL en una (o más, en el caso de moléculas que comprenden más de dos
 10 moléculas Fab de unión a antígeno) de sus ramas de unión (véase también publicación de PCT n.º WO 2015/150447, en particular los ejemplos en la misma, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad). La relación de una molécula de unión a antígeno biespecífica deseada en comparación con productos secundarios no deseados, en particular productos secundarios de tipo Bence Jones que aparecen en moléculas de unión a antígeno
 15 biespecíficas con un intercambio de dominio VH/VL en una de sus ramas de unión, puede mejorarse mediante la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en los dominios CH1 y CL (a veces denominadas en el presente documento "modificaciones de carga").

En consecuencia, en algunas realizaciones en donde el primer y el segundo resto de unión a
 20 antígeno de la molécula de unión a antígeno biespecífica son ambas moléculas Fab y en uno de los restos de unión a antígeno (en particular el segundo resto de unión a antígeno) los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí,

i) en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido por un aminoácido con carga positiva (numeración según Kabat) y
 25 en donde en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 está sustituido por un aminoácido con carga negativa (numeración según el índice EU de Kabat); o

ii) en el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido por un aminoácido con carga positiva (numeración según Kabat) y
 30 en donde en el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 está sustituido por un aminoácido con carga negativa (numeración según el índice EU de Kabat).

La molécula de unión a antígeno biespecífica no comprende las dos modificaciones mencionadas en i) y ii). Los dominios constantes CL y CH1 del resto de unión a antígeno que
 35 tiene el intercambio VH/VL no se reemplazan entre sí (es decir, permanecen sin cambios).

En una realización más específica,

i) en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat); o

ii) en el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una de dichas realizaciones, en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización adicional, en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización particular, en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización más particular, en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K) (numeración según

Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido por lisina (K) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización aún más particular, en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido por arginina (R) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En realizaciones particulares, si se realizan sustituciones de aminoácidos según las realizaciones anteriores en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno, el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno es del isotipo kappa.

Como alternativa, las sustituciones de aminoácidos según las realizaciones anteriores pueden realizarse en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno en lugar de en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno. En realizaciones particulares de este tipo, el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno es del isotipo kappa.

En consecuencia, en una realización, en el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización adicional, en el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización más, en el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) y en

el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización, en el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido por lisina (K) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización, en el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido por arginina (R) (numeración según Kabat) y en el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno, el aminoácido en la posición 147 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat).

En una realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención comprende

(a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9, y

(b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno, en donde el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

en donde en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización particular independientemente por lisina (K) o

arginina (R)) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración según Kabat) (en una realización particular independientemente por lisina (K) o arginina (R)) y en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno el aminoácido en posición 147 está sustituido independientemente por
 5 ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración según el índice EU de Kabat).

Formatos de moléculas de unión a antígeno biespecíficas

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica según la presente invención
 10 pueden fusionarse entre sí en una diversidad de configuraciones. Se representan configuraciones ejemplares en la **Figura 1**.

En realizaciones particulares, los restos de unión a antígeno comprendidos en la molécula de unión a antígeno biespecífica son moléculas Fab. En dichas realizaciones, el primer, segundo, tercer, etc. resto de unión a antígeno puede denominarse en el presente documento primera,
 15 segunda, tercera, etc. molécula Fab, respectivamente.

En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno biespecífica se fusionan entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico. En realizaciones particulares, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab. En una de dichas realizaciones, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona
 20 en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En otra de dichas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En realizaciones en donde (i) el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo
 25 N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno o (ii) el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno, adicionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno pueden fusionarse entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico.

30 Una molécula de unión a antígeno biespecífica con un único resto de unión a antígeno (tal como una molécula Fab) capaz de unirse específicamente a un antígeno de células diana tal como STEAP-1 (por ejemplo, como se muestra en la **Figura 1A, D, G, H, K, L**) es útil, en particular en casos en los que es esperable la internalización del antígeno de la célula diana después de la unión de un resto de unión a antígeno de alta afinidad. En dichos casos, la presencia de más de
 35 un resto de unión a antígeno específico para el antígeno de la célula diana puede mejorar la

internalización del antígeno de la célula diana, reduciendo de este modo su disponibilidad.

En otros casos, sin embargo, será ventajoso tener una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprenda dos o más restos de unión a antígeno (tales como moléculas Fab) específicos para un antígeno de la célula diana (véanse los ejemplos mostrados en la **Figura 1B, 1C, 1E, 1F, 1I, 1J, 1M o 1N**), por ejemplo, para optimizar la dirección al sitio diana o para permitir la reticulación de antígenos de células diana.

En consecuencia, en realizaciones particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la presente invención comprende un tercer resto de unión a antígeno.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno se une al primer antígeno, es decir, STEAP-1. En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab.

En una realización, el tercer resto de antígeno es idéntico al primer resto de unión a antígeno.

El tercer resto de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno biespecífica puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, descritas en el presente documento en relación con el primer resto de unión a antígeno y/o el anticuerpo que se une a STEAP-1, a menos que desde el punto de vista científico sea claramente irrazonable o imposible.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9.

En una realización particular, el tercer resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende una HCDR 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 de la SEQ ID NO: 6, y un VL que comprende una LCDR 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, el tercer resto de unión a antígeno es (procedente de) un anticuerpo humanizado. En una realización, el VH es un VH humanizado y/o el VL es un VL humanizado. En una realización, el tercer resto de unión a antígeno comprende CDR como en cualquiera de las realizaciones anteriores y comprende además un marco conservado humano aceptor, por ejemplo, un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano.

En una realización, el VH del tercer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y el VL del tercer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de VH que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y una secuencia de VL que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno comprende una secuencia de VH seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 14.

En una realización particular, el tercer resto de unión a antígeno comprende un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En una realización particular, el tercer resto de unión a antígeno comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 14.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno comprende una región constante humana. En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región constante humana, en particular un dominio humano CH1 y/o CL. Se proporcionan secuencias ejemplares de dominios constantes humanos en las SEQ ID NO: 39 y 40 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y la SEQ ID NO: 41 (dominios constantes de cadena pesada de IgG₁ humana CH1-CH2-CH3). En algunas realizaciones, el tercer resto de unión a antígeno comprende una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 o la SEQ ID NO: 40, en particular la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39. En particular, la región constante de cadena ligera puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en "modificaciones de carga" y/o puede comprender la supresión o sustituciones de uno o más (en particular dos) aminoácidos N-terminales si está en una molécula Fab cruzada.

En algunas realizaciones, el tercer resto de unión a antígeno comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia del dominio CH1 comprendida en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En particular, la región constante de

5 cadena pesada (específicamente el dominio CH1) puede comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en "modificaciones de carga".

En realizaciones particulares, el tercer y el primer resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab y el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al primer resto de unión a antígeno. Por tanto, en estas realizaciones, el primer y el tercer resto de unión a antígeno comprenden las

10 mismas secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera y tienen la misma disposición de dominios (es decir, convencional o cruzado). Asimismo, en estas realizaciones, el tercer resto de unión a antígeno comprende las mismas sustituciones de aminoácidos, si las hubiera, que el primer resto de unión a antígeno. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento como "modificaciones de carga" se realizarán en el dominio constante CL

15 y el dominio constante CH1 de cada uno de los primeros restos de unión a antígeno y el tercer resto de unión a antígeno. Como alternativa, dichas sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 del segundo resto de unión a antígeno (que en realizaciones particulares también es una molécula Fab), pero no en el dominio constante CL y el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno y el

20 tercer resto de unión a antígeno.

Como el primer resto de unión a antígeno, el tercer resto de unión a antígeno es en particular una molécula Fab convencional. También se contemplan, sin embargo, realizaciones en donde el primer y el tercer resto de unión a antígeno son moléculas Fab cruzadas (y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional). Por tanto, en realizaciones particulares,

25 el primer y el tercer resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab convencional y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab cruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras realizaciones, el primer y el tercer resto de unión a antígeno son cada uno una

30 molécula Fab cruzada y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional.

Si está presente un tercer resto de unión a antígeno, en una realización particular, el primer y el tercer resto de antígeno se unen a STEAP-1 y el segundo resto de unión a antígeno se une a un segundo antígeno, en particular un antígeno activador de linfocitos T, más en particular CD3, más en particular CD3 épsilon.

35 En realizaciones particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad. La primera y la segunda

subunidad del dominio Fc tienen capacidad de asociación estable.

La molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención puede tener diferentes configuraciones, es decir, el primer, segundo (y opcionalmente tercer) grupo de unión a antígeno pueden fusionarse entre sí y con el dominio Fc de diferentes maneras. Los componentes pueden fusionarse entre sí directamente o, preferentemente, a través de uno o más conectores peptídicos adecuados. Cuando la fusión de una molécula Fab es con el extremo N de una subunidad del dominio Fc, normalmente es a través de una región bisagra de inmunoglobulina.

En algunas realizaciones, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En dichas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno puede fusionarse en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno o al extremo N de la otra de las subunidades del dominio Fc. En realizaciones particulares de este tipo, dicho primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab cruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras realizaciones de este tipo, dicha primera molécula Fab es una molécula Fab cruzada y la segunda molécula Fab es una molécula Fab convencional.

En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en donde la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab y la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Dicha configuración se representa esquemáticamente en las **Figuras 1G y 1K** (siendo el segundo dominio de unión a antígeno en estos ejemplos una molécula Fab cruzada VH/VL). Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab pueden fusionarse adicionalmente entre sí.

En otra realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab y el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de

- la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en donde la primera y la segunda
- 5 molécula Fab están cada una fusionadas en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc. Dicha configuración se representa esquemáticamente en las Figuras **1A** y **1D** (en estos ejemplos, siendo el segundo dominio de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL y siendo el primer resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional). La primera y la segunda molécula Fab pueden fusionarse con
- 10 el dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En una realización particular, la primera y la segunda molécula Fab se fusionan cada una con el dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, en particular donde el dominio Fc es un dominio Fc IgG₁.
- 15 En algunas realizaciones, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En dichas realizaciones, el segundo resto de unión a antígeno puede fusionarse en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión
- 20 a antígeno o (como se ha descrito anteriormente) con el extremo N de la otra subunidad del dominio Fc. En realizaciones particulares de este tipo, dicho primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab cruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y
- 25 ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras realizaciones de este tipo, dicha primera molécula Fab es una molécula Fab cruzada y la segunda molécula Fab es una molécula Fab convencional.

En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab, el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab

30 con el extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera y la segunda molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y

35 opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en donde la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada

de Fab con el extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Dicha configuración se representa esquemáticamente en las Figuras **1H** y **1L** (en estos ejemplos, siendo el segundo dominio de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL y siendo el primer resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional). Opcionalmente, la cadena
 5 ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab pueden fusionarse adicionalmente entre sí.

En algunas realizaciones, un tercer resto de unión a antígeno, en particular una tercera molécula Fab, se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc. En realizaciones particulares de este tipo, dichas primera y
 10 tercera moléculas Fab son cada una una molécula Fab convencional y la segunda molécula Fab es una molécula Fab cruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras realizaciones de este tipo, dichas primera y tercera moléculas Fab son cada una una molécula Fab cruzada y la
 15 segunda molécula Fab es una molécula Fab convencional.

En una realización particular de este tipo, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula
 20 Fab. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en donde la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab y la segunda molécula Fab
 25 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc y en donde la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. Dicha configuración se representa esquemáticamente en la **Figura 1B** y **1E** (en estos ejemplos, siendo el segundo resto de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL y siendo el primer y el tercer resto
 30 de unión a antígeno una molécula Fab convencional) y la **Figura 1J** y **1N** (en estos ejemplos, siendo el segundo resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional y siendo el primer y el tercer resto de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL). La segunda y la tercera molécula Fab pueden fusionarse con el dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En una realización particular, la segunda y la tercera molécula Fab se fusionan cada
 35 una con el dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, en particular donde el dominio Fc es un dominio Fc IgG₁. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab

de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab pueden fusionarse adicionalmente entre sí.

En otra de dichas realizaciones, el primer y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en donde la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab y la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc y en donde la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. Dicha configuración se representa esquemáticamente en la **Figura 1C** y **1F** (en estos ejemplos, siendo el segundo resto de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL y siendo el primer y el tercer resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional) y en la **Figura 1I** y **1M** (en estos ejemplos, siendo el segundo resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional y siendo el primer y el tercer resto de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL). La primera y la tercera molécula Fab pueden fusionarse con el dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En una realización particular, la primera y la tercera molécula Fab se fusionan cada una con el dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana, en particular donde el dominio Fc es un dominio Fc IgG₁. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab pueden fusionarse adicionalmente entre sí.

En configuraciones de la molécula de unión a antígeno biespecífica en donde una molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de cada una de las subunidades del dominio Fc a través de regiones bisagra de inmunoglobulina, las dos moléculas Fab, las regiones bisagra y el dominio Fc forman esencialmente una molécula de inmunoglobulina. En una realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de clase IgG. En una realización aún más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₁. En otra realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₄. En otra realización particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otras realizaciones, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada. En una realización, la inmunoglobulina comprende una región constante humana, en particular, una región Fc humana.

En algunas de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab y la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab están fusionadas entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico. Dependiendo de la configuración de la primera y la segunda molécula Fab, la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab puede fusionarse en su extremo C con el extremo N de la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab o la cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab puede fusionarse en su extremo C con el extremo N de la cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab. La fusión de las cadenas ligeras de Fab de la primera y la segunda molécula Fab reduce aún más el emparejamiento erróneo de cadenas pesadas y ligeras de Fab no coincidentes y también reduce el número de plásmidos necesarios para la expresión de algunas de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención.

Los restos de unión a antígeno pueden fusionarse con el dominio Fc o entre sí directamente o a través de un conector peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, normalmente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Se conocen en la técnica conectores peptídicos y se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$. "n" es en general un número entero de 1 a 10, normalmente de 2 a 4. En una realización, dicho conector peptídico tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos, en una realización, una longitud de 5 a 100, en una realización adicional de 10 a 50 aminoácidos. En una realización, dicho conector peptídico es $(G_xS)_n$ o $(G_xS)_nG_m$ con G = glicina, S=serina y $(x=3, n=3, 4, 5$ o 6 y $m=0, 1, 2$ o $3)$ o $(x=4, n=2, 3, 4$ o 5 y $m=0, 1, 2$ o $3)$, en una realización $x=4$ y $n=2$ o 3 , en una realización adicional $x=4$ y $n=2$. En una realización, dicho conector peptídico es $(G_4S)_2$. Un conector peptídico particularmente adecuado para fusionar las cadenas ligeras de Fab de la primera y la segunda molécula Fab entre sí es $(G_4S)_2$. Un conector peptídico ilustrativo adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y el segundo fragmento Fab comprende la secuencia (D)- $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO 37 y 38). Otro conector adecuado de este tipo comprende la secuencia $(G_4S)_4$. Adicionalmente, los conectores pueden comprender (una parte de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular, cuando una molécula Fab se fusiona con el extremo N de una subunidad del dominio Fc, puede fusionarse a través de una región bisagra de inmunoglobulina o una parte de la misma, con o sin un péptido conector adicional.

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$) y un polipéptido

en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab
 5 comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En determinadas realizaciones, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención
 10 comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo
 15 terminal con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(2)}-CL_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$) y un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab
 20 comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En determinadas realizaciones, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un
 25 polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal
 30 con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). En otras realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena ligera de Fab
 35 de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de

cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)).

En algunas de estas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido de cadena ligera de Fab cruzado de la segunda molécula Fab, en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En otras de estas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎) o un polipéptido en donde el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎), según sea adecuado.

La molécula de unión a antígeno biespecífica según estas realizaciones puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad del dominio Fc (CH2-CH3(-CH4)) o (ii) un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-CH2-CH3(-CH4)) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎). En determinadas realizaciones, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). En otras realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda

molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace

5 peptídico carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$).

En algunas de estas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido de cadena ligera de Fab cruzado de la segunda molécula Fab, en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace

10 peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En otras de estas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante

15 de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte una enlace peptídico carboxilo terminal con el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula de Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$) o un polipéptido en donde el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab que a su vez comparte un enlace peptídico

20 carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$), según sea adecuado.

La molécula de unión a antígeno biespecífica según estas realizaciones puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad del dominio Fc ($CH2-CH3(-CH4)$) o (ii) un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico

25 carboxilo terminal con una subunidad del dominio Fc ($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$). En determinadas realizaciones, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica no comprende un

30 dominio Fc. En realizaciones particulares de este tipo, dicha primera y, si está presente, tercera moléculas Fab son cada una una molécula Fab convencional y la segunda molécula Fab es una molécula Fab cruzada como se describe en el presente documento, es decir, una molécula Fab en donde los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CL y CH1 de las cadenas pesadas y ligeras de Fab se intercambian/reemplazan entre sí. En otras realizaciones de este tipo,

35 dicha primera y, si está presente, tercera moléculas Fab son cada una una molécula Fab cruzada y la segunda molécula Fab es una molécula Fab convencional.

En una de dichas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en el primer y el segundo resto de unión a antígeno, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en donde el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos moléculas Fab y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. Dicha configuración se representa esquemáticamente en las **Figuras 1O y 1S** (en estos ejemplos, siendo el segundo dominio de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL y siendo el primer resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional).

En otra de dichas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en el primer y el segundo resto de unión a antígeno, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en donde el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos moléculas Fab y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. Dicha configuración se representa esquemáticamente en las **Figuras 1P y 1T** (en estos ejemplos, siendo el segundo dominio de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL y siendo el primer resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional).

En algunas realizaciones, la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab y la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un tercer resto de unión a antígeno, en particular una tercera molécula Fab, en donde dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En determinadas realizaciones de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab y opcionalmente uno o más enlaces peptídicos, en donde la primera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab y la tercera molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Dicha configuración se representa esquemáticamente en las **Figuras 1Q y 1U** (en estos ejemplos, siendo el segundo dominio de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL y siendo cada uno del primero y el resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional) o las **Figuras 1X y 1Z** (en estos ejemplos, siendo el segundo dominio de unión a antígeno una molécula Fab convencional y siendo cada uno del primer y el tercer resto de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL).

En algunas realizaciones, la segunda molécula Fab se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab y la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un tercer resto de unión a antígeno,

en particular una tercera molécula Fab, en donde dicha tercera molécula Fab se fusiona en el extremo N de la cadena pesada de Fab con el extremo C de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. En determinadas realizaciones de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste esencialmente en la primera, la segunda y la tercera molécula Fab y
 5 opcionalmente uno o más enlaces peptídicos, en donde la segunda molécula Fab está fusionada en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab y la tercera molécula Fab está fusionada en el extremo N de la cadena pesada de Fab con el extremo C de la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab. Dicha configuración se representa esquemáticamente en las **Figuras 1R y 1V** (en estos ejemplos, siendo el segundo dominio de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL y siendo cada
 10 uno del primero y el resto de unión a antígeno una molécula Fab convencional) o las **Figuras 1W y 1Y** (en estos ejemplos, siendo el segundo dominio de unión a antígeno una molécula Fab convencional y siendo cada uno del primer y el tercer resto de unión a antígeno una molécula Fab cruzada VH/VL).

15 En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda
 20 molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera) ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena
 25 ligera de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena
 30 pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un
 35 polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera

molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera) (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo

terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).

- 5 En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab, que a su vez comparte un enlace
- 10 peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera) ($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena
- 15 ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).
- 20 En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una
- 25 cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(3)}-CH1_{(3)}$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena
- 30 pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).
- 35 En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la segunda

molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (es decir, la segunda molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además el polipéptido de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CL₍₃₎).

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (es decir, la primera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera) (VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₃₎-CH1₍₃₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VH₍₁₎-CL₍₁₎) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CL₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VH₍₃₎-CL₍₃₎).

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con

la región constante de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (es decir, la primera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de una

5 tercera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera) (VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₃₎-CL₍₃₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un

10 polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CH1₍₁₎) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CL₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de

15 Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CH1₍₃₎).

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena

20 pesada de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de

25 Fab de la primera molécula Fab (es decir, la primera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región variable de cadena pesada se reemplaza por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₃₎-CH1₍₃₎-VL₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende

30 además un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (VH₍₁₎-CL₍₁₎) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CL₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena

35 pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (VH₍₃₎-CL₍₃₎).

En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención

- comprende un polipéptido en donde la región variable de cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab (es decir, la tercera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región variable de cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab (es decir, la primera molécula Fab comprende una cadena pesada de Fab cruzada, en donde la región constante de cadena pesada se reemplaza por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la cadena pesada de Fab de la segunda molécula Fab (VH₍₃₎-CL₍₃₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de la primera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de la primera molécula Fab (VL₍₁₎-CH1₍₁₎) y el polipéptido de cadena ligera de Fab de la segunda molécula Fab (VL₍₂₎-CL₍₂₎). En algunas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende además un polipéptido en donde la región variable de cadena ligera de Fab de una tercera molécula Fab comparte un enlace peptídico carboxilo terminal con la región constante de cadena pesada de Fab de una tercera molécula Fab (VL₍₃₎-CH1₍₃₎).
- 20 En una realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende
- a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9;
 - 30 b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, más en particular CD3 épsilon, y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;
 - 35 c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad;

en donde

- (i) el primer resto de unión a antígeno en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno en b) y el segundo resto de unión a antígeno en b) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o
 - (ii) el segundo resto de unión a antígeno en b) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno en a) y el primer resto de unión a antígeno en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en c).
- 10 En una realización particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende
- a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9;
 - 20 b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, más en particular CD3 épsilon, y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;
 - 25 c) un tercer resto de unión a antígeno que se une al primer antígeno y es idéntico al primer resto de unión a antígeno; y
 - d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad;

en donde

- (i) el primer resto de unión a antígeno en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno en b) y el segundo resto de unión a antígeno en b) y el tercer resto de unión a antígeno en c) se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o
- 30

(ii) el segundo resto de unión a antígeno en b) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno en a) y el primer resto de unión a antígeno en a) y el tercer resto de unión a antígeno en c) se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En otra realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende

a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9;

b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, más en particular CD3 épsilon, y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad;

en donde

(i) el primer resto de unión a antígeno en a) y el segundo resto de unión a antígeno en b) se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

En todas las diferentes configuraciones de la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención, las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento, si están presentes, puede estar en los dominios CH1 y CL del primer y (si está presente) el tercer resto de unión a antígeno/molécula Fab o en los dominios CH1 y CL del segundo resto de unión a antígeno/molécula Fab. Preferentemente, están en los dominios CH1 y CL del primer y (si está presente) el tercer resto de unión a antígeno/molécula Fab. De acuerdo con el concepto de la invención, si se realizan sustituciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en el primer (y, si está presente, el tercer) resto de unión a antígeno/molécula Fab, no se realizan dichas sustituciones de aminoácidos en el segundo resto de unión a

antígeno/molécula Fab. Por el contrario, si se realizan sustituciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en el segundo resto de unión a antígeno/molécula Fab, no se realizan dichas sustituciones de aminoácidos en el primer (y, si está presente, el tercer) resto de unión a antígeno/molécula Fab. Las sustituciones de aminoácidos se realizan en particular en

5 moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH1 de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí.

En realizaciones particulares de la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención, en particular en donde se realizan sustituciones de aminoácidos como se describe en el presente

10 documento en el primer (y, si está presente, el tercer) resto de unión a antígeno/molécula Fab, el dominio constante CL de la primera (y, si está presente, la tercera) molécula Fab es del isotipo kappa. En otras realizaciones de la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención, en particular en donde se realizan sustituciones de aminoácidos como se describe en el presente documento en el segundo resto de unión a antígeno/molécula Fab, el dominio constante CL del

15 segundo resto de unión a antígeno/molécula Fab es del isotipo kappa. En algunas realizaciones, el dominio constante CL del primer (y, si está presente, el tercer) resto de unión a antígeno/molécula Fab y el dominio constante CL del segundo resto de unión a antígeno/molécula Fab son del isotipo kappa.

En una realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica que

20 comprende

a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ

25 ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9;

b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno, en donde el

30 segundo antígeno es un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, más en particular CD3 épsilon, y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad;

en donde en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno en a) el aminoácido

35 en la posición 124 está sustituido por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en

la posición 123 está sustituido por lisina (K) o arginina (R) (numeración según Kabat) (más en particular por arginina (R)) y en donde en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat); y

en donde

(i) el primer resto de unión a antígeno en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno en b) y el segundo resto de unión a antígeno en b) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en c), o

(ii) el segundo resto de unión a antígeno en b) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno en a) y el primer resto de unión a antígeno en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

15 En una realización particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende

a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9;

25 b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, más en particular CD3 épsilon, y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;

c) un tercer resto de unión a antígeno que se une al primer antígeno y es idéntico al primer resto de unión a antígeno; y

d) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad;

en donde en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno en a) y el tercer resto de unión a antígeno en c) el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K)

(numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido por lisina (K) o arginina (R) (numeración según Kabat) (más en particular por arginina (R)) y en donde en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno en a) y el tercer resto de unión a antígeno en c) el aminoácido en la posición 147 está sustituido por ácido glutámico (E)

5 (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat); y

en donde

- (i) el primer resto de unión a antígeno en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno en
- 10 b) y el segundo resto de unión a antígeno en b) y el tercer resto de unión a antígeno en c) se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en d), o
- (ii) el segundo resto de unión a antígeno en b) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno en a)
- 15 y el primer resto de unión a antígeno en a) y el tercer resto de unión a antígeno en c) se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en d).

En otra realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende

- 20 a) un primer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno, en donde el primer antígeno es STEAP-1 y el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 de la SEQ ID NO: 1, una HCDR 2 de la SEQ ID NO: 2 y una HCDR 3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID
- 25 NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 de la SEQ ID NO: 7, una LCDR 2 de la SEQ ID NO: 8 y una LCDR 3 de la SEQ ID NO: 9;
- b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno, en donde el segundo antígeno es un antígeno activador de linfocitos T, en particular CD3, más en particular
- 30 CD3 épsilon, y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí;
- c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad;

en donde en el dominio constante CL del primer resto de unión a antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en

la posición 123 está sustituido por lisina (K) o arginina (R) (numeración según Kabat) (más en particular por arginina (R)) y en donde en el dominio constante CH1 del primer resto de unión a antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat); y

en donde el primer resto de unión a antígeno en a) y el segundo resto de unión a antígeno en b) se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en c).

Según cualquiera de las realizaciones anteriores, componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica (por ejemplo, moléculas Fab, dominio Fc) pueden fusionarse directamente o a través de diversos conectores, en particular conectores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, normalmente aproximadamente 2-20 aminoácidos, que se describen en el presente documento o se conocen en la técnica. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en donde n es en general un número entero de 1 a 10, normalmente de 2 a 4.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende

a) un primer y un tercer resto de unión a antígeno que se une a un primer antígeno; en donde el primer antígeno es STEAP-1 y en donde el primer y el segundo resto de unión a antígeno son cada uno una molécula Fab (convencional) que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

b) un segundo resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno; en donde el segundo antígeno es CD3 y en donde el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab en donde los dominios variables VL y VH de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se reemplazan entre sí, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad;

en donde

en el dominio constante CL del primer y el tercer resto de unión a antígeno en a) el aminoácido en la posición 124 está sustituido por lisina (K) (numeración según Kabat) y el aminoácido en la posición 123 está sustituido por lisina (K) o arginina (R) (numeración según Kabat) (más en particular por arginina (R)) y en donde en el dominio constante CH1 del primer y el tercer resto

de unión a antígeno en a) el aminoácido en la posición 147 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat) y el aminoácido en la posición 213 está sustituido por ácido glutámico (E) (numeración según el índice EU de Kabat);

y en donde además

- 5 el primer resto de unión a antígeno en a) se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno en b) y el segundo resto de unión a antígeno en b) y el tercer resto de unión a antígeno en a) se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc en c).
- 10 En una realización según este aspecto de la invención, en la primera subunidad del dominio Fc, el resto de treonina en la posición 366 se reemplaza con un resto de triptófano (T366W) y en la segunda subunidad del dominio Fc el resto de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un resto de valina (Y407V) y opcionalmente el resto de treonina en la posición 366 se reemplaza con un resto de serina (T366S) y el resto de leucina en la posición 368 se reemplaza con un resto
- 15 de alanina (L368A) (numeraciones según el índice EU de Kabat).

- En una realización adicional según este aspecto de la invención, en la primera subunidad del dominio Fc, se reemplaza adicionalmente el resto de serina en la posición 354 con un resto de cisteína (S354C) o se reemplaza el resto de ácido glutámico en la posición 356 con un resto de cisteína (E356C) (en particular el resto de serina en la posición 354 se reemplaza con un resto
- 20 de cisteína) y en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente se reemplaza el resto de tirosina en la posición 349 por un resto de cisteína (Y349C) (numeraciones según el índice EU de Kabat).

- En otra realización adicional según este aspecto de la invención, en cada una de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc, el resto de leucina en la posición 234 se reemplaza con un
- 25 resto de alanina (L234A), el resto de leucina en la posición 235 se reemplaza con un resto de alanina (L235A) y el resto de prolina en la posición 329 se reemplaza por un resto de glicina (P329G) (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización adicional según este aspecto de la invención, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁ humano.

- 30 En una realización específica particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 32, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 33, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos

que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 34 y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 35. En una realización específica particular adicional, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un polipéptido que

5 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35.

En otra realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un

10 polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 28, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 29, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 34

15 y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 35. En una realización específica adicional, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29, un polipéptido que comprende la secuencia

20 de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35.

En otra realización específica más, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 30, un polipéptido que comprende una

25 secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 61, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 34 y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 35. En una realización específica

30 adicional, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35.

Dominio Fc

En realizaciones particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad. Se entiende que las características del dominio Fc descrito en el presente documento en relación con la

5 molécula de unión a antígeno biespecífica pueden aplicarse igualmente a un dominio Fc comprendido en un anticuerpo de la invención.

El dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es

10 un dímero, cada subunidad del cual comprende los dominios constantes de cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc tienen capacidad de asociación estable entre sí. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención no comprende más de un dominio Fc.

En una realización, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica es un dominio

15 Fc de IgG. En una realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otra realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En una realización más específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición S228 (numeración del índice EU de Kabat), en particular, la sustitución de aminoácidos S228P. Esta sustitución de aminoácidos reduce el intercambio de rama de Fab *in vivo* de los

20 anticuerpos IgG₄ (véase Stubenrauch *et al.*, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En una realización particular adicional, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En una realización aún más particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁ humano. Se proporciona una secuencia ilustrativa de una región Fc de IgG₁ humana en la SEQ ID NO: 36.

Modificaciones de dominio Fc que promueven la heterodimerización

25 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas según la invención comprenden diferentes restos de unión a antígeno, que pueden fusionarse a una o a la otra de las dos subunidades del dominio Fc, por tanto, las dos subunidades del dominio Fc están comprendidos normalmente en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización conduce a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para

30 mejorar el rendimiento y la pureza de moléculas de unión a antígeno biespecíficas en producción recombinante, será ventajoso por tanto introducir en el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, en realizaciones particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno

35 biespecífica según la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la

primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana se encuentra en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, en una realización, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

- 5 Existen varios enfoques para modificaciones en el dominio CH3 del dominio Fc para provocar la heterodimerización, que están bien descritos, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Normalmente, en todos estos enfoques, el dominio CH3 de la primera
- 10 subunidad del dominio Fc y el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc están ambos diseñados de manera complementaria de modo que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) ya no pueda homodimerizarse consigo mismo, sino que se vea obligado a heterodimerizarse con el otro dominio CH3 diseñado de forma complementaria (de modo que el primer y segundo dominio CH3 se heterodimerizan y no se forman homodímeros
- 15 entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3). Estos diferentes enfoques para mejorar la heterodimerización de la cadena pesada se contemplan como alternativas diferentes en combinación con las modificaciones de la cadena pesada (por ejemplo, intercambio/reemplazo de VH y VL en una rama de unión y la introducción de sustituciones de aminoácidos cargados con cargas opuestas en la interfaz CH1/CL) en la molécula de unión a
- 20 antígeno biespecífica que reduce el emparejamiento erróneo de cadena pesada/ligera y los productos secundarios de tipo Bence Jones.

En una realización específica, dicha modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc es una modificación denominada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una

25 modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el método implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfaz de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad ("ojal") en la interfaz de un segundo

30 polipéptido, de modo que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad para promover la formación de heterodímeros e impedir la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz del primer polipéptido con cadenas mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo

35 polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en una realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tenga un mayor volumen de cadena lateral, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que puede
 5 posicionarse en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tenga un menor volumen de cadena lateral, generando de este modo una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en la que puede posicionarse la protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad.

10 Preferentemente dicho resto de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Preferentemente dicho resto de aminoácido que tiene un menor volumen de cadena lateral se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

La protuberancia y la cavidad pueden realizarse alterando el ácido nucleico que codifica los
 15 polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis específica o mediante síntesis peptídica.

En una realización específica, en (el dominio CH3 de) la primera subunidad del dominio Fc (la subunidad de "botones") se reemplaza el resto de treonina en la posición 366 con un resto de triptófano (T366W) y en (el dominio CH3 de) la segunda subunidad del dominio Fc (la subunidad de "ojal") se reemplaza el resto de tirosina en la posición 407 con un resto de valina
 20 (Y407V). En una realización, en la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza adicionalmente el resto de treonina en la posición 366 con un resto de serina (T366S) y se reemplaza el resto de leucina en la posición 368 con un resto de alanina (L368A) (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En una realización adicional más, en la primera subunidad del dominio Fc, se reemplaza
 25 adicionalmente el resto de serina en la posición 354 con un resto de cisteína (S354C) o se reemplaza el resto de ácido glutámico en la posición 356 con un resto de cisteína (E356C) (en particular el resto de serina en la posición 354 se reemplaza con un resto de cisteína) y en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente se reemplaza el resto de tirosina en la posición 349 por un resto de cisteína (Y349C) (numeraciones según el índice EU de Kabat). La
 30 introducción de estos dos restos de cisteína da como resultado la formación de un enlace disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, estabilizando adicionalmente el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

En una realización particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las
 35 sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A e Y407V (numeración según el índice EU

de Kabat).

En una realización particular, el resto de unión a antígeno que se une al segundo antígeno (por ejemplo, un antígeno activador de linfocitos T) se fusiona (opcionalmente a través del primer resto de unión a antígeno, que se une a STEAP-1 y/o un conector peptídico) con la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación de "botón"). Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, la fusión del resto de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno, tal como un antígeno activador de linfocitos T, con la subunidad que contiene botón del dominio Fc minimizará (adicionalmente) la generación de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos restos de unión a antígeno que se unen a un antígeno activador de linfocitos T (choque estérico de dos polipéptidos que contienen botón).

Se contemplan otras técnicas de modificación de CH3 para provocar la heterodimerización como alternativas según la invención y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

En una realización, se usa como alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en el documento EP 1870459. Este enfoque se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en la interfaz de dominios CH3/CH3 entre las dos subunidades del dominio Fc. Una realización preferida para la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención son las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en uno de los dos dominios CH3 (del dominio Fc) y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el otro de los dominios CH3 del dominio Fc (numeración según el índice EU de Kabat).

En otra realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención comprende la mutación de aminoácidos T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc y adicionalmente las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En otra realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención comprende las mutaciones de aminoácidos S354C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc o dicha molécula de unión a antígeno biespecífica comprende las mutaciones de aminoácidos Y349C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos S354C, T366S, L368A, Y407V en

los dominios CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc y adicionalmente las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (todas las numeraciones según el índice EU de Kabat).

- 5 En una realización, se usa como alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2013/157953. En una realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos T366K y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos L351D (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización adicional, el primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos adicional L351K. En una
10 realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende además una mutación de aminoácidos seleccionada de Y349E, Y349D y L368E (preferentemente L368E) (numeraciones según el índice EU de Kabat).

- En una realización, se usa como alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2012/058768. En una realización, un primer dominio CH3 comprende las
15 mutaciones de aminoácidos L351Y, Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366A, K409F. En una realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende una mutación de aminoácidos adicional en la posición T411, D399, S400, F405, N390 o K392, por ejemplo, seleccionada de a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E o T411W, b) D399R, D399W, D399Y o D399K, c) S400E, S400D, S400R o S400K, d) F405I,
20 F405M, F405T, F405S, F405V o F405W, e) N390R, N390K o N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F o K392E (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización adicional, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos L351Y, Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366V, K409F. En una realización adicional, un primer dominio CH3 comprende la mutación de
25 aminoácidos Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366A, K409F. En una realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende además las mutaciones de aminoácidos K392E, T411E, D399R y S400R (numeraciones según el índice EU de Kabat).

- En una realización, se usa como alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en el
30 documento WO 2011/143545, por ejemplo, con la modificación de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en 368 y 409 (numeración según el índice EU de Kabat).

- En una realización, se usa como alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2011/090762, que también usa la tecnología de botones en ojales descrita anteriormente. En una realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de
35 aminoácidos T366W y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos Y407A. En una realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos

T366Y y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácidos Y407T (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica o su dominio Fc es de la subclase IgG₂ y se usa como alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2010/129304.

En una realización alternativa, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media en los efectos de dirección electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación de PCT WO 2009/089004. En general, este método implica el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades del dominio Fc por restos de aminoácidos con carga de modo que la formación de homodímeros se hace electrostáticamente desfavorable pero la heterodimerización se hace electrostáticamente favorable. En una de dichas realizaciones, un primer dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácidos de K392 o N392 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), preferentemente K392D o N392D) y un segundo dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácidos de D399, E356, D356 o E357 con un aminoácido con carga positiva (por ejemplo, lisina (K) o arginina (R), preferentemente D399K, E356K, D356K o E357K y más preferentemente D399K y E356K). En una realización adicional, el primer dominio CH3 comprende además la sustitución de aminoácidos de K409 o R409 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), preferentemente K409D o R409D). En una realización adicional, el primer dominio CH3 comprende adicionalmente o como alternativa la sustitución de aminoácidos de K439 y/o K370 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D)) (todas las numeraciones según el índice EU de Kabat).

En una realización adicional más, se usa como alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2007/147901. En una realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos K253E, D282K y K322D y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos D239K, E240K y K292D (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En otra realización más, se puede usar como alternativa el enfoque de heterodimerización descrito en el documento WO 2007/110205.

En una realización, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos K392D y K409D y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos D356K y D399K (numeración según el índice EU de Kabat).

Modificaciones del dominio Fc que reducen la unión al receptor de Fc y/o la función efectora

El dominio Fc confiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica (o al anticuerpo) propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una relación de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo puede, sin embargo, conducir a un direccionamiento indeseable de la molécula de unión a antígeno biespecífica (o el anticuerpo) a células que expresan receptores de Fc en lugar de a las células portadoras de antígeno preferidas. Por otra parte, la coactivación de rutas de señalización del receptor de Fc puede conducir a la liberación de citocinas que, en combinación con las propiedades de activación de linfocitos T (por ejemplo, en realizaciones de la molécula de unión a antígeno biespecífica en donde el segundo resto de unión a antígeno se une a un antígeno activador de linfocitos T) y la larga semivida de la molécula de unión a antígeno biespecífica, da como resultado activación excesiva de receptores de citocinas y efectos secundarios graves tras la administración sistémica. La activación de células inmunitarias (portadoras de receptor de Fc) distintas de linfocitos T puede incluso reducir la eficacia de la molécula de unión a antígeno biespecífica (en particular una molécula de unión a antígeno biespecífica en donde el segundo resto de unión a antígeno se une a un antígeno activador de linfocitos T) debido a la destrucción potencial de linfocitos T, por ejemplo, por linfocitos NK.

En consecuencia, en realizaciones particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención muestra afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativo. En una de dichas realizaciones, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende dicho dominio Fc) muestra menos de 50 %, preferentemente menos de 20 %, más preferentemente menos de 10 % y lo más preferentemente menos de 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativo (o una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativo) y/o menos de 50 %, preferentemente menos de 20 %, más preferentemente menos de 10 % y lo más preferentemente menos de 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio de dominio Fc de IgG₁ nativo (o una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativo). En una realización, el dominio de dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce función efectora. En un aspecto particular, el receptor de Fc es un receptor Fc γ . En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En una realización específica, el receptor de Fc es un receptor Fc γ humano activador, más específicamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa humano, lo más específicamente Fc γ RIIIa humano. En una realización, la función efectora es una o más seleccionadas del grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En una realización

particular, la función efectora es ADCC. En una realización, el dominio de dominio Fc muestra afinidad de unión sustancialmente similar al receptor de Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio de dominio Fc de IgG₁ nativo. Se logra unión sustancialmente similar a FcRn cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende dicho

5 dominio Fc) muestra más de aproximadamente 70 %, en particular más de aproximadamente 80 %, más en particular más de aproximadamente 90 % de la afinidad de unión de un dominio Fc de IgG₁ nativo (o la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativo) por FcRn.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc se modifica por ingeniería genética para tener

10 afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. En realizaciones particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o la función efectora. Normalmente, están presentes las mismas una o más mutaciones de

15 aminoácidos en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En una realización, la mutación de aminoácidos reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc. En una realización, la mutación de aminoácidos reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En realizaciones donde hay más de una mutación de aminoácidos que reduce la afinidad de unión del dominio

20 Fc por el receptor de Fc, la combinación de estas mutaciones de aminoácidos puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc modificado por ingeniería genética muestra menos de 20 %, en particular menos de 10 %, más en particular menos de 5 % de la afinidad de unión por un

25 receptor de Fc en comparación con una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. En una realización particular, el receptor de Fc es un receptor Fcγ. En algunas realizaciones, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En algunas realizaciones, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En una realización específica, el receptor de Fc es un receptor Fcγ activador humano, más

30 específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, lo más específicamente FcγRIIIa humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunas realizaciones, la afinidad de unión por un componente de complemento, específicamente, la afinidad de unión por C1q, también se reduce. En una realización, la afinidad de unión al receptor de Fc neonatal (FcRn) no se reduce. Se logra unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación

35 de la afinidad de unión del dominio Fc por dicho receptor, cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende dicho dominio Fc) muestra más de aproximadamente 70 % de la afinidad de unión de una forma no modificada por ingeniería genética del dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende dicha

forma no modificada por ingeniería genética del dominio Fc) por FcRn. El dominio Fc, o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que comprende dicho dominio Fc, puede mostrar más de aproximadamente 80 % e incluso más de aproximadamente 90 % de dicha afinidad. En determinadas realizaciones, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica está modificado por ingeniería genética para tener función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. La función efectora reducida puede incluir, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígeno mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos reducida, unión a linfocitos NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa inductora de apoptosis reducida, reticulación de anticuerpos unidos a diana reducida, maduración de células dendríticas reducida o cebado de linfocitos T reducido. En una realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción de citocinas reducida. En una realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En una realización, la ADCC reducida es menos de 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no modificado por ingeniería genética (o una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc no modificado por ingeniería genética).

En una realización, la mutación de aminoácidos que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o función efectora es una sustitución de aminoácidos. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización más específica, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo de L234, L235 y P329 (numeraciones según el índice EU de Kabat). En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una de dichas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humano. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329. En una realización más específica, la sustitución de aminoácidos es P329A o P329G, en particular P329G (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329 y una sustitución de aminoácidos adicional en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331 (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización más específica, la sustitución de aminoácidos adicional es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En realizaciones particulares, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones P329, L234 y L235 (numeraciones según el índice EU de Kabat). En realizaciones

más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", "PGLALA" o "LALAPG"). De manera específica, en realizaciones particulares, cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración del índice EU de Kabat), es decir, en cada una de la
 5 primera y segunda subunidad del dominio Fc, el resto de leucina en la posición 234 se reemplaza con un resto de alanina (L234A), el resto de leucina en la posición 235 se reemplaza con un resto de alanina (L235A) y el resto de prolina en la posición 329 se reemplaza por un resto de glicina (P329G) (numeración según el índice EU de Kabat).

. En una de dichas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un
 10 dominio Fc de IgG₁ humano. La combinación "P329G LALA" de sustituciones de aminoácidos suprime casi por completo la unión al receptor Fcγ (así como al complemento) de un dominio Fc de IgG₁ humano, como se describe en la publicación de PCT n.º WO 2012/130831, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. El documento WO 2012/130831 también describe métodos para preparar dichos dominio Fc mutantes y métodos
 15 para determinar sus propiedades, tales como unión al receptor de Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos IgG₄ muestran afinidad de unión reducida por los receptores de Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con los anticuerpos IgG₁. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención es un dominio Fc IgG₄, en particular un dominio Fc de IgG₄ humano. En una realización, el
 20 dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones de aminoácidos en la posición S228, específicamente la sustitución de aminoácidos S228P (numeraciones según el índice EU de Kabat). Para reducir adicionalmente su afinidad de unión por un receptor de Fc y/o su función efectora, en una realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución de aminoácidos en la posición L235, específicamente la sustitución de aminoácidos L235E (numeraciones según
 25 el índice EU de Kabat). En otra realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329, específicamente la sustitución de aminoácidos P329G (numeraciones según el índice EU de Kabat). En una realización particular, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y P329G (numeraciones según el
 30 índice EU de Kabat). Dichos mutantes del dominio Fc de IgG₄ y sus propiedades de unión al receptor Fcγ se describen en la publicación de PCT n.º WO 2012/130831, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

En una realización particular, el dominio Fc que muestra afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativo,
 35 es un dominio Fc de IgG₁ humano que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y opcionalmente P329G o un dominio Fc de IgG₄ humano que comprende las

sustituciones de aminoácidos S228P, L235A y opcionalmente P329G (numeraciones según el índice EU de Kabat).

En determinadas realizaciones, se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En una de dichas realizaciones, el dominio Fc comprende una mutación de aminoácidos en la posición
 5 N297, en particular una sustitución de aminoácidos que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D) (numeraciones según el índice EU de Kabat).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación de PCT n.º WO 2012/130831, los dominios Fc con unión al receptor de Fc y/o función efectora reducidas también incluyen los que tienen sustitución de uno o más de los
 10 restos del dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de los Estados Unidos n.º 6.737.056) (numeraciones según el índice EU de Kabat). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (Patente de los Estados Unidos n.º 7.332.581).

15 Los dominios Fc mutantes se pueden preparar mediante supresión, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios correctos de nucleótidos pueden verificarse, por ejemplo, mediante secuenciación.

20 La unión a receptores de Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA o mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) usando instrumentación convencional, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare) y receptores de Fc, tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Como alternativa, la afinidad de unión de dominios Fc o moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un dominio Fc por los
 25 receptores de Fc puede evaluarse usando líneas celulares que se sabe que expresan receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK humanos que expresan receptor FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc o una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un dominio Fc, puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica. Se describen ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de
 30 interés en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente de los Estados Unidos n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTITM para citometría de flujo
 35 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox

96[®] (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el desvelado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunas realizaciones, la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q, se reduce. En consecuencia, en algunas realizaciones en donde el dominio Fc está modificado por ingeniería genética para tener función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si el dominio Fc, o la molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende el dominio Fc, es capaz de unirse a C1q y, por lo tanto, tiene actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

También se pueden realizar determinaciones de unión a FcRn y aclaramiento *in vivo*/semivida utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); documento WO 2013/120929).

20 Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento o un fragmento de los mismos. En algunas realizaciones, dicho fragmento es un fragmento de unión a antígeno.

Los polinucleótidos que codifican anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención pueden expresarse como un único polinucleótido que codifica el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica completos o como múltiples polinucleótidos (por ejemplo, dos o más) que se expresan conjuntamente. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se expresan conjuntamente pueden asociarse a través, por ejemplo, de enlaces disulfuro u otros medios para formar un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica funcionales. Por ejemplo, la parte de cadena ligera de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica puede estar codificada por un polinucleótido separado de la parte del anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende la cadena pesada del anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica. Cuando se expresan conjuntamente, los polipéptidos de cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de cadena ligera para formar el

anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica. En otro ejemplo, la parte del anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende una de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) una o más moléculas Fab podría estar codificada por un polinucleótido separado de la parte del anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende la otra de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) una molécula Fab. Cuando se expresan conjuntamente, las subunidades del dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En algunas realizaciones, el polinucleótido aislado codifica el anticuerpo completo o la molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en el anticuerpo o la molécula biespecífica según la invención, como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Métodos recombinantes

Los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, por síntesis peptídica en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica (fragmento), por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, se aíslan e insertan en uno o más vectores para una clonación adicional y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales. En una realización, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica (o fragmento) junto con señales de control transcripcional/traduccionales adecuadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y (1989). El vector de expresión puede

ser parte de un plásmido, un virus o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica (o fragmento) (es decir, la región codificante) en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o la traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una parte de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, si está presente, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, regiones 5' y 3' no traducidas y similares, no forman parte de una región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes en una única construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un único vector o en construcciones polinucleotídicas separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Asimismo, cualquier vector puede contener una única región codificante o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan después o durante la traducción en las proteínas finales mediante escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, fusionado o no fusionado con un polinucleótido que codifica el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica (o fragmento) de la invención, o variante o derivado de los mismos. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo. Una asociación operativa sucede cuando una región codificante de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras, de tal modo que sitúan la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado a la misma) están "asociados operativamente" si la inducción de la función del promotor da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Por tanto, una región promotora estaría asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor es capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, aparte de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Se desvelan en el presente documento promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Los expertos

en la materia conocen una diversidad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que actúan en células de vertebrados, tales como, pero sin limitación, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, junto con el intrón-A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tal como, por ejemplo, virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las procedentes de genes de vertebrados, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De manera similar, los expertos habituales en la materia conocen una diversidad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción y elementos procedentes de sistemas víricos (en particular un sitio de entrada de ribosoma interno, o IRES, también denominado una secuencia de CITE). El casete de expresión también puede incluir otras características, tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica, tales como repeticiones terminales largas retrovíricas (LTR) o repeticiones terminales invertidas (ITR) de virus adenoasociados (AAV).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácido nucleico de la presente invención pueden asociarse con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica, puede situarse ADN que codifica una secuencia señal cadena arriba del ácido nucleico que codifica un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención o un fragmento de los mismos. Según la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o una secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la materia son conscientes de que los polipéptidos secretados por células de vertebrados tienen en general un péptido señal fusionado con el extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, el péptido señal nativo, por ejemplo, un péptido señal de cadena pesada o de cadena ligera de inmunoglobulina o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que está asociado operativamente con ella. Como alternativa, se puede usar un péptido señal heterólogo de mamífero, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, puede sustituirse la secuencia líder de tipo silvestre por la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular humano (TPA) o β -glucuronidasa de ratón.

Puede incluirse ADN que codifica una secuencia de proteína corta que podría usarse para facilitar la purificación posterior (por ejemplo, un marcador de histidina) o ayudar a marcar el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica dentro o en los extremos del polinucleótido codificante de anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica (o
5 fragmento).

En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinadas realizaciones, se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, descritas
10 en el presente documento en relación con los polinucleótidos y vectores, respectivamente. En una de dichas realizaciones, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) uno o más vectores que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican (parte de) un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula
15 hospedadora" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que pueda modificarse por ingeniería genética para generar el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención o fragmentos de los mismos. Se conocen bien en la técnica células hospedadoras adecuadas para replicar y para apoyar la expresión de anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según sea necesario
20 con el vector de expresión concreto y pueden cultivarse grandes cantidades de células que contienen el vector para sembrar en fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica para aplicaciones clínicas. Las células hospedadoras adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO),
25 células de insecto o similares. Por ejemplo, pueden producirse polipéptidos en bacterias, en particular cuando la glucosilación no es necesaria. Después de la expresión, puede aislarse el polipéptido a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente. Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores
30 codificantes de polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) y Li *et al.*, Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también proceden de organismos
35 multicelulares (vertebrados e invertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden usarse junto con células de insecto, en particular para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véase,

por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). Las células de vertebrados también pueden usarse como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles células de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describen, por ejemplo, en Graham *et al.*, J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describen, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describen, por ejemplo, en Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO dhfr⁻ (Urlaub *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003). Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal. En una realización, la célula hospedadora es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, células Y0, NS0 y Sp20).

Se conocen en la técnica tecnologías convencionales para expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o la ligera de un dominio de unión a antígeno tal como un anticuerpo, pueden modificarse por ingeniería genética para expresar también la otra de las cadenas de anticuerpo de modo que el producto expresado es un anticuerpo que tiene tanto una cadena pesada como una ligera.

En una realización, se proporciona un método para producir un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica, como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica y opcionalmente recuperar el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la

célula hospedadora (o medio de cultivo de células hospedadoras).

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica (o el anticuerpo) de la invención pueden fusionarse genéticamente entre sí. La molécula de unión a antígeno biespecífica se puede diseñar de modo que sus componentes se fusionen directamente entre sí o indirectamente a través de una secuencia conectora. La composición y longitud del conector se pueden determinar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y se pueden ensayar para determinar su eficacia. En el presente documento se proporcionan ejemplos de secuencias conectoras entre diferentes componentes de moléculas de unión a antígeno biespecíficas. También se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la fusión si se desea, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa.

El anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención comprende en general al menos una región variable de anticuerpo capaz de unirse a un determinante antigénico. Las regiones variables pueden formar parte y proceder de anticuerpos de origen natural o no natural y fragmentos de los mismos. Se conocen bien en la técnica métodos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Pueden construirse anticuerpos de origen no natural usando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 4.186.567) o se pueden obtener, por ejemplo, explorando bibliotecas combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 5.969.108 de McCafferty).

Pueden usarse cualquier especie animal de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o región variable en el anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención. Los anticuerpos no limitantes, fragmentos de anticuerpos, dominios de unión a antígeno o regiones variables útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, primate o humano. Si el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica está destinado al uso humano, se puede usar una forma quimérica de anticuerpo en donde las regiones constantes del anticuerpo son de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o completamente humana del anticuerpo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 5.565.332 de Winter). La humanización se puede lograr mediante diversos métodos, incluyendo, pero sin limitación, (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en el marco conservado (por ejemplo, de anticuerpo receptor) humano y regiones constantes con o sin conservación de restos de marco conservado críticos (por ejemplo, los que son importantes para conservar buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpos), (b) injertar solo las regiones

determinantes de especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los restos críticos para la interacción de anticuerpo-antígeno) en el marco conservado y las regiones constantes humanas o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "ocultándolos" con una sección de tipo humano mediante el reemplazo de restos superficiales. Se revisan anticuerpos humanizados y métodos para fabricarlos, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989); patentes de los Estados Unidos n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36: 25-34 (2005) (que describe el injerto de región determinante de especificidad (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489-498 (1991) (que describe el "rechapado"); Dall'Acqua *et al.*, *Métodos* 36: 43-60 (2005) (que describe "redistribución de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36: 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83: 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para redistribución de FR). Las regiones marco conservadas humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, pero sin limitación: regiones marco conservadas seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco conservadas procedentes de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco conservadas maduras humanas (mutadas de forma somática) o regiones marco conservadas de línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco conservadas procedentes de la exploración de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 22611-22618 (1996)).

Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Dichos animales contienen habitualmente todos o una parte de los loci de inmunoglobulina humana, que reemplazan los loci de inmunoglobulina endógena, o que están presentes extracromosómicamente o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógena en general se han inactivado. Para una revisión de métodos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véase también, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; patente de los Estados Unidos n.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; patente de los Estados Unidos n.º 7.041.870

que describe la tecnología KM MOUSE® y publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º US 2007/0061900, que describe la TECNOLOGÍA VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, combinando con una región constante humana diferente.

- 5 También se pueden preparar anticuerpos humanos mediante métodos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) También se describen anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos monoclonales IgM humanos a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 15 26(4): 265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). También se describe tecnología de hibridoma humano (tecnología de Trioma) en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3): 927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También pueden generarse anticuerpos humanos mediante aislamiento de bibliotecas de anticuerpos humanos, como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos útiles en la invención pueden aislarse seleccionando bibliotecas combinatorias para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Se revisan métodos para explorar bibliotecas combinatorias, por ejemplo, en Lerner *et al.* en *Nature Reviews* 16: 498-508 (2016). Por ejemplo, se conoce una diversidad de procedimientos en la técnica para generar bibliotecas de presentación en fagos y explorar dichas bibliotecas para detectar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Frenzel *et al.* en *mAbs* 8: 1177-1194 (2016); Bazan *et al.* en *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8: 1817-1828 (2012) y Zhao *et al.* en *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 276-289 (2016), así como en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y en Marks y Bradbury en *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003).

En determinados métodos de presentación en fagos, se clonan repertorios de genes VH y VL por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después pueden explorarse para detectar fagos de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.* en *Annual Review of Immunology* 12: 433-455 (1994). Los fagos típicamente presentan fragmentos de anticuerpos, ya sea como

fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio no expuesto previamente se puede clonar (por ejemplo, de ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia

5 gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización, como se describe en Griffiths *et al.* en *EMBO Journal* 12: 725-734 (1993). Por último, las bibliotecas sin exposición previa también se pueden preparar sintéticamente clonando segmentos de genes V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 muy variables y conseguir la reordenación

10 *in vitro*, según lo descrito por Hoogenboom y Winter en *Journal of Molecular Biology* 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: patentes de los Estados Unidos n.º 5.750.373; 7.985.840; 7.785.903 y 8.679.490, así como las publicaciones de patente de los Estados Unidos n.º 2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 y 2007/0292936. Otros ejemplos de métodos

15 conocidos en la técnica para explorar bibliotecas combinatorias para detectar anticuerpos con una actividad o actividades deseadas incluyen presentación de ribosomas y ARNm, así como métodos para la presentación y selección de anticuerpos en bacterias, células de mamífero, células de insecto o células de levadura. Se revisan los métodos para presentación en superficie de levadura, por ejemplo, en Scholler *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 503: 135-56 (2012)

20 y en Cherf *et al.* en *Methods in Molecular biology* 1319: 155-175 (2015), así como en Zhao *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 889: 73-84 (2012). Se describen métodos para presentación de ribosomas, por ejemplo, en He *et al.* en *Nucleic Acids Research* 25: 5132-5134 (1997) y en Hanes *et al.* en *PNAS* 94: 4937-4942 (1997).

Los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas preparadas como se describe

25 en el presente documento pueden purificarse mediante técnicas conocidas en este campo, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, hidrofobicidad, hidrofilia, etc. y resultarán evidentes para los

30 expertos en la materia. Para la purificación por cromatografía de afinidad, se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención, puede usarse una matriz con proteína A o proteína G. Pueden usarse cromatografía de afinidad de proteína A o G

35 secuencial y cromatografía de exclusión por tamaño para aislar un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica esencialmente como se describe en los ejemplos. La pureza del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica se puede determinar mediante cualquiera de una diversidad de métodos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis

en gel, cromatografía líquida de alta presión y similares.

Ensayos

Los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionados en el presente
 5 documento pueden identificarse, explorarse o caracterizarse con respecto a sus propiedades
 fisicoquímicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de afinidad

La afinidad del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica por un receptor de Fc
 10 o un antígeno diana se puede determinar, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón
 superficial (RPS), usando instrumentos convencionales, tales como un instrumento BIAcore
 (GE Healthcare) y receptores o proteínas diana, tales como los que pueden obtenerse mediante
 expresión recombinante. Como alternativa, la unión de anticuerpos o moléculas de unión a
 antígeno biespecíficas para diferentes receptores o antígenos diana puede evaluarse usando
 15 líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo, mediante
 citometría de flujo (FACS). A continuación se describe una realización ilustrativa y ejemplar
 específica para medir la afinidad de unión.

Según una realización, la K_D se mide mediante resonancia de plasmón superficial usando una
 máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

20 Para analizar la interacción entre la parte Fc y los receptores de Fc, se captura el receptor de Fc
 recombinante marcado con His mediante un anticuerpo anti-Penta His (Qiagen) inmovilizado
 en chips CM5 y las construcciones biespecíficas se usan como analitos. En resumen, se activan
 chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de N-
 etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las
 25 instrucciones del proveedor. Se diluye anticuerpo anti Penta-His con acetato de sodio 10 mM,
 pH 5,0, hasta 40 µg/ml antes de su inyección a un caudal de 5 µl/min para alcanzar
 aproximadamente 6500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la
 inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han
 reaccionado. Posteriormente, el receptor Fc se captura durante 60 s a 4 o 10 nM. Para
 30 mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie cuádruples del anticuerpo o la molécula
 de unión a antígeno biespecífica (intervalo entre 500 nM y 4000 nM) en HBS-EP (GE
 Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4)
 a 25 °C a un caudal de 30 µl/min durante 120 s.

Para determinar la afinidad por el antígeno diana, se capturan anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas mediante un anticuerpo específico anti Fab humano (GE Healthcare) que se inmoviliza en una superficie de chip sensor CM5 activado como se describe para el anticuerpo anti Penta-His. La cantidad final de proteína acoplada es de aproximadamente 12000

5 UR. Los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas se capturan durante 90 s a 300 nM. Los antígenos diana se pasan a través de las celdas de flujo durante 180 s en un intervalo de concentración de 250 a 1000 nM con un caudal de 30 μ l/min. La disociación se supervisa durante 180 s.

Las diferencias del índice de refracción en bruto se corrigen restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. La respuesta de estado estacionario se usó para obtener la constante de disociación K_D mediante ajuste de curva no lineal de la isoterma de unión de Langmuir. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo sencillo de unión de Langmuir uno a uno (software de evaluación de BIACORE® T100 versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación.

15 La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Ensayos de actividad

La actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas (o anticuerpos) de la invención puede medirse mediante diversos ensayos como se describe en los Ejemplos. Las actividades biológicas pueden incluir, por ejemplo, la inducción de proliferación de linfocitos T, la inducción de señalización en linfocitos T, la inducción de expresión de marcadores de activación en linfocitos T, la inducción de secreción de citocinas por linfocitos T, la inducción de lisis de células diana, tales como células tumorales, y la inducción de regresión tumoral y/o la mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y vías de administración

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos posteriores. En una realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos o las moléculas de unión a

antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe posteriormente.

Se proporciona además un método para producir un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención en una forma adecuada para administración *in vivo*, comprendiendo el método (a) obtener un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica según la invención y (b) formular el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, mediante el cual se formula una preparación de anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica para administración *in vivo*.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica disuelta o dispersa en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que en general no son tóxicas para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, es
15 decir, no producen una reacción adversa, alérgica o negativa distinta cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea adecuado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica y opcionalmente un principio activo adicional será conocida por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's
20 Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporada por referencia en el presente documento. Por otra parte, para la administración a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deberían cumplir con las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según requiera la Oficina de Normas Biológicas de la FDA o las autoridades correspondientes en otros países. Son composiciones preferidas
25 formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, el "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retardo de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizadores de fármacos,
30 polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como conocería un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329, incorporado en el presente documento por referencia). Excepto en la medida en que cualquier
35 vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o intramusculares, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para su administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para la inyección, los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de su uso. Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados posteriormente, según sea necesario. Puede conseguirse fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido previamente esterilizado por filtración del mismo. El medio líquido debería tamponarse de manera adecuada si es necesario y el diluyente líquido se hará en primer lugar isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debería mantenerse al mínimo en un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso

molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener compuestos que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Los principios activos pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.^a Ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En realizaciones particulares, puede obtenerse absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retarden la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas anteriormente, los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas también pueden formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Pueden fabricarse composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención mediante procesos de mezcla, disolución, emulsión, encapsulación, inmovilización o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional usando uno o más
 5 vehículos, diluyentes, excipientes o adyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden formularse en una composición en una forma de ácido o base libre, neutra o de sal. Son sales farmacéuticamente
 10 aceptables sales que conservan sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácidos, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteica o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. También pueden obtenerse sales formadas con los grupos carboxilo libres
 15 a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes proteicos que las formas de base libre correspondientes.

20 **Métodos terapéuticos y composiciones**

Puede usarse cualquiera de los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento en métodos terapéuticos. Los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención pueden usarse como agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres.

25 Para su uso en métodos terapéuticos, los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de
 30 administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporcionan anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención para su uso en el tratamiento de
 35 una enfermedad. En determinadas realizaciones, se proporcionan anticuerpos o moléculas de

unión a antígeno biespecíficas de la invención para su uso en un método de tratamiento. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En determinadas realizaciones, la invención

5 proporciona un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica. En determinadas realizaciones, la enfermedad para tratar es un trastorno proliferativo. En una realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinadas

10 realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad para tratar es cáncer. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento para su uso en la inducción de la lisis de una célula diana, en particular

15 una célula tumoral. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica para su uso en un método para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones

20 anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método de

25 tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tenga la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinadas realizaciones, la enfermedad para tratar es un trastorno proliferativo. En una realización particular, la enfermedad es cáncer. En una realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico

30 adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad para tratar es cáncer. En una realización adicional, el medicamento es para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral. En otra realización más, el medicamento es para su uso en un método para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inducir la lisis

35 de una célula diana. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad. En

una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicha enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención. En una realización, se administra una composición a dicho individuo, que comprende el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la enfermedad para tratar es un trastorno proliferativo. En una realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinadas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad para tratar es cáncer. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral. En una realización, el método comprende poner en contacto una célula diana con un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención en presencia de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico. En un aspecto adicional, se proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo. En una de dichas realizaciones, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica para inducir la lisis de una célula diana. En una realización, un "individuo" es un ser humano.

En determinadas realizaciones, la enfermedad para tratar es un trastorno proliferativo, en particular cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer hematológico, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de hueso y cáncer de riñón. Otros trastornos de la proliferación celular que pueden tratarse usando un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, neoplasias localizadas en: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenal, paratiroides, hipófisis, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica y sistema urogenital. También se incluyen afecciones o lesiones precancerosas y metástasis del cáncer. En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de próstata. En una realización, el cáncer es cáncer de próstata. Un experto en la materia reconoce fácilmente que en muchos casos el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica puede no proporcionar una cura, pero puede proporcionar solo beneficio

parcial. En algunas realizaciones, también se considera terapéuticamente beneficioso un cambio fisiológico que tenga cierto beneficio. Por tanto, en algunas realizaciones, una cantidad de anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente
 5 o individuo que necesita tratamiento es normalmente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunas realizaciones, se administra a una célula una cantidad eficaz de un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención. En otras realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la
 10 invención se administra a un individuo para el tratamiento de la enfermedad.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada de un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención (cuando se usan solos o en combinación con otros uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad para tratar, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de
 15 anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica se administra con fines preventivos o terapéuticos, las intervenciones terapéuticas anteriores o simultáneas, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica y el criterio del médico tratante. El médico responsable de la administración, en
 20 cualquier caso, determinará la concentración de principio(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis adecuada(s) para el sujeto individual. Se contemplan en el presente documento diversos programas de dosificación incluyendo, pero sin limitación, administraciones individuales o múltiples en diversos puntos temporales, administración de embolada e infusión en pulsos.

El anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica se administra adecuadamente al
 25 paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria normal podría variar de
 30 aproximadamente 1 µg/g a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría en general hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica estaría en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a
 35 aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5

microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo que pueda obtenerse de los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo que puede obtenerse de los números enumerados en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente. Por tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo o la molécula de unión biespecífica). Puede administrarse una dosis de carga inicial mayor, seguida de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención se usarán en general en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. Para su uso en el tratamiento o la prevención de una patología, los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para administración sistémica, puede estimarse inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. Después puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluya la CI_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos.

Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos

animales, usando técnicas que se conocen bien en este campo. Un experto habitual en la materia podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en datos de animales.

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma de los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas que son
 5 suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones de paciente habituales para su administración mediante inyección varían entre 0,1 y 50 mg/kg/día, normalmente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Pueden lograrse niveles en plasma terapéuticamente eficaces administrando múltiples dosis cada día. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante HPLC.

- 10 En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden no estar relacionadas con la concentración en plasma. Un experto en la materia será capaz de optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación innecesaria.

- Una dosis terapéuticamente eficaz de los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno
 15 biespecíficas descritas en el presente documento proporcionará en general un beneficio terapéutico sin provocar toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivo celular o animales experimentales. Pueden usarse ensayos en cultivo celular y estudios en animales para determinar la DL_{50} (la
 20 dosis letal para el 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de una población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas que muestren índices terapéuticos elevados. En una realización, el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica según la presente
 25 invención muestra un índice terapéutico elevado. Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones adecuadas para su uso en seres humanos. La dosificación se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una diversidad
 30 de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, el estado del sujeto y similares. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, C. 1, p. 1, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad).

- 35 El médico tratante para pacientes tratados con anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención sabrá cómo y cuándo detener, interrumpir o ajustar la

administración debido a toxicidad, disfunción orgánica y similares. Por el contrario, el médico tratante también sabría cómo ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuera adecuada (evitando la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el control del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección para tratar, con la vía de administración y similares. La gravedad de la afección puede, por ejemplo, evaluarse, en parte, por medio de métodos de evaluación de pronóstico convencionales. Además, la dosis y quizá la frecuencia de dosis también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual.

10 Otros agentes y tratamientos

Los anticuerpos y la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención pueden administrarse en combinación con uno o más agentes adicionales en terapia. Por ejemplo, un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención pueden coadministrarse con al menos un agente terapéutico adicional. La expresión "agente terapéutico" abarca cualquier agente administrado para tratar un síntoma o una enfermedad en un individuo que necesite dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier principio activo adecuado para la indicación particular que se trate, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. En determinadas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular o un agente que aumenta la sensibilidad de las células a inductores de la apoptosis. En una realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente antineoplásico, por ejemplo, un disruptor de microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de la topoisomerasa, un intercalador de ADN, un agente alquilante, una terapia hormonal, un inhibidor de quinasa, un antagonista de receptor, un activador de la apoptosis de células tumorales o un agente antiangiogénico.

Dichos otros agentes están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o molécula de unión a antígeno biespecífica utilizada, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas se usan en general en las mismas dosis y con vías de administración como las descritas en el presente documento o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosis descritas en el presente documento o en cualquier dosis y por cualquier vía que se haya determinado de forma empírica/clínica como adecuada.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada

(donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma composición o en composiciones separadas) y administración por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención puede realizarse antes de, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Los anticuerpos o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención también pueden usarse en combinación con radioterapia.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección elegida. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo o una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección concreta. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

En determinadas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-STEAP-1 proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica.

El término "detectar" como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido, tal como tejido de próstata.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-STEAP-1 para usar en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de STEAP-1 en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-STEAP-1 como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-STEAP-1 a STEAP-1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-STEAP-1 y STEAP-1. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se usa un anticuerpo anti-STEAP-1 para seleccionar sujetos elegibles para la terapia con un anticuerpo anti-STEAP-1, por ejemplo, donde STEAP-1 es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen cáncer, en particular cáncer de próstata.

En determinadas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-STEAP-1 marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, electrón densos, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de los Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, junto con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Secuencias de aminoácidos

	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
STEAP-1 HCDR1	SDYAWN	1
STEAP-1 HCDR2	YISNSGSTSYNPSLKS	2
STEAP-1 HCDR3 (DD)	ERNYDY <u>DD</u> YYYAMDY	3
STEAP-1 HCDR3 (ED)	ERNYDY <u>ED</u> YYYAMDY	4
STEAP-1 HCDR3 (DE)	ERNYDY <u>DE</u> YYYAMDY	5
STEAP-1 HCDR3 (EE)	ERNYDY <u>EE</u> YYYAMDY	6
STEAP-1 LCDR1	KSSQSLLYRSNQKNYLA	7
STEAP-1 LCDR2	WASTRES	8
STEAP-1 LCDR3	QQYYNYPRT	9
STEAP-1 VH (DD)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPG KGLEWVG YISNSGSTSYNPSLKS SRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARERNYDY <u>DD</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSS	10
STEAP-1 VH (ED)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPG KGLEWVG YISNSGSTSYNPSLKS SRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRA	11

	EDTAVYYCARERNYDY <u>ED</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSS	
STEAP-1 VH (DE)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPG KGLEWVG YISNSGSTSYNPSLKS RFTISRDT SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARERNYDY <u>DE</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSS	12
STEAP-1 VH (EE)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPG KGLEWVG YISNSGSTSYNPSLKS RFTISRDT SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARERNYDY <u>EE</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSS	13
STEAP-1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYRSNQKNYLAWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFA TYYCQQY YNPRTFGQGTKVEIK	14
CD3 HCDR1	TYAMN	15
CD3 HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	16
CD3 HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY	17
CD3 LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN	18
CD3 LCDR2	GTNKRAP	19
CD3 LCDR3	ALWYSNLWV	20
CD3 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGK GLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	21
CD3 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPG QAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDAE YYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	22
hSTEAP-1	MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEDDYLHKDTGETSMLKRPVL LHLHQTAHADEFDCPSELQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYT LLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPMSITLLALVYLPGVIA	23

	AIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFAVLHAIYS LSYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVS LGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIH ALIFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIVVLIFKSILFLPCLR KKILKIRHGWEDVTKINKTEICSQL	
hCD3	MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGT TVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSDEDHLSLKEFS ELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMVMSV ATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRG QNKERPPVPNPDIYEPIRKGQRDLYSGLNQRR	24
cynoCD3	MQSGTRWRVLGLCLLSIGWVGQDGNEEMGSITQTPYQVSISGTT VILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYY VCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENCMEMDMMAVATIVIVDICI TLGLLLLVEYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPP VPNPDIYEPIRKGQQDLYSGLNQRR	25
Molécula A (STEAP-1 VH- CH1(EE)- Fc (botón, PGLALA))	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWRQAPG KGLEWVGYISNSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARERNYDY <u>DD</u> YYYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP	26
Molécula A (STEAP-1 VH- CH1(EE)- CD3 VL- CH1-Fc (botón, PGLALA))	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWRQAPG KGLEWVGYISNSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARERNYDY <u>DD</u> YYYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL	27

	TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP	
Molécula B (STEAP-1 VH- CH1(EE)- Fc (botón, PGLALA))	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPG KGLEWVGYISNSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARERNYDY <u>ED</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP	28
Molécula B (STEAP-1 VH- CH1(EE)- CD3 VL- CH1-Fc (botón, PGLALA))	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPG KGLEWVGYISNSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARERNYDY <u>ED</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWFVGGGTKLTVLSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP	29
Molécula C (STEAP-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPG KGLEWVGYISNSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRA	30

VH-CH1(EE)-Fc (botón, PGLALA))	EDTAVYYCARERNYDY <u>DE</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	
Molécula C (STEAP-1 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (botón, PGLALA))	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPGKGLEWVGYSISNSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERNYDY <u>DE</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	31
Molécula D (STEAP-1 VH-CH1(EE)-Fc (botón, PGLALA))	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPGKGLEWVGYSISNSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERNYDY <u>EE</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	32

Molécula D (STEAP-1 VH- CH1(EE)- CD3 VL- CH1-Fc (botón, PGLALA))	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWNWVRQAPG KGLEWVGYISNSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARERNYDY <u>EE</u> YYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD EKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP	33
Molécula A-D (STEAP-1 VL-CL (RK))	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYRSNQKNYLAWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQYYNYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGT ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	34
Molécula A-D (CD3 VH-CL)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGK GLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	35
Región Fc de hIgG1	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLSP	36
conector	GGGGSGGGGS	37

conector	DGGGGSGGGGS	38
Dominio CL kappa humano	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	39
Dominio CL lambda humano	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTPPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS	40
Región constante de cadena pesada de IgG1 humana (CH1-CH2- CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP	41

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas otras realizaciones, dada la descripción general
5 proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1

Generación de construcciones y herramientas

Técnicas de ADN recombinante

10 Se usaron métodos convencionales para manipular el ADN como se describe en Sambrook *et al.*, J. *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos moleculares biológicos se usaron según las instrucciones del fabricante.

Se proporciona información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de cadenas
15 ligeras y pesadas de inmunoglobulina humana en: Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda,

MD (1991).

Síntesis génica

Los segmentos genéticos deseados, cuando fue necesario, se generaron bien mediante PCR
5 usando moldes adecuados o se sintetizaron en Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de
oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automática. Los
segmentos génicos flaqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singulares
se clonaron en vectores de clonación/secuenciación convencionales. El ADN plasmídico se
purificó a partir de bacterias transformadas y se determinó la concentración mediante
10 espectroscopia UV. La secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmó
mediante secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción
adecuados para permitir la subclonación en los vectores de expresión respectivos. Todas las
construcciones se diseñaron con una secuencia de ADN en el extremo 5' que codificaba un
péptido líder que se dirige a proteínas para su secreción en células eucariotas.

Secuenciación de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria.

Clonación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-STEAP1/anti-CD3

20 Los dominios variables de vandortuzumab se utilizaron para la generación de diversas variantes
de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) específicos de STEAP1. Para la generación
de los plásmidos de expresión respectivos, las secuencias de región variable de vandortuzumab
(SEQ ID NO 10 y 14) o variantes de las mismas se usaron y subclonaron en fase con las regiones
constantes respectivas que se insertan previamente en el vector de expresión de mamífero
25 receptor respectivo. Se muestra una ilustración esquemática de las moléculas resultantes en la
Figura 2.

Preparación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) anti-STEAP1/anti-CD3

Se prepararon las siguientes moléculas, se proporciona una ilustración esquemática de las
30 mismas en la **Figura 2:**

A. Molécula A: 2+1 IgG CrossFab "invertido" (agente de unión CD3 C-terminal del agente

de unión STEAP1), con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en agente de unión CD3, modificación de carga en el agente de unión STEAP1) (SEQ ID NO 26, 27, 34 y 35)

B. Molécula B: 2+1 IgG CrossFab "invertido" (agente de unión CD3 C-terminal del agente de unión STEAP1), con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en agente de unión CD3, modificación de carga en el agente de unión STEAP1; Mutación **D100aE** en ambos restos de unión STEAP1) (SEQ ID NO 28, 29, 34 y 35)

C. Molécula C: 2+1 IgG CrossFab "invertido" (agente de unión CD3 C-terminal del agente de unión STEAP1), con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en agente de unión CD3, modificación de carga en el agente de unión STEAP1; Mutación **D100bE** en ambos restos de unión STEAP1) (SEQ ID NO 30, 31, 34 y 35)

D. Molécula D: 2+1 IgG CrossFab "invertido" (agente de unión CD3 C-terminal del agente de unión STEAP1), con modificaciones de carga (intercambio VH/VL en agente de unión CD3, modificación de carga en el agente de unión STEAP1; Mutaciones **D100aE/D100bE** en ambos restos de unión STEAP1) (SEQ ID NO 32, 33, 34 y 35)

La expresión de las moléculas mencionadas anteriormente fue conducida por un promotor MPSV quimérico o un promotor CMV. La poliadenilación fue conducida por una secuencia señal de poliA sintética localizada en el extremo 3' del CDS. Además, cada vector contenía una secuencia OriP de VEB para replicación autosómica.

Para la producción de todas las construcciones, se cotransfectaron células HEK293-EBNA que crecían en suspensión con los respectivos vectores de expresión usando polietilenimina como reactivo de transfección. Como tales, para la producción de todas las construcciones "2+1 IgG CrossFab", los vectores de expresión correspondientes se cotransfectaron en una relación 1:2:1:1 ("cadena pesada del vector (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)": "cadena ligera del vector (VL-CL)": "cadena pesada del vector (VH-CH1-CH2-CH3)": "cadena ligera del vector (VH-CL)").

Se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión en medio de cultivo Excell sin suero que contenía L-Glutamina 6 mM y G418 250 mg/l. Para la producción en matraces tubospin de 600 ml (volumen máximo de trabajo 400 ml), se sembraron 600 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Antes de la transfección, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 210 x g y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 400 µg de ADN. Después de la adición de 1080 µl de solución de PEI (2,7 µg/ml), el medio se agitó vorticialmente durante 15 segundos y posteriormente se incubó

durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz Tubespin de 600 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. Después de esta etapa de incubación, se añadieron 360 ml de medio Excell que contenía L-glutamina 6 mM, Pepsoy 5 g/l y VPA 1,0 mM y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añade 7 % de alimento 7. Después de 7 días de cultivo, se recogió el sobrenadante para purificación por centrifugación durante 20 - 30 min a 3600 x g (centrífuga Sigma 8K), la solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añadió azida sódica a una concentración final de 0,01 % p/v y se mantuvo a 4 °C.

10 Todas las moléculas se purificaron de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad de proteína A, seguida de una etapa cromatográfica de exclusión por tamaños. Para la cromatografía de afinidad, el sobrenadante se cargó en una columna HP de proteína A HiTrap (VC=5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 25 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína no unida se retiró mediante lavado con al menos 15 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína diana se eluyó en 6 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. La solución de proteína se neutralizó añadiendo 1/10 de volumen de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. Para análisis en proceso después de la cromatografía de proteína A, se analizó la pureza y el peso molecular de las moléculas en las fracciones 20 individuales mediante SDS-PAGE en ausencia de un agente reductor y se tiñó con Coomassie (InstantBlue™ de Expedeon). El sistema de gel prefabricado NuPAGE® (Bis-Tris 4-12 %, Invitrogen, Estados Unidos) Se utilizó según las instrucciones del fabricante. Las fracciones seleccionadas de la proteína diana se concentraron y filtraron antes de cargarlas en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0, Tween20 al 0,01 %. 25

La concentración de proteína de las muestras de proteína purificada se determinó por la densidad óptica (DO) a 280 nm usando el coeficiente de extinción molar que se calculó basándose en la secuencia de aminoácidos. Además, se realizó análisis de espectrometría de masas de todas las moléculas para confirmar su identidad.

30

Generación de una línea celular CHO-K1 que expresa STEAP1

Se subclonó un gen que codificaba STEAP1 humano de longitud completa en un vector de expresión de mamífero. El plásmido se transfectó en células CHO-K1 (ATCC CRL-9618) usando el reactivo Lipofectamine LTX según el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º 15338100). Las células CHO positivas para STEAP1 transfectadas de forma estable se 35

mantuvieron en medio DMEM/F-12 (Gibco, n.º 11320033) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco, n.º 16140063) y complemento de GlutaMAX al 1 % (Gibco; n.º 31331-028). Dos días después de la transfección, se añadió puromicina (Invivogen; n.º ant-pr-1) a 6 µg/ml y las células se cultivaron durante varios pases. Después de la selección inicial, las células con la mayor expresión de STEAP1 en superficie celular se clasificaron mediante un clasificador celular BD FACSAria II (BD Biosciences) y se cultivaron para establecer clones celulares estables. El nivel de expresión y la estabilidad se confirmaron mediante análisis FACS usando vandortuzumab e IgG anti-humano de cabra específico de gamma Fc conjugado con PerCP (Jackson ImmunoResearch, n.º 109-126-097) como anticuerpo secundario durante un periodo de 4 semanas.

Ejemplo 2

Generación y caracterización de variantes de secuencia basadas en vandortuzumab

Análisis de secuencia de vandortuzumab

Modificaciones como la desamidación de asparagina, isomerización de aspartato, formación de succinimida y oxidación de triptófano son degradaciones típicas de los anticuerpos recombinantes y pueden afectar tanto a la estabilidad *in vitro* como a las funciones biológicas *in vivo*. Se realizó un análisis computacional de las secuencias de CDR de vandortuzumab (SEQ ID NO 1, 2, 3, 7, 8 y 9, según Kabat) para detectar la presencia de posibles patrones de secuencia de aminoácidos que son propensos a la isomerización del aspartato, desamidación de la asparagina o formación de succinimida. Asimismo, se analizaron las regiones CDR para detectar la presencia de triptófanos que tienen el potencial de oxidarse. Como se muestra en la **Figura 3**, el análisis de las secuencias de vandortuzumab reveló puntos críticos potenciales en las regiones CDR de los dominios variables de cadenas tanto pesadas como ligeras.

Generación de variantes de la secuencia de vandortuzumab (Moléculas B-D)

Para preparar un anticuerpo anti-STEAP1 con formación mínima de iso-aspartato y succinimida y estabilidad óptima, se generaron varias variantes de la secuencia de vandortuzumab con una secuencia de HCDR3 modificada. En particular, los restos de aspartato en las posiciones 100a y 100b (numeración de Kabat) fueron reemplazados por glutamato, ya sea individualmente o en combinación (SEQ ID NO 4, 5 y 6) y los plásmidos resultantes (SEQ ID NO 28, 29, 34 y 35 (mutación D100aE, molécula B); SEQ ID NO 30, 31, 34 y 35 (mutación D100bE, molécula C); SEQ ID NO 32-35 (mutaciones D100aE/D100bE, molécula D)) se generaron para la expresión de las moléculas de anticuerpo TCB respectivas.

Prueba de degradación química

Para confirmar que las mutaciones introducidas eliminan el punto caliente predicho en HCDR3, aumentan la estabilidad y evitan la pérdida de potencia de unión de los anticuerpos anti-STEAP1, todas las construcciones (Moléculas A-D) se dividieron en dos alícuotas, se volvieron a
 5 tamponar en His/HisCl 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 o en PBS, pH 7,4, respectivamente, y se incubaron a 40 °C (His/NaCl) o 37 °C (PBS). Además, una muestra de control se almacenó a -80 °C. La incubación a pH 7,4 refleja la exposición de la molécula a la situación en el plasma sanguíneo y permite sacar conclusiones acerca de la estabilidad de la molécula *in vivo*. Por el contrario, las formulaciones de tampones con pH reducido (aquí pH 6) son más adecuadas para
 10 el almacenamiento a largo plazo de construcciones basadas en anticuerpos y las pruebas de tensión en estas condiciones son predictivas de la vida útil de una molécula.

Después de un periodo de incubación de 28 días, Las muestras se analizaron y se compararon para determinar la potencia de unión (concentración activa relativa) de los restos de unión a STEAP1. Este análisis se realizó indirectamente mediante espectrometría de masas y un ELISA
 15 basado en células.

Caracterización de la molécula A-D en tensión por espectrometría de masas

Para identificar la degradación de proteína inducida por tensión en las posiciones predichas dentro de las CDR de vandortuzumab y variantes del mismo, se realizó espectrometría de masas
 20 de moléculas A-D. Se desnaturalizaron 80 µg de muestras de proteínas de referencia y en tensión y se redujeron durante 1 h en 124,5 µl de Tris 100 mM, clorhidrato de guanidinio 5,6 M, TCEP 10 mM (tris(2-carboxietil)fosfina (Pierce Protein Biology Products), pH 6,0 a 37 °C. El tampón se cambió por cloruro de histidina 20 mM, TCEP 0,5 mM, pH 6,0 en columnas desaladoras Zeba Spin de 0,5 ml (Pierce Protein Biology Products). Las muestras de proteínas se digirieron
 25 durante una noche a 37 °C después de la adición de 0,05 µg de tripsina (Promega) por µg de proteína en un volumen final de 140 µl. La digestión se detuvo mediante la adición de 7 µl de solución de ácido fórmico (FA) al 10 %.

Las muestras digeridas se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El análisis se realizó mediante UHPLC-MS/MS usando una UPLC nanoAcquity (Waters) y un espectrómetro de masas
 30 Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific). Se inyectaron aproximadamente 2,4 µg de proteína de fusión digerida en 5 µl. Se realizó separación cromatográfica por fase inversa en una columna Acquity BEH300 C18, 1x 150 mm, 1,7 µm, 300 Å (Waters) usando un caudal de 60 µl/min. La fase móvil A y B contenía ácido fórmico al 0,1 % (v/v) en agua de calidad UPLC y acetonitrilo, respectivamente. Se usó una temperatura de columna de 50 °C y se aplicó un gradiente de 1 %
 35 a 40 % de fase móvil B durante 90 minutos. El Orbitrap Fusion se usó en el modo dependiente

de datos. Los ajustes esenciales de MS fueron: ionización (tensión de pulverización: 3,6 kV, tubo de transferencia de iones: 250 °C, vaporizador: 100 °C), MS completa (AGC: 2 × 105, resolución: 12 × 104, intervalo m/z: 300-2000, tiempo máximo de inyección: 100 ms); MS/MS (AGC: 1 × 104, tiempo máximo de inyección: 100 ms, anchura de aislamiento: 2 Da). La energía de colisión normalizada se estableció en 35 %.

Se aplicó mapeo de péptidos para cuantificar los niveles de desamidación, isomerización y oxidación de los puntos calientes predichos (N53 (HCDR2), N97 (HCDR3), D100a (HCDR3) y W50 (LCDR2) (numeración de Kabat)) para moléculas A-D.

En los péptidos que albergaban la región HCDR3, no se detectó desamidación ni formación de succinimida en la posición N97 en ninguna de las moléculas A-D, en cualquier condición (datos no mostrados). Sin embargo, la exposición a tensión a pH 6 dio como resultado diferentes niveles de degradación del aspartato en el mismo péptido HCDR3 que también alberga el aspartato de punto caliente predicho 100a. Se detectaron diferentes niveles de formación de succinimida e iso-aspartato después de 4 semanas en His/NaCl pH 6,0 a 40 °C en los péptidos trípticos respectivos de las cuatro moléculas ensayadas (**Tabla 1**). Después de la exposición a tensión a pH 6,0, los mayores niveles totales se detectaron en la molécula A. La introducción de la mutación de D100a→E100a en la molécula B y D100b→E100b en la molécula C conduce a disminuciones significativas del nivel de succinimida. Sin embargo, la combinación de ambas mutaciones (D100aE/D100bE) (molécula D) redujo fuertemente los niveles de succinimida al 3 %, una cantidad insignificante para este largo periodo de exposición a tensión. Asimismo, no se detectó iso-aspartato en la molécula D. Los resultados indican que tanto los aspartatos (D100a y D100b) en la molécula A como cualquiera de los aspartatos (D100a o D100b) en las moléculas C o B contribuyen a los niveles totales de succinimida e isoaspartato encontrados después de la tensión. Además, no se detectó degradación de proteínas en absoluto en HCDR3 de la molécula D después de la exposición a tensión a pH 7,4, lo que confirma la integridad de esta variante de secuencia de nuevo diseño.

Tabla 1. Cuantificación relativa de la degradación de proteínas en HCDR3.

Muestra	Péptido tríptico con mutaciones indicadas*	4 semanas en His/NaCl pH 6,0 a 40 °C		4 semanas en PBS pH 7,4 a 37 °C		His/NaCl pH 6,0 control	
		iso-aspartato [%]	succinimida [%]	iso-aspartato [%]	succinimida [%]	iso-aspartato [%]	succinimida [%]
Molécula A	ERNYDYDDYYYAMDYWGQGLVTVSSASTK	1,4	12,7	no detectado	5,3	no detectado.	4,2
Molécula B	ERNYDYE ^E DYYYAMDYWGQGLVTVSSASTK	5,3	5,0	2,7	0,9	2,8	1,1
Molécula C	ERNYDYE ^E EYYYAMDYWGQGLVTVSSASTK	1,2	6,2	0,8	1,3	0,04	1,5

Molécula D	ERNYDY EE YYYAMDYWGQGLTVSSASTK	no detectado	3,0	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
---------------	---------------------------------------	-----------------	-----	-----------------	--------------	-----------------	--------------

*Posiciones mutadas en negrita y subrayadas

El análisis del péptido que alberga la posición N53 en la cadena pesada (HCDR2) del agente de unión STEAP1 reveló en todas las construcciones un pequeño aumento de la desamidación de N53 después de 4 semanas en PBS, pH 7,4 a 37 °C, mientras que no se detectó un aumento significativo a pH 6 (**Tabla 2**). La oxidación de W50 (LCDR2) fue inferior al 2 % para todas las muestras (**Tabla 3**). En consecuencia, no se realizaron optimizaciones de moléculas con respecto a estos puntos calientes potenciales.

Tabla 2. Cuantificación relativa de la degradación de proteínas en la posición N53 (HCDR2).

Muestra	Péptido tríptico*	Desamidación (%)		
		pH 7,4, 37 °C	pH 6, 40 °C	Sin tensión
Molécula A	GLEWVG <u>YISN</u> SGSTSYNPSLK	3,4	1,3	1,2
Molécula B	GLEWVG <u>YISN</u> SGSTSYNPSLK	3,7	1,6	1,2
Molécula C	GLEWVG <u>YISN</u> SGSTSYNPSLK	3,2	1,5	1,2
Molécula D	GLEWVG <u>YISN</u> SGSTSYNPSLK	3,3	1,5	1,4

10 *Posición del punto caliente previsto N53 en negrita y subrayada

Tabla 3. Cuantificación relativa de la degradación de proteínas en la posición W50 (LCDR2).

Muestra	Péptido tríptico*	Productos de oxidación [%]
Molécula A	LLIY <u>W</u> ASTR	1,7
Molécula B	LLIY <u>W</u> ASTR	1,2
Molécula C	LLIY <u>W</u> ASTR	0,7
Molécula D	LLIY <u>W</u> ASTR	1,0

*Posición del punto caliente previsto W50 en negrita y subrayada

Caracterización de la potencia de unión después de la tensión utilizando un ELISA basado en células

Para cuantificar la reducción de la potencia de unión causada por tensión de 1-4 semanas a pH 7,4 o 6,0, se empleó un ELISA basado en células utilizando células CHO-K1 que expresan de forma estable STEAP1 humano. Para este ELISA basado en células, se sembraron 10.000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 18 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

El sobrenadante se retiró usando una lavadora automática (BIOTEK) y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una serie de diluciones (10 pM - 30 nM) de construcciones de anticuerpos en medio de cultivo. Después de 1 h de incubación a 4 °C, se vaciaron los pocillos y se añadieron 100 µl de glutaraldehído al 0,05 % en PBS durante 10 minutos a TA. Después de 4 lavados con PBS/Tween20 al 0,025 % (PBST), se añadieron 100 µl de anti-IgG humana-HRP (Jackson) diluido 1:20000 en tampón de bloqueo (Roche) y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Los pocillos se lavaron 6 veces con PBST y se generó señal utilizando 100 µl de TMB por pocillo, la reacción se detuvo después de 10 minutos con 50 µl de HCl 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Los datos (**Tabla 4**) se expresaron como "% de unión", dividiendo la CE50 de unión de la muestra en tensión por la de la muestra no tratada multiplicada por 100.

Dado que todos los anticuerpos TCB probados comprenden dos restos de unión a STEAP1 por molécula y teniendo en cuenta que la afinidad de unión monovalente por STEAP1 está en el intervalo de 40-60 nM, es concebible que solo puedan detectarse en este ELISA moléculas con dos restos de unión a STEAP1 funcionales. Por el contrario, se supone que las moléculas con

5

solo un resto de unión a STEAP1 funcional se retiran por lavado durante las etapas de lavado descritas en este protocolo. Por lo tanto, el porcentaje acumulado de pérdida de unión para las moléculas con niveles elevados de succinimida es mayor que la degradación de proteínas detectada en HCDR3 (Moléculas A-C).

Tabla 4. Cuantificación de la potencia de unión a proteínas a STEAP1 después de 28 días a 40 °C, pH 6.

sonda	Potencia de unión relativa (%) (después de 28 días a 40 °C, pH 6)
Molécula A	66
Molécula B	79
Molécula C	69
Molécula D	100

10 **Caracterización bioquímica de las variantes de anticuerpos TCB a base de vandortuzumab (moléculas A-D)**

Para caracterizar y comparar sus propiedades bioquímicas y biofísicas, todos los TCB con nuevas variantes de secuencia de anticuerpos anti-STEAP-1 (moléculas B-D) se analizaron y compararon con el anticuerpo TCB que alberga la secuencia de vandortuzumab (molécula A). Los resultados se resumen en la **Tabla 5**:

15

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

La hidrofobicidad aparente se determinó inyectando 20 µg de muestra en una columna HIC-Eter-5PW (Tosoh) equilibrada con fosfato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 7,0. Se realizó elución con un gradiente lineal de 0 a 100 % de tampón B (fosfato de sodio 25 mM, pH 7,0) en 60 minutos. Los tiempos de retención se compararon con los patrones proteicos con hidrofobicidad conocida.

20

Estabilidad térmica

Las muestras se preparan a una concentración de 1 mg/ml en histidina/clorhidrato de histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, se transfirieron a una placa óptica de 384 pocillos mediante centrifugación a través de una placa de filtro de 0,4 μ m y se cubrieron con aceite de parafina. El
 5 radio hidrodinámico se mide repetidamente mediante dispersión de luz dinámica en un lector de placas DynaPro (Wyatt) mientras que las muestras se calientan a una velocidad de 0,05 °C/min de 25 °C a 80 °C.

Cromatografía de afinidad de FcRn

10 FcRn se expresó, se purificó y se biotiniló como se ha descrito (Schlothauer *et al.*, MAbs (2013) 5 (4), 576-86). Para acoplamiento, el receptor preparado se añadió a estreptavidina-sepharose (GE Healthcare). La matriz resultante de FcRn-sepharose se empaquetó en una carcasa de columna. La columna se equilibró con ácido 2-(N-morfolina)-etanosulfónico (MES) 20 mM, NaCl 140 mM, pH 5,5 (eluyente A) a un caudal de 0,5 ml/min. Se diluyeron 30 μ g de muestras
 15 de anticuerpos en una relación en volumen de 1:1 con eluyente A y se aplicaron a la columna de FcRn. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de eluyente A seguido de elución con un gradiente lineal de 20 a 100 % de Tris/HCl 20 mM, NaCl 140 mM, pH 8,8 (eluyente B) en 35 volúmenes de columna. El análisis se realizó con un horno de columna a 25 °C. El perfil de elución se controló mediante medición continua de la absorbancia a 280 nm. Los tiempos de
 20 retención se compararon con patrones de proteínas con afinidades conocidas.

Cromatografía de afinidad de heparina

La afinidad de heparina se determinó inyectando 30-50 μ g de muestra en una columna TSKgel Heparina-5PW (Tosoh) equilibrada con Tris 50 mM, pH 7,4. Se realizó elución con un gradiente
 25 lineal de 0 a 100 % de tampón B (Tris 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,4 mM) en 37 minutos. Los tiempos de retención se compararon con patrones de proteínas con afinidades conocidas.

No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los TCB ensayado con nuevas variantes de secuencia de anticuerpos anti-STEAP-1 (Moléculas B-D) y la molécula que alberga la secuencia de vandortuzumab (molécula A) con respecto a todas las propiedades biofísicas y
 30 bioquímicas ensayadas (**Tabla 5**). Todas las muestras mostraron solo agregación marginal y fragmentación ante tensión, lo que apoya que las pérdidas de actividad observadas después de la exposición a la tensión a pH 6 (moléculas A-C) se deben a la degradación química de proteínas en las posiciones identificadas en la región HCDR3.

Tabla 5. Propiedades biofísicas y bioquímicas de variantes ensayadas.

Muestra	Estabilidad térmica (°C)	Hidrofobicidad aparente	Afinidad de FcRn	Afinidad de heparina
Molécula A	58	0,10	0,61	0,85
Molécula B	58	0,16	0,69	0,85
Molécula C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Molécula D	58	0,11	0,65	0,85

n.d.: no determinado

Ejemplo 3

5 Caracterización funcional de variantes de anticuerpos TCB de STEAP-1

Lisis tumoral mediada por linfocitos T, inducido por variantes de anticuerpos TCB de STEAP-1

La destrucción de linfocitos T mediada por diferentes variantes de anticuerpos TCB de STEAP-1 (moléculas A-D) se evaluó en células LnCAP que expresan STEAP-1. Se usaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como células efectoras y se detectó la destrucción a las 24 h y 48 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. Se recogieron células diana adherentes con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron en placas a una densidad de 30 000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Las células se dejaron adherir durante una noche. Se prepararon PBMC mediante centrifugación por densidad Histopaque de preparaciones de linfocitos enriquecidos de sangre heparinizada obtenida de donantes humanos sanos. Se diluyó sangre fresca con PBS estéril y se colocó en capas sobre gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma encima de la interfase que contiene PBMC se descartó y las PBMC se transfirieron a un nuevo tubo falcon que posteriormente se llenó con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), el sobrenadante se desechó y el sedimento de PBMC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS 10 % y L-alanil-L-glutamina 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, de CO₂ al 5 % en la incubadora celular hasta su uso posterior (no más de 24 h).

Para el ensayo de destrucción, los anticuerpos se añadieron a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 1 nM por triplicado. Se añadieron PBMC a células diana para obtener una relación de E:T final de 10:1. La destrucción de células diana se evaluó después de 24 h y 48 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % por cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica. Los resultados después de 24 h (**Figura 4A**) y 48 h (**Figura 4B**) muestran que la lisis tumoral mediada por linfocitos T es inducida de manera similar por las moléculas ensayadas y que la modificación del agente de unión de STEAP-1 en moléculas B-D no afecta negativamente a la potencia de destrucción de las moléculas.

Activación de linfocitos T inducida por las variantes de anticuerpos TCB de STEAP-1 (ensayo de activación de Jurkat-NFAT)

La capacidad de las variantes de anticuerpos TCB de STEAP-1 para inducir la activación mediada por CD3 de células efectoras tras la unión simultánea a CD3 y STEAP-1 humano en células, se evaluó usando cocultivos de células diana positivas para antígeno tumoral (LnCAP, 22RV1) y células indicadoras Jurkat-NFAT (una línea celular indicadora de leucemia linfática aguda humana que expresa CD3 con un promotor NFAT; GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega n.º CS176501). Tras la unión simultánea de la molécula TCB al antígeno STEAP-1 (expresado en células diana) y al antígeno CD3 (expresado en células indicadoras Jurkat-NFAT), el promotor NFAT se activa y conduce a la expresión de luciferasa de luciérnaga activa. La intensidad de la señal de luminiscencia (obtenida tras la adición del sustrato de luciferasa) es proporcional a la intensidad de la activación y señalización de CD3.

Para el ensayo, se recogieron células tumorales humanas y se determinó la viabilidad usando ViCell. Se sembraron 20 000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con paredes blancas de fondo plano (n.º 655098, greiner bio-one) y se añadieron anticuerpos diluidos o medio (para controles) (intervalo de 2,6 pM - 200 nM).

Posteriormente, se recogieron células indicadoras Jurkat-NFAT y se evaluó la viabilidad usando ViCell. Las células se resuspendieron en medio de cultivo celular y se añadieron a células tumorales para obtener una relación final de efector con respecto a diana (E:T) de 5:1 y un volumen final de 100 µl por pocillo. Las células se incubaron durante 6 h a 37 °C en una incubadora humidificada. Al final del tiempo de incubación, se añadieron 100 µl/pocillo de solución ONE-Glo (Promega; 1:1 ONE-Glo y volumen medio de ensayo por pocillo) a los

pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La luminiscencia se detectó utilizando el lector de ELISA WALLAC Victor3 (PerkinElmer2030), 5 s/pocillo como tiempo de detección.

Como se muestra en la **Figura 5**, todas las moléculas de anticuerpo TCB de STEAP-1 evaluadas inducen la reticulación de linfocitos T a través de CD3 y posteriormente la activación de linfocitos T en células LnCAP que expresan STEAP1 (**Figura 5A**) y 22Rv1 (**Figura 5B**). En las células CHO-K1 negativas para STEAP1 (**Figura 5C**) no se puede observar activación de linfocitos T.

10 Unión de variantes de anticuerpos TCB de STEAP-1 a células que expresan STEAP-1 y CD3

Se ensayó la unión de variantes de anticuerpos TCB de STEAP-1 (moléculas A-D), usando células CHO-hSTEAP1 que expresaban STEAP-1 (una línea celular epitelial procedente del ovario de hámster que se transfectó para sobreexpresar de manera estable STEAP-1 humano) y células indicadoras Jurkat-NFAT que expresaban CD3 (Promega n.º CS176501).

En resumen, se recogieron células CHO-hSTEAP1 adherentes, usando el tampón de disociación celular (Gibco, n.º 13151014), se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS BSA al 0,1 %). También se recogieron células en suspensión de Jurkat, se contaron y se comprobó su viabilidad. Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía $0,2 \times 10^6$ células) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones crecientes de los anticuerpos TCB de STEAP-1 (31 pM - 1000 nM), se lavaron dos veces con PBS frío que contenía BSA al 0,1 % (tampón FACS), se volvieron a incubiar durante 30 min más a 4 °C con el anticuerpo secundario de cabra específico de fragmento Fcγ de IgG de ser humano fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con Alexa Fluor 647 previamente diluido 1:50 (Jackson Immuno Research Lab, Alexa Fluor 647 n.º 109-606-008, diluciones en tampón FACS) y se lavaron dos veces con PBS frío BSA al 0,1 %.

Las células teñidas se resuspendieron en 100 µL de tampón FACS que contiene paraformaldehído al 2 % y se incubó durante 30 min a 4 °C para fijar la tinción. Por último, las células se centrifugaron durante 4 min a 350 x g y 4 °C, los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos celulares se resuspendieron en 200 µl de tampón de FACS. La tinción se analizó mediante FACS usando un FACS Canto II (Software FACS Diva). Se obtuvieron curvas de unión usando GraphPadPrism6 (**Figura 6A**, unión a células CHO-hSTEAP1; **Figura 6B**, unión a células Jurkat).

Como se muestra en la **Figura 6**, todas las moléculas de anticuerpos TCB de STEAP-1 evaluados muestran unión dependiente de la concentración a células CHO humanas que expresan STEAP-1 humano (**Figura 6A**) y a CD3 humano expresado en células Jurkat NFAT (**Figura 6B**), lo que indica que la modificación del agente de unión de STEAP-1 en moléculas

5 B-D no afecta negativamente a su unión a STEAP-1 en las células.

* * *

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, no debe interpretarse que las descripciones y

10 ejemplos limiten el alcance de la invención. Las divulgaciones de toda la bibliografía científica y de patentes citadas en el presente documento se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.