

POLIPÉPTIDOS QUE COMPRENDEN DOMINIOS VARIABLES ÚNICOS DE INMUNOGLOBULINA DIRIGIDOS A TNF α Y OX40L

DESCRIPCIÓN

1 Campo de la presente tecnología

La presente tecnología se refiere a polipéptidos dirigidos a TNF α y OX40L. También se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido y vectores que comprenden los ácidos nucleicos, y a composiciones que comprenden el polipéptido, el ácido nucleico o el vector. La presente tecnología se refiere además a estos productos para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. Además, la presente tecnología se refiere al método de producción de estos productos.

2 Antecedentes tecnológicos

Las enfermedades autoinmunes o inflamatorias son el resultado de una respuesta inmunológica producida por un cuerpo contra su propio tejido. Las enfermedades autoinmunes o inflamatorias suelen ser crónicas e incluso pueden poner en peligro la vida. Las enfermedades autoinmunes o inflamatorias incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa. La enfermedad intestinal inflamatoria, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, es una enfermedad inflamatoria crónica que implica inflamación intestinal y lesión epitelial concomitante. Otras enfermedades autoinmunes crónicas, como la psoriasis, la artritis psoriásica y la hidradenitis supurativa, se caracterizan por manchas de piel enrojecida, seca, con picor o escamosa, inflamación dolorosa de las articulaciones o bultos inflamados e hinchados en la piel. Se ha descubierto que los pacientes que padecen psoriasis tienen más probabilidades de tener ciertas comorbilidades, como diabetes y enfermedad intestinal inflamatoria, como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, y cáncer.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citoquina homotrimérica que es producida principalmente por monocitos y macrófagos, pero también se sabe que es secretada por

linfocitos T de sangre periférica CD4 + y CD8 +. El TNF α puede existir como forma soluble o como proteína transmembrana. El papel principal del TNF α es la regulación de las células inmunes. El TNF α actúa como un pirógeno endógeno y la desregulación de su producción se ha implicado en una variedad de enfermedades humanas que incluyen artritis reumatoide (AR), psoriasis (Pso), hidradenitis supurativa (HS), enfermedad intestinal inflamatoria (EII) como la enfermedad de Crohn (EC).) y colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Los tratamientos actualmente aprobados por la FDA para la AR y la EII incluyen productos biológicos anti-TNF α (como Simponi® [golimumab], Enbrel® [etanercept], Remicade® [infliximab] y Humira® [adalimumab]). Sin embargo, los tratamientos anti-TNF α actuales para la AR solo muestran una remisión completa de la enfermedad en una minoría de pacientes y todavía queda una porción sustancial de los que no responden. De manera similar, los tratamientos anti-TNF α actuales para la enfermedad intestinal inflamatoria se enfrentan a un gran porcentaje de pacientes que no responden a los tratamientos disponibles actualmente, y ocurre la pérdida de respuesta al tratamiento anti-TNF α en un alto porcentaje de pacientes después de 12 meses de tratamiento. Para la psoriasis y la artritis psoriásica, solo una minoría de pacientes se trata con productos biológicos que incluyen Remicade® [infliximab] y Humira® [adalimumab]. Se ha demostrado que los tratamientos actuales son eficaces para algunos tratamientos de la psoriasis, al menos en un subconjunto de pacientes.

Así, para enfermedades autoinmunes como p. ej. la artritis reumatoide o la artritis psoriásica hasta ahora ningún producto biológico ha mostrado suficiente eficacia con respecto a la remisión de la enfermedad en un porcentaje significativo de pacientes y la falta o pérdida de respuesta sigue siendo un problema.

OX40L (también conocido como CD252 o TNFSF4) es un miembro de la superfamilia TNF y es el ligando coestimulador inducible para el receptor de OX40 (también conocido como CD134 o TNFRSF4). Se expresa principalmente en células presentadoras de antígenos (APC) activadas, incluidas células dendríticas, macrófagos y células B. OX40, por otro lado, se expresa en gran medida en células T activadas y células T asesinas naturales. OX40L se expresa principalmente como una molécula unida a la membrana, pero también se puede detectar en una forma

soluble escindida. OX40L/OX40 ha sido reconocido como un regulador coestimulador inmunológico en una serie de enfermedades que se caracterizan por células T activadas que orquestan la respuesta inmunitaria. Activa la señalización a través de OX40, lo que da como resultado una variedad de actividades que incluyen la producción y liberación de citoquinas inflamatorias, la expansión y acumulación de células T efectoras (p. ej., TH1, TH2, TH17) y células T citotóxicas, así como la disminución de la eficacia supresora de las células Treg. Aunque varios estudios sugieren una implicación del eje coestimulador OX40L/OX40 en enfermedades autoinmunes como la AR, la Pso o la EII, actualmente no existe ningún producto biológico OX-40L aprobado por la FDA para su tratamiento.

El direccionamiento de múltiples factores de enfermedad puede lograrse, por ejemplo, mediante la coadministración o el uso combinatorio de dos productos biológicos separados, p. ej. anticuerpos que se unen a diferentes dianas terapéuticas. Sin embargo, la coadministración o el uso combinatorio de productos biológicos separados puede ser un desafío, tanto desde un punto de vista práctico como comercial. Por ejemplo, dos inyecciones de productos separados dan como resultado un régimen de tratamiento más inconveniente y más doloroso para los pacientes, lo que puede afectar negativamente al cumplimiento. Con respecto a una sola inyección de dos productos separados, puede ser difícil o imposible proporcionar formulaciones que permitan una viscosidad aceptable a las concentraciones requeridas y una estabilidad adecuada de ambos productos. Además, la coadministración y la co-formulación requieren la producción de dos medicamentos separados que pueden aumentar los costos generales.

Se han sugerido anticuerpos biespecíficos que pueden unirse a dos antígenos diferentes como una estrategia para abordar las limitaciones asociadas con la coadministración o el uso combinatorio de productos biológicos separados, como los anticuerpos.

Se han propuesto construcciones de anticuerpos biespecíficos en múltiples formatos. Por ejemplo, los formatos de anticuerpos biespecíficos pueden implicar la conjugación química de dos anticuerpos o fragmentos de los mismos (Brennan, M, et al., Science, 1985, 229 (4708): pgs. 81-83; Glennie, MJ, et al., J Immunol, 1987. 139(7): p. 2367-2375).

Las desventajas de tales formatos de anticuerpos biespecíficos incluyen, sin embargo, alta viscosidad a alta concentración, lo que hace que, p. ej., la administración subcutánea sea un desafío, y que cada unidad de unión requiere la interacción de dos dominios variables para una unión específica y de alta afinidad, lo que tiene implicaciones sobre la estabilidad del polipéptido y la eficiencia de producción. Dichos formatos de anticuerpos biespecíficos también pueden conducir potencialmente a problemas de Química, Fabricación y Control (CMC, por sus siglas en inglés) relacionados con el apareamiento incorrecto de las cadenas ligeras o el apareamiento incorrecto de las cadenas pesadas.

3 Compendio de la presente tecnología

En algunas realizaciones, la presente tecnología se refiere a un polipéptido (o construcción ISVD) que se dirige específicamente a TNF α y OX40L al mismo tiempo conduce a una mayor eficiencia en la modulación de una respuesta inflamatoria en comparación con polipéptidos mono-específicos anti-TNF α o anti-OX40L.

En algunas realizaciones los polipéptidos de la presente tecnología se producen eficazmente (por ejemplo, en huéspedes microbianos) y tienen baja viscosidad a altas concentraciones, lo que es ventajoso y conveniente para la administración subcutánea. Además, en algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente tecnología tienen una reactividad limitada con los anticuerpos preexistentes en el sujeto a tratar (es decir, anticuerpos presentes en el sujeto antes del primer tratamiento con la construcción de anticuerpo). En realizaciones preferidas, dichos polipéptidos exhiben una semivida en el sujeto a tratar que es lo suficientemente larga como para que los tratamientos consecutivos puedan separarse convenientemente.

El polipéptido de la presente tecnología comprende o consiste en al menos cuatro dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD), en los que al menos dos ISVD se unen específicamente a TNF α y al menos dos ISVD se unen específicamente a OX40L.

Preferiblemente, los al menos dos ISVD que se unen a TNF α se unen específicamente a TNF α humano y los al menos dos ISVD que se unen a OX40L se unen específicamente a OX40L humano.

El polipéptido preferiblemente comprende además uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos, en los que dicho uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión proporcionan al polipéptido una semivida aumentada, en comparación con el polipéptido correspondiente sin dicho uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión. Por ejemplo, la unidad de unión puede ser un ISVD que se une a una proteína del suero, preferiblemente a una proteína del suero humano, como la albúmina de suero humano.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico capaz de expresar el polipéptido de la presente tecnología, un ácido nucleico o vector que comprende el ácido nucleico, y una composición que comprende el polipéptido, el ácido nucleico o el vector. La composición es preferiblemente una composición farmacéutica.

También se proporciona una célula huésped o un huésped que comprende el ácido nucleico o vector que codifica el polipéptido según la presente tecnología.

Se proporciona además un método para producir el polipéptido según la presente tecnología, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a. expresar, opcionalmente en una célula huésped u organismo huésped adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, una secuencia de ácido nucleico codificante del polipéptido según la presente tecnología; opcionalmente seguido de:

b. aislar y/o purificar el polipéptido según la presente tecnología.

Además, la presente tecnología proporciona el polipéptido, la composición que comprende el polipéptido o la composición que comprende el ácido nucleico o el vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, para su uso como medicamento. Preferiblemente, el polipéptido o composición es para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria, en donde preferiblemente la enfermedad autoinmune o inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, hidradenitis supurativa, enfermedad de injerto contra huésped.

Además, se proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria, en el que dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa del polipéptido o de una composición según la presente tecnología. La enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria se selecciona preferiblemente de artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, e hidradenitis supurativa. En una realización preferida, el método comprende además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales, como metotrexato.

Se proporciona además el uso del polipéptido o composición de la presente tecnología en la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria, en la que la enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria se selecciona preferiblemente de artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, hidradenitis supurativa, enfermedad de injerto contra huésped.

En particular, la presente tecnología proporciona las siguientes realizaciones:

Realización 1: un polipéptido, una composición que comprende el polipéptido, o una composición que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, para su uso como medicamento, en el que el polipéptido comprende o consiste en al menos cuatro dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD), en donde cada uno de dichos ISVD comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), opcionalmente unidas mediante uno o más conectores peptídicos; y en donde:

- a. un primer ISVD y un segundo ISVD comprenden
 - i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 7;
 - ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 10; y

- iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13; y
 - b. un tercer ISVD y un cuarto ISVD comprenden
 - iv. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 8;
 - v. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11; y
 - vi. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14,
- 10 en donde los ISVD están en el orden que comienza en el extremo N.

Realización 2: La composición para su uso de acuerdo con la realización 1, que es una composición farmacéutica que además comprende al menos un vehículo, diluyente o excipiente y / o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprende uno o más de otros polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos.

15 Realización 3: El polipéptido o la composición para uso de acuerdo con la realización 1 o 2, en donde:

- a. dicho primer ISVD y dicho segundo ISVD comprenden una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y
- b. dicho tercer ISVD y dicho cuarto ISVD comprenden una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

25 Realización 4: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en donde:

- a. la secuencia de aminoácidos de dicho primer ISVD comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 2;
- b. la secuencia de aminoácidos de dicho segundo ISVD comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 3;
- 5 c. la secuencia de aminoácidos de dicho tercer ISVD comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 4; y
- d. la secuencia de aminoácidos de dicho cuarto ISVD comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 6.

Realización 5: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones

10 1 a 4, en donde:

- a. dicho primer ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- b. dicho segundo ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- c. dicho tercer ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y
- d. dicho cuarto ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

15 Realización 6: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en donde dicho polipéptido comprende además uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos, en los que dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión proporcionan al polipéptido una semivida aumentada, en comparación con el

20 polipéptido correspondiente sin dicho uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión.

Realización 7: El polipéptido o la composición para uso según la realización 6, en donde dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en una molécula de

25 polietilenglicol, proteínas de suero o fragmentos de estas, unidades de unión que se pueden

unir a proteínas del suero, una porción de Fc, y pequeñas proteínas o péptidos que se pueden unir a proteínas del suero.

Realización 8: El polipéptido o la composición para uso según una cualquiera de las realizaciones 6 a 7, en donde dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en unidades de unión que se pueden unir a seralbúmina (tal como seralbúmina humana) o a una inmunoglobulina del suero (tal como IgG).

Realización 9: El polipéptido o la composición para uso según la realización 8, en donde dicha unidad de unión que proporciona al polipéptido una semivida aumentada es un ISVD que puede unirse a seralbúmina humana.

Realización 10: El polipéptido o la composición para uso según la realización 9, en donde el ISVD que se une a seralbúmina humana comprende

- i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 9;
- ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 12; y
- iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15.

Realización 11: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones 9 a 10, en donde el ISVD que se une a seralbúmina humana comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

Realización 12: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones 9 a 11, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho ISVD que se une a seralbúmina humana tiene una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 5.

Realización 13: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones 9 a 12, en donde dicho ISVD que se une a seralbúmina humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Realización 14: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones 1 a 13, en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 1.

Realización 15: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones 1 a 14, en donde el polipéptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Realización 16: El polipéptido o la composición para uso según cualquiera de las realizaciones 1 a 15, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria.

Realización 17: El polipéptido o la composición para uso según la realización 16, en donde la enfermedad autoinmune o inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, hidradenitis supurativa, y enfermedad del injerto contra el huésped.

Realización 18: Un polipéptido que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencias de nucleótidos que codifica el polipéptido, en donde el polipéptido comprende o consiste en al menos cuatro dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVDs), en donde cada uno de dichos ISVD comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), opcionalmente conectadas a través de uno o más conectores peptídicos; y en donde:

a. un primer ISVD y un segundo ISVD comprenden

i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 7;

ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 10; y

- iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13; y

b. un tercer ISVD y un cuarto ISVD comprenden

- iv. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 8;

- v. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11; y

- vi. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14,

en donde los ISVD están en el orden que comienza en el extremo N.

Realización 19: El polipéptido según la realización 18, en donde:

- a. dicho primer ISVD y dicho segundo ISVD comprenden una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y

- b. dicho tercer ISVD y dicho cuarto ISVD comprenden una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

Realización 20: El polipéptido según la realización 18 o 19, en donde:

- a. la secuencia de aminoácidos de dicho primer ISVD comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 2;
- b. la secuencia de aminoácidos de dicho segundo ISVD comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 3;

- c. la secuencia de aminoácidos de dicho tercer ISVD comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 4; y
- d. la secuencia de aminoácidos de dicho cuarto ISVD comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 6.

5 Realización 21: El polipéptido según cualquiera de las realizaciones 18 a 20, en donde:

- a. dicho primer ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- b. dicho segundo ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- c. dicho tercer ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y
- d. dicho cuarto ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

10 Realización 22: El polipéptido según cualquiera de las realizaciones 18 a 21, en donde dicho polipéptido comprende además uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión, opcionalmente conectados a través de uno o más conectores peptídicos, en donde dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión proporcionan al polipéptido semivida aumentada, en comparación con el correspondiente polipéptido sin
15 dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión.

Realización 23: El polipéptido según la realización 22, en donde dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas de suero o fragmentos de estas, unidades de unión que se pueden unir a proteínas
20 del suero, una porción de Fc, y pequeñas proteínas o péptidos que se pueden unir a proteínas del suero.

Realización 24: El polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 22 a 23, en donde dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en unidades de unión
25 que se pueden unir a seralbúmina (tal como seralbúmina humana) o a una inmunoglobulina del suero (tal como IgG).

Realización 25: El polipéptido según la realización 24, en donde dicha unidad de unión que proporciona al polipéptido una semivida aumentada es un ISVD que puede unirse a seralbúmina humana.

Realización 26: El polipéptido según la realización 25, en donde el ISVD que se une a seralbúmina humana comprende

- i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 9;
- ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 12; y
- iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15.

Realización 27: El polipéptido o la composición para uso según una cualquiera de las realizaciones 25 a 26, en donde el ISVD que se une a seralbúmina humana comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

Realización 28: El polipéptido o la composición para uso según una cualquiera de las realizaciones 25 a 27, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho ISVD que se une a seralbúmina humana comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 5.

Realización 29: El polipéptido según cualquiera de las realizaciones 25 to 28, en donde dicho ISVD que se une a seralbúmina humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Realización 30: El polipéptido según cualquiera de las realizaciones 18 a 29, en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende una identidad de secuencia de más del 90% con SEQ ID NO: 1.

Realización 31: El polipéptido o la composición para uso según una cualquiera de las realizaciones 18 a 30, en donde el polipéptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

5 Realización 32: Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido según cualquiera de las realizaciones 18 to 31.

Realización 33: Un huésped o una célula huésped que comprende un ácido nucleico según la realización 32.

Realización 34: Un método para producir un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 18-31, y dicho método comprende al menos las etapas de:

- 10 a. expresar, en una célula huésped u organismo huésped adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, un ácido nucleico según la realización 32; opcionalmente seguida de:
- b. aislar y/o purificar el polipéptido según cualquiera de las realizaciones 18 a 31.

15 Realización 35: Una composición que comprende al menos un polipéptido según cualquiera de las realizaciones 18 a 31, o un ácido nucleico según la realización 32.

Realización 36: La composición según la realización 35, que es una composición farmacéutica que además comprende al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprende uno o más de otros polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

20 Realización 37: Un método para tratar una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria, en donde dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido según cualquiera de las realizaciones 18 a 31 o una composición según cualquiera de las realizaciones 35 a 36.

25 Realización 38: El método según la realización 37, en el que la enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria se selecciona de artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, hidradenitis supurativa, enfermedad de injerto contra huésped.

Realización 39: El método según cualquiera de las realizaciones 37 a 38, en el que el método comprende además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Realización 40: El método según la realización 39, en el que el agente terapéutico adicional es metotrexato.

- 5 Realización 41: Uso de un polipéptido según cualquiera de las realizaciones 18 a 31 o una composición según cualquiera de las realizaciones 35 a 36, en la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria.

- 10 Realización 42: Uso del polipéptido o composición según la realización 41, en donde la enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria se selecciona entre artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, hidradenitis supurativa, enfermedad de injerto contra huésped.

4 Breve descripción de los dibujos

- 15 **Figura 1:** Sensorgrama que muestra la unión simultánea de hTNF α y hOX40L solubles recombinantes a la construcción F027300252 de ISVD capturada mediante HSA.

Figura 2: Unión simultánea de TNF α soluble y hOX40L unido a membrana a la construcción F027300252 de ISVD como se muestra por citometría de flujo en células CHO-Ki que expresan OX40L humano. IRR00096 es un V_{HH} de control negativo.

- 20 **Figura 3:** Inhibición de TNF α humano y cino solubles en el ensayo indicador GloResponse™ HEK293_NF κ B-NLucP por la construcción F0275000252 de ISVD y el compuesto de referencia mAb de referencia anti-hTNF α , IRR00096 es un V_{HH} de control negativo.

Figura 4: Inhibición de OX40L unido a la membrana por la construcción F0275000252 de ISVD y el compuesto de referencia mAb anti-hOX40L según se determina en el ensayo de actividad de PBMC.

- 25 **Figura 5:** Inducción de la actividad luciferasa [RLU] por TNF α humano recombinante a 5 ng/ml o por OX40L humano a 100 ng/ml, o una combinación de ambos, e inhibición de la actividad luciferasa inducida por un anticuerpo anti-TNF α (PB03017; de Sanofi), un anticuerpo anti-

OX40L (Cat # AB00536 de Absolute Antibody), o una combinación de ambos anticuerpos a diferentes concentraciones desde 0.5 µg/ml hasta 5 µg/ml.

Figura 6: Inducción de la actividad luciferasa [RLU] por una combinación de TNFα humano recombinante y OX40L humano (como se explica en la Fig.5), e inhibición de la actividad luciferasa inducida por el anti-OX40L V_{HH} ALX-0632 monoespecífico, o el anti-TNF V_{HH} ATN-103 monoespecífico, o las construcciones de ISVD anti-TNF/anti-OX40L biespecíficas F027300252, F027301104, F027301189, F027301197 y F027301199. Se muestra el % de inhibición máxima de la actividad luciferasa NFκB lograda por construcciones de ISVD biespecíficas o monoespecíficas/V_{HH}S.

Figura 7: Inducción de la actividad luciferasa mediante una combinación de TNFα humano recombinante y OX40L humano (como se explica en la Fig.5), e inhibición de la actividad luciferasa inducida por las construcciones de ISVD biespecíficas anti-TNF/anti-OX40L F027300252, F027301104, F027301189, F027301197, y F027301199. Se muestran los valores medios de CI50 (pM) ± SD de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 8: Expresión superficial de OX40L en células dendríticas derivadas de monocitos humanos en los días 1, 2 y 3 de maduración. La expresión de OX40L se midió mediante citometría de flujo. Los resultados corresponden a la media ± SEM de 3 donantes de CDm humanos diferentes probados contra PBMC de 5 donantes alogénicos.

Figura 9: Expresión de GM-CSF en el ensayo MLR el día 5. Se midió la secreción de GM-CSF en el sobrenadante del ensayo MLR después de la incubación con anticuerpo anti-TNFα solo [10 µg/ml], o anticuerpo anti-OX40L solo [10 µg/ml], o una combinación de anticuerpos anti-TNF [10 µg/ml] + anti-OX40L [10 µg/ml]. Resultados de 5 donantes de PBMC probados contra DC de 3 donantes de DC alogénicos. ** p <0.0016, **** p <0.0001.

Figura 10: Diagrama de bloques que muestra la unión de anticuerpos preexistentes presentes en 96 muestras de suero humano a las construcciones de ISVD F027300252, F027301104, F027301189 y F027301197 en comparación con las construcciones de control de ISVD F027301099 y F027301186.

Figura 11: Diagrama de bloques que muestra la unión de los anticuerpos preexistentes presentes en 96 muestras de suero humano a las construcciones de ISVD F027300028, F027300252, F027301097 y F027301186.

Figura 12: Puntuación de artritis a lo largo del tiempo en diferentes grupos de tratamiento (n = 8 ratones / grupo). Los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de los compuestos indicados dos veces por semana, comenzando a las 6 semanas de edad. Se muestran las puntuaciones medias semanales de artritis $\pm$ SEM. Las estadísticas son ANOVA de dos vías y prueba de comparación múltiple de Bonferroni. ns (no significativo) $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figura 13: Área bajo la curva para la puntuación de artritis a lo largo del tiempo. Se muestran valores individuales (símbolos) y medias $\pm$ SEM (barras). Las estadísticas son ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Bonferroni. ns (no significativo) $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figura 14: Puntuación de histología. Se muestran valores individuales (símbolos) y medias $\pm$ SEM (barras). Las estadísticas son ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Figura 15: Diseño de estudio para probar la eficacia de la construcción F027300252 de ISVD anti-TNF α -OX40L (denominada nAb) en un modelo de artritis inducida con anticuerpos anti-colágeno de ratón humanizados (CAIA) con TNF α . Se dosificó mAb de referencia anti-hTNF α al mismo tiempo que la construcción de ISVD, la primera dosis 6 horas después de LPS y la segunda dosis 3 días después de LPS el día 4.

Figura 16: Desarrollo de la puntuación de artritis a lo largo del tiempo del experimento (n=8 ratones/grupo aparte del vehículo: n=16/grupo de dos experimentos independientes) en un modelo de CAIA en ratones. Los animales recibieron dos inyecciones intraperitoneales de, o bien el vehículo, el compuesto de referencia mAb de referencia anti-hTNF α , o la construcción F027300252 de ISVD anti-TNF α -OX40L de semivida extendida, según el esquema de la figura 10. Las estadísticas son ANOVA de dos vías y prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Figura 17: AUC de la puntuación de artritis del experimento (n=8 ratones/grupo aparte del vehículo: n=16/grupo de dos experimentos independientes) en un modelo de CAIA en ratones.

Figura 18: Esquema de estudio para el modelo combinado TDAR-DTH. Los recuadros de color gris claro en la parte superior del curso del tiempo en días ilustran la administración de KLH para la parte TDAR del estudio. El recuadro gris oscuro marca la inyección intramuscular de la toxina tetanoide del segundo antígeno (TTx) con hidróxido de aluminio (ALU) para la parte DTH del estudio. Los recuadros blancos en la parte superior del curso del tiempo marcan la provocación de la piel con TTx/ALU y KLH el día 31 y el día 56 con una flecha oscura para el modelo DTH. Las biopsias de piel que se evaluaron para histopatología e inmunohistoquímica se muestran para el día 34 y en la necropsia el día 59. Después de la provocación con TTx/ALU y KLH, el área de la piel se siguió durante 24/48/72 horas en la provocación con DTH correspondiente para evaluar cambios in vivo como se describe en la tabla 15.

Figura 19: Concentraciones séricas medias (ng/ml) de F027300252 después de la administración subcutánea los días 1 y 29, a razón de 3, 10, 30, 100 (mg/kg/adm) a monas hembras (gráfico de escala semilogarítmica).

Figura 20: Respuesta anti-KLH TDAR de mono cynomolgus con un enfoque en la respuesta de IgG anti-KLH. Para cada grupo se utilizaron 4 monos cynomolgus. Los datos se representan como media $\pm$ DE. D3 (día 3) y d31 (día 31) marcan los puntos de tiempo para la estimulación con KLH. La respuesta primaria abarca la ventana de tiempo entre BL (-12D) y el día 30 (30D), la respuesta secundaria entre el día 31 (31D) y el final del estudio el día 59 (59D). Se administró F027300252 de una manera dependiente de la dosis desde 3 mg/kg hasta 100 mg/kg mediante inyecciones subcutáneas semanales. El tratamiento se detuvo con la quinta inyección del día 29. Las estadísticas son ANOVA de 2 vías y prueba de comparación múltiple de Bonferroni y se aplicó a la respuesta secundaria. Durante la respuesta primaria, todos los grupos de tratamiento no son significativamente diferentes del vehículo.

Figura 21: Reducción media del AUC de IgG anti-KLH durante la respuesta secundaria TDAR entre el día 34 y el día 59 como porcentaje del vehículo de mAb de referencia anti-hTNF α a 4 mg/kg y mAb de referencia anti-hOX40L a 8 mg/kg (estudio piloto) y a partir de diferentes

niveles de dosis de F027300252 (3, 10, 30 y 100 mg/kg) en el estudio de la TDAR en monos. Las dosis se expresaron en nmol por kg.

Figura 22: Células formadoras de manchas de IFN- γ /millón de células después de la reestimulación de PBMC con KLH en el día 59 determinadas por un ensayo ELISPOT. La barra representa el valor medio $\pm$ DE. Los animales individuales se representan mediante círculos cerrados (control de vehículo) o círculos abiertos (grupos tratados con F027300252). La dosis respectiva se proporciona en mg/kg para F027300252. En el grupo de 30 mg/kg para un animal, el ensayo no cumplió con los estándares de control de calidad, por lo que solo se muestran tres animales de cuatro. Las estadísticas son ANOVA de 1 vía y prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Figura 23: Células formadoras de manchas de IL-4/millón de células después de la reestimulación de PBMC con KLH en el día 59 determinadas por un ensayo ELISPOT. La barra representa el valor medio $\pm$ DE. Los animales individuales se representan mediante círculos cerrados (control de vehículo) o círculos abiertos (grupos tratados con F027300252). La dosis respectiva se proporciona en mg/kg para F027300252. En el grupo de 30 mg/kg para un animal, el ensayo no cumplió con los estándares de control de calidad, por lo que solo se muestran tres animales de cuatro. Las estadísticas son ANOVA de 1 vía y prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Figura 24: Dibujo esquemático de las diferentes inmunizaciones para TDAR (gris claro) y DTH (gris oscuro) a la izquierda del dibujo. Para DTH, los animales se provocaron el día 31 o el día 59 con TTX/ALU y KLH, respectivamente. Se utilizaron diferentes sitios de inyección intradérmica como se muestra en el dibujo central. Se tomaron biopsias de 8 mm de diámetro el día 34 y al final del estudio el día 59 y se evaluaron mediante histopatología e inmunohistoquímica (parte derecha del dibujo).

Figura 25: Desarrollo de la puntuación de EICH a lo largo del tiempo en el modelo de ratón xeno-EICH. Los datos se representan como media $\pm$ SEM. N = 7, 2 donantes diferentes de hPBMC. Las estadísticas son ANOVA de 1 vía y prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Figura 26: Supervivencia en el tiempo en el modelo de ratón xeno-EICH. Los datos se representan como curva de supervivencia de Kaplan-Meier. $n = 7$, 2 donantes diferentes de hPBMC. Los datos de supervivencia se analizaron mediante la prueba Log-rank (Mantel-Cox). Los valores de p se corrigieron para múltiples comparaciones.

5 **Figura 27:** Injerto de hPBMC en ratones receptores NSG. Los datos se representan como media $\pm$ SEM. $n = 7$, 2 donantes diferentes de hPBMC. Los datos de injerto de Kaplan se analizaron mediante el análisis de efectos mixtos y la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

10 **Figura 28:** Desarrollo de la puntuación de EICH a lo largo del tiempo en el modelo de ratón xeno-EICH. Los datos se representan como media $\pm$ SEM. Se combinaron los resultados de dos estudios independientes. $n = 7-12$, 3 donantes diferentes de hPBMC. Las estadísticas son ANOVA de 1 vía y prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

15 **Figura 29:** Supervivencia en el tiempo en el modelo de ratón xeno-EICH. Los datos se representan como curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Se combinaron los resultados de dos estudios independientes. $n = 7-12$, 3 donantes diferentes de hPBMC. Los datos de supervivencia se analizaron mediante la prueba Log-rank (Mantel-Cox). Los valores de p se corrigieron para múltiples comparaciones.

20 **Figura 30:** Injerto de hPBMC en ratones NSG hospedadores. Los datos se representan como media $\pm$ SEM. Se combinaron los resultados de dos estudios independientes. $n = 7-12$, 3 donantes diferentes de hPBMC. Los datos del injerto se analizaron mediante análisis de efectos mixtos y la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

25 **Figura 31:** Inhibición de la liberación de IL-8 inducida por PHA en sangre completa humana mediante el anticuerpo monoclonal anti-TNF monoespecífico RA14956298 y las construcciones ISVD anti-TNF α /anti-OX40L biespecíficas F027300252, F027301104, F027301189, F027301197 y F027301199. Los valores corresponden a la media IC50 [nM] $\pm$ SEM y representan los resultados de 3 donantes diferentes con mediciones por triplicado cada uno.

Figura 32: Presentación esquemática de la construcción ISVD F027300252 que muestra desde el extremo N al extremo C los bloques de construcción monovalentes/ISVD 1E07/1, 1C02/1 y ALB23002, conectados a través de conectores 9GS.

5 Descripción detallada de la presente tecnología

- 5 La presente tecnología tiene como objetivo proporcionar un nuevo tipo de fármaco para tratar enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que un polipéptido que comprende al menos cuatro ISVD, en el que al menos dos ISVD se unen específicamente a TNF α , preferiblemente TNF α humano, y al menos dos ISVD se unen específicamente a OX40L, preferiblemente OX40L humano, se puede usar para obtener resultados más eficaces en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias en comparación con polipéptidos anti-TNF α o anti-OX40L monoespecíficos. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente tecnología se producen eficazmente (por ejemplo, en huéspedes microbianos) y mostraron una baja viscosidad a altas concentraciones, lo que es ventajoso y conveniente para la administración subcutánea. Además, tales polipéptidos tienen una reactividad limitada con los anticuerpos preexistentes en el sujeto que se ha de tratar (es decir, anticuerpos presentes en el sujeto antes del primer tratamiento con la construcción de anticuerpo). En realizaciones preferidas, tales polipéptidos exhiben una semivida en el sujeto que se va a tratar que es lo suficientemente larga como para que los tratamientos consecutivos puedan separarse convenientemente.

El polipéptido es al menos biespecífico, pero también puede ser, por ejemplo, triespecífico, tetraespecífico o pentaespecífico. Además, el polipéptido es al menos tetravalente, pero también puede ser, p. ej. pentavalente o hexavalente, etc.

Los términos "*biespecífica*", "*triespecífica*", "*tetraespecífica*" o "*pentaespecífica*" caen todos bajo el término "*multiespecífica*" y se refieren a la unión a dos, tres, cuatro o cinco moléculas diana diferentes, respectivamente. Los términos "*bivalente*", "*trivalente*", "*tetravalente*", "*pentavalente*" o "*hexavalente*" se incluyen en el término "*multivalente*" e indican la presencia de dos, tres, cuatro o cinco unidades de unión (como los ISVD), respectivamente. Por ejemplo,

el polipéptido puede ser pentavalente-triespecífico, como un polipéptido que comprende o consiste en cinco ISVD, en el que dos ISVD se unen al TNF α humano, dos ISVD se unen al OX40L humano y un ISVD se une a la albúmina de suero humano (como F027300252). Tal polipéptido puede ser al mismo tiempo biparatópico, por ejemplo, si dos ISVD se unen a dos epítomos diferentes en el TNF α humano o el OX40L humano. El término "biparatópico" se refiere a la unión a dos partes diferentes (por ejemplo, epítomos) de la misma molécula diana.

Los términos "primer ISVD", "segundo ISVD", "tercer ISVD", etc., como se usan en el presente documento, solo indican la posición relativa de los ISVD entre sí, en donde la numeración comienza desde el extremo N-terminal del polipéptido de la presente tecnología. Por tanto, el "primer ISVD" está más cerca del extremo N que el "segundo ISVD", mientras que el "segundo ISVD" está más cerca del extremo N que el "tercer ISVD", etc. En consecuencia, la disposición de ISVD es inversa cuando se considera desde el extremo C. Dado que la numeración no es absoluta y solo indica la posición relativa de los al menos tres ISVD, no se excluye que otras unidades de unión/componentes básicos, como ISVD adicionales que se unen a TNF α u OX40L, o ISVD que se unen a otro objetivo, puedan estar presentes en el polipéptido. Además, no se excluye la posibilidad de que otras unidades de unión/bloques de construcción como los ISVD se puedan colocar en el medio. Por ejemplo, como se describe más adelante (ver en particular, la sección 5.3 "Extensión de la vida media (in vivo)"), el polipéptido puede comprender además otro ISVD que se une a la serralbúmina humana que incluso puede ubicarse entre, por ejemplo, el "segundo ISVD" y el "tercer ISVD".

A la luz de lo anterior, la presente tecnología proporciona un polipéptido que comprende o consiste en al menos cuatro ISVD, en donde al menos dos ISVD se unen específicamente a TNF α y al menos dos ISVD se unen específicamente a OX40L, en donde TNF α y OX40L son preferiblemente TNF α humano y OX40L humano.

Los componentes, preferiblemente ISVD, del polipéptido se pueden unir entre sí mediante uno o más conectores adecuados, tales como conectores peptídicos.

El uso de enlazadores para conectar dos o más (poli)péptidos es bien conocido en la técnica. En la Tabla A-5 se muestran ejemplos de conectores peptídicos. Una clase de conectores peptídicos de uso frecuente se conocen como conectores "Gly-Ser" o "GS". Estos son

conectores que consisten esencialmente en residuos de glicina (G) y serina (S), y generalmente comprenden una o más repeticiones de un motivo peptídico tal como el motivo GGGGS (SEQ ID NO: 60) (por ejemplo, que comprende la fórmula (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n en el que n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más). Algunos ejemplos usados con frecuencia de tales conectores GS son conectores 9GS (GGGGSGGGGS, SEQ ID NO: 63) conectores 15GS (n=3) y conectores 35GS (n=7). Se hace referencia, por ejemplo, a Chen et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 15 de octubre de 2013; 65 (10): 1357–1369; y Klein y col., Protein Eng. Des. Sel. (2014) 27 (10): 325-330. En el polipéptido de la presente tecnología, se prefiere el uso de conectores 9GS para unir los componentes del polipéptido entre sí.

En una realización preferida, dos de los al menos dos ISVD que se unen específicamente a TNF α se colocan en el extremo C del polipéptido. Los inventores descubrieron sorprendentemente que tal configuración puede aumentar el rendimiento de producción del polipéptido.

Además, en una realización preferida, dos de los al menos dos ISVD que se unen específicamente a OX40L se colocan en el extremo N del polipéptido.

Por consiguiente, se prefiere que el polipéptido comprenda o consista en lo siguiente, en el orden que comienza en el extremo N del polipéptido: un primer ISVD que se une específicamente a OX40L, un segundo ISVD que se une específicamente a OX40L, un primer ISVD que se une específicamente a TNF α , una unidad de unión opcional que proporciona al polipéptido una semivida aumentada como se define en el presente documento, y un segundo ISVD que se une específicamente a TNF α . La unidad de unión que proporciona al polipéptido una semivida aumentada es preferiblemente una ISVD.

Es incluso más preferido que el polipéptido comprenda o consista en lo siguiente, en el orden que comienza en el extremo N del polipéptido: un ISVD que se une específicamente a OX40L, un conector, un segundo ISVD que se une específicamente a OX40L, un conector, un primer ISVD que se une específicamente a TNF α , un conector, un ISVD que se une a seralbúmina humana, un conector, y un segundo ISVD que se une específicamente a TNF α , en donde cada conector es preferiblemente un conector 9GS.

Tales configuraciones del polipéptido pueden proporcionar un mayor rendimiento de producción, buenas características de CMC así como una funcionalidad optimizada y una potencia más fuerte con respecto a la modulación de una respuesta inmune.

Preferiblemente, el polipéptido de la presente tecnología exhibe unión reducida por anticuerpos preexistentes en suero humano. Con este fin, en una realización, el polipéptido comprende una valina (V) en la posición de aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición de aminoácido 89 (según la numeración de Kabat) en al menos un ISVD, pero preferiblemente en cada ISVD. En otra realización, el polipéptido comprende una extensión de 1 a 5 aminoácidos (preferiblemente de origen natural), tal como una sola extensión de alanina (A), en el extremo C del ISVD del extremo C. El extremo C de un ISVD es normalmente VTVSS (SEQ ID NO: 125). En otra realización, el polipéptido comprende una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 110 (según la numeración de Kabat) en al menos un ISVD. En otra realización, el ISVD comprende una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 112 (según la numeración de Kabat) en al menos un ISVD. En estas realizaciones, el extremo C del ISVD es VKVSS (SEQ ID NO: 126), VQVSS (SEQ ID NO: 127), VTVKS (SEQ ID NO:131), VTVQS (SEQ ID NO:132), VKVKS (SEQ ID NO:133), VKVQS (SEQ ID NO:134), VQVKS (SEQ ID NO:135), o VQVQS (SEQ ID NO:136) tal que después de la adición de una sola alanina, el extremo C del polipéptido, por ejemplo, comprende la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 128), VKVSSA (SEQ ID NO: 129), VQVSSA (SEQ ID NO: 130), VTVKSA (SEQ ID NO:137), VTVQSA (SEQ ID NO:138), VKVKSA (SEQ ID NO:139), VKVQSA (SEQ ID NO:140), VQVKSA (SEQ ID NO:141), o VQVQSA (SEQ ID NO:142), preferiblemente VKVSSA (SEQ ID NO: 129). En otra realización, el polipéptido comprende una valina (V) en la posición del aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición del aminoácido 89 (según la numeración de Kabat) en cada ISVD, opcionalmente una lisina (K) o glutamina (Q) en posición 110 (según la numeración de Kabat) en al menos un ISVD, y comprende una extensión de 1 a 5 aminoácidos (preferiblemente de origen natural), como una sola extensión de alanina (A), en el extremo C del ISVD del extremo C (tal que el extremo C del polipéptido, por ejemplo, comprende la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 128), VKVSSA (SEQ ID NO: 129) o VQVSSA (SEQ ID NO: 130), preferiblemente VKVSSA (SEQ ID NO: 129)). Véase p. ej. WO2012/175741 y WO2015/173325 para obtener más información al respecto.

En una realización preferida, el polipéptido de la presente tecnología comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de más del 90%, tal como más del 95% o más del 99%, con SEQ ID NO: 1, en donde opcionalmente las CDR de los cinco ISVD son como se definen en los puntos A a C (o A' a C' si se usa la definición de Kabat) que se establecen en las secciones "5.1 Dominios variables únicos de inmunoglobulina" y "5.3 Extensión de la semivida (in vivo)" más adelante, respectivamente, en donde en particular:

- el primer y el segundo ISVD que se unen específicamente a OX40L tienen una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- el tercer y el cuarto ISVD que se unen específicamente a TNF α tienen una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y
- el ISVD que se une a seralbúmina humana comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15,

o, alternativamente, si se usa la definición de Kabat:

- el primer y el segundo ISVD que se unen específicamente a OX40L tienen una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- el tercer y el cuarto ISVD que se unen específicamente a TNF α tienen una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y

- el ISVD que se une a seralbúmina humana comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

5 Preferiblemente, el polipéptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

El polipéptido de la presente tecnología tiene preferiblemente al menos la mitad de la afinidad de unión, más preferiblemente al menos la misma afinidad de unión, al TNF α humano y al
10 OX40L humano en comparación con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en donde la afinidad de unión se mide utilizando el mismo método, tal como como Sierra SPR-32 (SPR).

5.1 Dominios variables únicos de inmunoglobulina

El término "dominio variable único de inmunoglobulina" (ISVD), utilizado indistintamente con
15 "dominio variable único", define moléculas de inmunoglobulina en las que el sitio de unión al antígeno está presente y formado por un dominio de inmunoglobulina único. Esto diferencia a los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas "convencionales" (p. ej., anticuerpos monoclonales) o sus fragmentos (como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, di-scFv), en donde dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interactúan
20 para formar un sitio de unión al antígeno. Normalmente, en las inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) interactúan para formar un sitio de unión al antígeno. En este caso, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tanto de V_H como de V_L contribuirán al sitio de unión al antígeno, es decir, un total de 6 CDR estarán involucradas en la formación del sitio de
25 unión al antígeno.

En vista de la definición anterior, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de 4 cadenas convencional (como una molécula de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE; conocida en la técnica) o de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv tal como un Fv unido por

disulfuro o un fragmento scFv, o un diacuerpo (todos conocidos en la técnica) derivado de dicho anticuerpo convencional de 4 cadenas, normalmente no se consideraría un dominio variable único de inmunoglobulina, ya que, en estos casos, la unión al epítipo respectivo de un antígeno normalmente no se produciría por un (único) dominio de inmunoglobulina sino por un par de dominios de inmunoglobulina (asociados) tales como dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, por un par V_H - V_L de dominios de inmunoglobulina, que se unen conjuntamente a un epítipo del antígeno respectivo.

Por el contrario, los dominios variables únicos de inmunoglobulina son capaces de unirse específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un dominio V_H único, V_{HH} único o V_L único.

Como tal, el dominio variable único puede ser una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia V_L) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia V_H o secuencia V_{HH}) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea capaz de formar una única unidad de unión a antígeno (es decir, una unidad funcional de unión a antígeno que esencialmente consista en un único dominio variable, de modo que el único dominio de unión a antígeno no necesite interactuar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional).

Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) puede ser, por ejemplo, un ISVD de cadena pesada, tal como un V_H , V_{HH} , incluido un V_H camelizado o V_{HH} humanizado. Preferiblemente, es un V_{HH} , incluido un V_H camelizado o V_{HH} humanizado. Los ISVD de cadena pesada pueden derivarse de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o de un anticuerpo de cadena pesada.

Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio único (o una secuencia de aminoácidos adecuada para su uso como anticuerpo de dominio único), un "dAb" o dAb (o una secuencia de aminoácidos adecuada para su uso como un dAb) o un Nanobody® (como se define en el presente documento, incluido, entre otros, un V_{HH}); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de ellos.

En particular, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un Nanobody® (tal como un V_{HH}, incluido un V_{HH} humanizado o V_H camelizado) o un fragmento adecuado del mismo. Nanobody®, Nanobodies® y Nanoclone® son marcas comerciales registradas.

Los "dominios V_{HH}", también conocidos como V_{HH}S, fragmentos de anticuerpo V_{HH}, y anticuerpos V_{HH}, se han descrito originalmente como el dominio variable de inmunoglobulina de unión a antígeno de "anticuerpos de cadena pesada" (es decir, de "anticuerpos desprovistos de cadenas ligeras"; Hamers-Casterman et al. Nature 363: 446-448, 1993). El término "dominio V_{HH}" se ha elegido para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de la cadena pesada que están presentes en los anticuerpos convencionales de 4 cadenas (que se denominan en el presente documento "dominios V_H") y de los dominios variables de la cadena ligera. que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominan en el presente documento "dominios V_L"). Para una descripción más detallada de los V_{HH}, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001).

Normalmente, la generación de inmunoglobulinas implica la inmunización de animales experimentales, la fusión de células productoras de inmunoglobulina para crear hibridomas y el cribado de las especificidades deseadas. Alternativamente, se pueden generar inmunoglobulinas mediante el cribado de bibliotecas sintéticas o vírgenes, p.ej. por visualización de fagos.

La generación de secuencias de inmunoglobulinas, tales como Nanobodies®, se ha descrito ampliamente en diversas publicaciones, entre las que se encuentran, p.ej., WO 94/04678, Hamers-Casterman et al. 1993 y Muyldermans et al. 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001). En estos métodos, los camélidos se inmunizan con el antígeno diana para inducir una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno diana. El repertorio de nanocuerpos obtenidos de dicha inmunización se analiza adicionalmente para detectar nanocuerpos que se unen al antígeno diana.

En estos casos, la generación de anticuerpos requiere antígeno purificado para inmunización y/o cribado. Los antígenos se pueden purificar a partir de fuentes naturales o en el curso de la producción recombinante.

La inmunización y/o el cribado en cuanto a secuencias de inmunoglobulina se pueden realizar usando fragmentos de péptidos de tales antígenos.

La presente tecnología puede utilizar secuencias de inmunoglobulinas de diferente origen, que comprenden secuencias de inmunoglobulinas de ratón, rata, conejo, burro, ser humano y camélido. La presente tecnología también incluye secuencias completamente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, la presente tecnología comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o anticuerpos de dominio camelizado, p.ej. dAb camelizado como lo describen Ward et al (véase, por ejemplo, WO 94/04678 y Riechmann, Febs Lett., 339:285-290, 1994 y Prot. Eng., 9:531-537, 1996. Además, la presente tecnología también usa secuencias de inmunoglobulina fusionadas que, por ejemplo, forman una construcción multivalente y/o multiespecífica (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios V_{HH} y su preparación, también se hace referencia a Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001, así como, por ejemplo, WO 96/34103 y WO 99/23221), y secuencias de inmunoglobulina que comprenden etiquetas u otras fracciones funcionales, por ejemplo, toxinas, marcas, radioquímicos, etc., que se pueden derivar de las secuencias de inmunoglobulina de la presente tecnología.

Un " V_{HH} humanizado" comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} natural, pero que ha sido "humanizado", es decir, uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia V_{HH} natural (y en particular en las secuencias marco) se han reemplazado por uno o más de los residuos de aminoácidos que se producen en la posición o posiciones correspondientes en un dominio V_H de un anticuerpo convencional de 4 cadenas de un ser humano (por ejemplo, indicado anteriormente). Esto se puede realizar de una manera conocida per se, que será clara para el experto, por ejemplo, sobre la base de la descripción adicional en este documento y la técnica anterior (por ejemplo, WO 2008/020079). Nuevamente, se debe señalar que tales V_{HH} humanizados pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida per se y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio V_{HH} de origen natural como material de partida.

Un "V_H camelizado" comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de origen natural, pero que ha sido "camelizado", es decir, uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H de origen natural de un anticuerpo convencional de 4 cadenas se han reemplazado por uno o más de los residuos de aminoácidos que se producen en la posición o posiciones correspondientes en un dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada. Esto se puede realizar de una manera conocida per se, que será clara para el experto, por ejemplo, sobre la base de la descripción adicional en este documento y de la técnica anterior (por ejemplo, WO 2008/020079). Tales sustituciones "camelizantes" se insertan preferiblemente en posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfaz V_H-V_L, y/o en los denominados residuos distintivos de Camelidae, como se define en el presente documento (véase, por ejemplo, WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996), supra). Preferiblemente, la secuencia de V_H que se utiliza como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el V_H camelizado es preferiblemente una secuencia de V_H de un mamífero, más preferiblemente la secuencia de V_H de un ser humano, tal como una secuencia V_{H3}. Sin embargo, cabe señalar que tal V_H camelizado puede obtenerse de cualquier manera adecuada conocida per se y, por tanto, no se limita estrictamente a polipéptidos que se han obtenido utilizando un polipéptido que comprende un dominio V_H de origen natural como material de partida.

Cabe señalar que una o más secuencias de inmunoglobulinas pueden unirse entre sí y/o a otras secuencias de aminoácidos (por ejemplo, mediante puentes disulfuro) para proporcionar construcciones de péptidos que también pueden ser útiles en la presente tecnología (por ejemplo, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, construcciones scFv, "diacuerpos" y otras construcciones multiespecíficas). Se hace referencia, por ejemplo, a la revisión de Holliger y Hudson, Nat Biotechnol. Septiembre de 2005; 23 (9): 1126-36)). Generalmente, cuando un polipéptido está destinado a la administración a un sujeto (por ejemplo, con fines profilácticos, terapéuticos y/o de diagnóstico), preferiblemente comprende una secuencia de inmunoglobulina que no se encuentra naturalmente en dicho sujeto.

Se puede considerar que una estructura preferida de una secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina está compuesta por cuatro regiones marco ("FR"), que se denominan en la técnica y en el presente documento como "región marco 1" ("FR1"); como "Región marco 2" ("FR2"); como "Región marco 3" ("FR3"); y como "Región marco 4" ("FR4"),
5 respectivamente; y dichas regiones marco están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), que se denominan en la técnica y en el presente documento "Región determinante de complementariedad 1" ("CDR1"); como "Región determinante de complementariedad 2" ("CDR2"); y como "Región de determinación de complementariedad 3" ("CDR3"), respectivamente.

10 Como se describe adicionalmente en el párrafo q) en las páginas 58 y 59 del documento WO 08/020079, los residuos de aminoácidos de un dominio variable único de inmunoglobulina pueden numerarse de acuerdo con la numeración general para dominios V_H proporcionada por Kabat et al. ("Secuencia de proteínas de interés inmunológico", Servicios de Salud Pública de EE. UU., NIH Bethesda, MD, Publicación No. 91), según se aplica a los dominios V_{HH} de
15 Camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, 2000 (J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195; véase, por ejemplo, la Figura 2 de esta publicación). Cabe señalar que, como es bien conocido en la técnica para los dominios V_H y para los dominios V_{HH} , el número total de residuos de aminoácidos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos de aminoácidos indicado por la Numeración Kabat (es decir, una o
20 más posiciones de acuerdo con la numeración Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos de aminoácidos que el número permitido por la numeración Kabat). Esto significa que, en general, la numeración según Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos de aminoácidos en la secuencia real. El número total de residuos de aminoácidos en un dominio V_H y un dominio
25 V_{HH} generalmente estará en el rango de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las secuencias más pequeñas y más largas también pueden ser adecuadas para los fines descritos aquí.

En la presente solicitud, a menos que se indique lo contrario, las secuencias de CDR se determinaron de acuerdo con la numeración AbM como se describe en Kontermann y Dübel

(Eds. 2010, Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33-51). Según este método, FR1 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-25, CDR1 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 26-35, FR2 comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-58, FR3 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 59-94, CDR3 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102 y FR4 comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

La determinación de las regiones CDR también se puede realizar de acuerdo con diferentes métodos. En la determinación de CDR según Kabat, FR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-30, CDR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 31-35, FR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-65, FR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 66-94, CDR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102, y FR4 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

En tal secuencia de inmunoglobulina, las secuencias marco pueden ser cualquier secuencia marco adecuada, y los ejemplos de secuencias marco adecuadas serán claros para el experto, por ejemplo, sobre la base de los manuales clásicos y la descripción adicional y la técnica anterior mencionadas en este documento.

Las secuencias marco son preferiblemente (una combinación adecuada de) secuencias marco de inmunoglobulina o secuencias marco que se han derivado de secuencias marco de inmunoglobulina (por ejemplo, por humanización o camelización). Por ejemplo, las secuencias marco pueden ser secuencias marco derivadas de un dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia V_L) y/o de un dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia V_H o secuencia V_{HH}). En un aspecto particularmente preferido, las secuencias marco son secuencias marco que se han derivado de una secuencia V_{HH} (en la que dichas secuencias

marco pueden opcionalmente haber sido parcial o totalmente humanizadas) o son secuencias V_H convencionales que han sido camelizadas (como se define aquí).

En particular, las secuencias marco presentes en la secuencia del ISVD usada en la presente tecnología pueden contener uno o más residuos distintivos (como se define en este documento), de modo que la secuencia del ISVD es un Nanobody®, tal como un V_{HH} , que incluye un V_{HH} humanizado o un V_H camelizado. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de (combinaciones adecuadas de) tales secuencias marco resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en este documento.

Nuevamente, como se describe de forma general en el presente documento para las secuencias de inmunoglobulina, también es posible usar fragmentos adecuados (o combinaciones de fragmentos) de cualquiera de las anteriores, tales como fragmentos que contienen una o más secuencias CDR, convenientemente flanqueadas y/o enlazadas mediante una o más secuencias marco (por ejemplo, en el mismo orden que estas CDR y las secuencias marco pueden aparecer en la secuencia de inmunoglobulina de tamaño completo de la que se deriva el fragmento).

Sin embargo, cabe señalar que la presente tecnología no se limita al origen de la secuencia de ISVD (o de la secuencia de nucleótidos utilizada para expresarla), ni a la forma en que la secuencia de ISVD o la secuencia de nucleótidos es (o ha sido) generada u obtenida. Por tanto, las secuencias de ISVD pueden ser secuencias de origen natural (de cualquier especie adecuada) o secuencias sintéticas o semisintéticas. En un aspecto específico pero no limitante, la secuencia de ISVD es una secuencia de origen natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia sintética o semisintética, que incluye pero no se limita a secuencias de inmunoglobulina "humanizadas" (como se define aquí) (tales como secuencias de inmunoglobulinas de ratón o conejo parcial o totalmente humanizadas, y en particular secuencias de V_{HH} parcial o totalmente humanizadas), secuencias de inmunoglobulinas "camelizadas" (como se define en este documento), así como secuencias de inmunoglobulinas que se han obtenido mediante técnicas tales como maduración por afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulinas sintéticas, aleatorias o naturales), injerto de CDR, modificación superficial, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias

de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR usando cebadores solapantes y técnicas similares para manipular secuencias de inmunoglobulinas bien conocidas por el experto; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de los anteriores.

De manera similar, las secuencias de nucleótidos pueden ser secuencias de nucleótidos de origen natural o secuencias sintéticas o semisintéticas, y pueden ser, por ejemplo, secuencias que se aíslan mediante PCR de un molde de origen natural adecuado (por ejemplo, ADN o ARN aislado de una célula), secuencias de nucleótidos que se han aislado de una biblioteca (y en particular, una biblioteca de expresión), secuencias de nucleótidos que se han preparado mediante la introducción de mutaciones en una secuencia de nucleótidos de origen natural (utilizando cualquier técnica adecuada conocida per se, como la PCR de emparejamiento erróneo), secuencia de nucleótidos que se ha preparado mediante PCR utilizando cebadores solapantes, o secuencias de nucleótidos que se han preparado utilizando técnicas de síntesis de ADN conocidas per se.

Como se describió anteriormente, un ISVD puede ser un Nanobody® o un fragmento adecuado del mismo. Para una descripción general de nanocuerpos, se hace referencia a la descripción adicional que viene a continuación, así como a la técnica anterior citada en este documento. A este respecto, cabe señalar, sin embargo, que esta descripción y la técnica anterior describían principalmente nanocuerpos de la denominada "clase V_H3" (es decir, nanocuerpos con un alto grado de homología de secuencia con secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H3, como DP-47, DP-51 o DP-29). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la presente tecnología en su sentido más amplio generalmente puede usar cualquier tipo de nanocuerpo y, por ejemplo, también usa los nanocuerpos pertenecientes a la denominada "clase V_H4" (es decir, nanocuerpos con un alto grado de homología de secuencia con secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H4 como DP-78), como se describe por ejemplo en el documento WO 2007/118670.

Generalmente, los nanocuerpos (en particular las secuencias V_{HH}, incluidas las secuencias V_{HH} (parcialmente) humanizadas y las secuencias V_H camelizadas) se pueden caracterizar por la presencia de uno o más "residuos distintivos" (como se describe aquí) en una o más de las secuencias marco (nuevamente como se describe con más detalle en el presente documento).

Por lo tanto, generalmente, un nanocuerpo se puede definir como una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

5 en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que uno o más de los residuos distintivos son como se definen adicionalmente en el presente documento.

En particular, un nanocuerpo puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

10 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que las secuencias marco son como se definen adicionalmente en el presente documento.

15 Más en particular, un nanocuerpo puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

20 en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

uno o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Residuos distintivos en nanocuerpos

Posición	V _H 3 humano	Residuos distintivos
11	L, V; predominantemente L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; preferiblemente L
37	V, I, F; usualmente V	F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, preferiblemente F ⁽¹⁾ o Y
44 ⁽⁸⁾	G	E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; preferiblemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q ⁽³⁾ ; lo más preferiblemente G ⁽²⁾ o Q ⁽³⁾ .
45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; preferiblemente L ⁽²⁾ o R ⁽³⁾
47 ⁽⁸⁾	W, Y	F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ o W ⁽²⁾ G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; preferiblemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾
83	R o K; usualmente R	R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; preferiblemente K o R; lo más preferiblemente K
84	A, T, D; predominantemente A	P ⁽⁵⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; preferiblemente P
103	W	W ⁽⁴⁾ , R ⁽⁶⁾ , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P ⁽⁶⁾ , E, C; preferiblemente W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferiblemente G
108	L, M o T; predominantemente L	Q, L ⁽⁷⁾ , R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L ⁽⁷⁾
Notas: (1) (1) En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE o KQRE en las posiciones 43-46.		

- (2) Usualmente como GLEW en las posiciones 44-47.
- (3) Usualmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, e.g. como KEREL, KEREf, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW o KQREG en las posiciones 43-47. Alternativamente, también son posibles secuencias tales como TERE (por ejemplo TEREL), TQRE (por ejemplo TQREL), KECE (por ejemplo KECeL o KECER), KQCE (por ejemplo KQCeL), RERE (por ejemplo REREG), RQRE (por ejemplo RQREL, RQREF o RQREW), QERE (por ejemplo QEREG), QQRE, (por ejemplo QQREW, QQREL o QQREF), KGRE (por ejemplo KGREG), KDRE (por ejemplo KDREV). Algunas otras secuencias posibles, pero menos preferidas, incluyen por ejemplo DECKL y NVCEL.
- (4) Tanto con GLEW en las posiciones 44-47 como con KERE o KQRE en las posiciones 43-46.
- (5) A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de dominios V_{HH} de origen natural.
- (6) En particular, pero no exclusivamente, en combinación con GLEW en las posiciones 44-47.
- (7) Con la condición de que cuando las posiciones 44-47 son GLEW, la posición 108 sea siempre Q en secuencias de V_{HH} (no humanizadas) que también contienen un W en 103.
- (8) El grupo GLEW también contiene secuencias similares a GLEW en las posiciones 44-47, tales como por ejemplo GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER y ELEW.

La presente tecnología, entre otros, usa ISVD que pueden unirse específicamente a $TNF\alpha$ o OX40L. En el contexto de la presente tecnología, "unión a" una determinada molécula diana tiene el significado habitual en la técnica como se entiende en el contexto de los anticuerpos y sus respectivos antígenos.

El polipéptido de la presente tecnología puede comprender dos o más ISVD que se unen específicamente a $TNF\alpha$ y dos o más ISVD que se unen específicamente a OX40L. Por ejemplo,

el polipéptido puede comprender dos ISVD que se unen específicamente a TNF α y dos ISVD que se unen específicamente a OX40L.

En algunas realizaciones, al menos un ISVD puede bloquear funcionalmente su molécula diana. Por ejemplo, los ISVD pueden bloquear la interacción entre TNF α y TNFR (receptor de TNF) o pueden bloquear la interacción entre OX40L y OX40 (receptor) e inhibir preferiblemente la liberación de IL2 inducida por OX40L de las células T. En consecuencia, en una realización preferida, el polipéptido de la presente tecnología comprende al menos dos ISVD que se unen específicamente a TNF α y bloquean funcionalmente su interacción con TNFR, y dos ISVD que se unen específicamente a OX40L y bloquean funcionalmente su interacción con OX40.

Los ISVD usados en la presente tecnología forman parte de un polipéptido de la presente tecnología, que comprende o consiste en al menos cuatro ISVD, de manera que el polipéptido puede unirse específicamente a TNF α y OX40L.

Por consiguiente, las moléculas diana de los al menos cuatro ISVD que se usan en el polipéptido de la presente tecnología son TNF α y OX40L. Los ejemplos son TNF α y OX40L de mamífero. Aunque se prefieren el TNF α humano (acceso Uniprot P01375) y el OX40L humano (acceso Uniprot P23510), las versiones de otras especies también son adecuadas para la presente tecnología, por ejemplo TNF α e IL-23 de ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, caballos, cerdos, primates no humanos, tales como monos cynomolgus (también denominados aquí como "cino"), o camélidos, tales como llama o alpaca.

Los ejemplos específicos de ISVD que se unen específicamente a TNF α u OX40L que se pueden usar en la presente tecnología son los que se describen en los siguientes puntos A y B:

A. Un ISVD que se une específicamente a OX40L humano y comprende

- i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 7;
- ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 10; y

- iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13, preferiblemente una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Los ejemplos preferidos de tal ISVD que se une específicamente a OX40L humano tienen una o más regiones marco (y preferiblemente todas) que se indican para la construcción 1E07/1 en la Tabla A-2 (además de las CDR que se definen en el punto A anterior), y el más preferido es un ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 1E07/1 (SEQ ID NO: 2 o 3, véase Tabla A-1 y A-2).

También en una realización preferida, la secuencia de aminoácidos del ISVD que se une específicamente al OX40L humano puede tener una identidad de secuencia de más del 90%, tal como más del 95% o más del 99%, con SEQ ID NO: 2 o 3, en donde opcionalmente las CDR son como se definen en el punto anterior A. En particular, el ISVD que se une específicamente a OX40L tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 3.

Cuando un ISVD que se une específicamente a OX40L tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia de CDR de referencia correspondiente (punto A anterior), el ISVD preferiblemente tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, más preferiblemente al menos la misma afinidad de unión a OX40L humano que la construcción 1E07/1 representada en SEQ ID NO: 2 o 3, en donde la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

B. Un ISVD que se une específicamente a TNF α humano y comprende

- i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 8;
- ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11; y
- iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14,

preferiblemente una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

Los ejemplos preferidos de tal ISVD que se une específicamente a TNF α humano tienen una o más regiones marco (y preferiblemente todas) como se indica para la construcción 1C02/1 en la Tabla A-2 (además de las CDR que se definen en el punto B anterior), y el más preferido es un ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 1C02/1 (SEQ ID NO: 4 o 6, véase Tabla A-1 y A-2).

También en una realización preferida, la secuencia de aminoácidos de un ISVD que se une específicamente al TNF α humano puede tener una identidad de secuencia de más del 90%, tal como más del 95% o más del 99%, con SEQ ID NO: 4 o 6, en donde opcionalmente las CDR son como se definen en el punto B anterior. En particular, el ISVD que se une específicamente al TNF α humano comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4 o 6.

Cuando tal ISVD que se une específicamente al TNF α humano tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia de CDR de referencia correspondiente (punto B anterior), el ISVD preferiblemente tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, más preferiblemente al menos la misma afinidad de unión al TNF α humano que la construcción 1C02/1 representada en SEQ ID NO: 4 o 6, en donde la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

Preferiblemente, cada uno de los ISVD definidos en los puntos A y B anteriores está comprendido en el polipéptido de la presente tecnología.

Tal polipéptido de la presente tecnología que comprende cada uno de los ISVD como se define en los puntos A y B anteriores tiene preferiblemente al menos la mitad de la afinidad de unión, más preferiblemente al menos la misma afinidad de unión, al OX40L humano y al TNF α humano que un polipéptido que consiste en el aminoácido de SEQ ID NO: 1, en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

Las SEQ ID NO a las que se hace referencia en los puntos A y B anteriores se basan en la definición de CDR según la definición de AbM (véase Tabla A-2). Se observa que las SEQ ID NO que definen las mismas CDR de acuerdo con la definición de Kabat (ver Tabla A-2.1) también se pueden usar en los puntos A y B anteriores.

- 5 En consecuencia, los ejemplos específicos de ISVD que se unen específicamente a TNF α o OX40L que se pueden usar en la presente tecnología son los descritos anteriormente usando la definición de AbM y también se pueden describir usando la definición de Kabat como se establece en los puntos A 'a B' a continuación:

A'. Un ISVD que se une específicamente a OX40L humano y comprende

- 10 i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 28;
- ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 31; y
- 15 iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13,
- preferiblemente una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Los ejemplos preferidos de tal ISVD que se une específicamente a OX40L humano tienen una o más regiones marco (y preferiblemente todas) indicadas para la construcción 1E07/1 en la

20 Tabla A-2-1 (además de las CDR que se definen en el punto A' anterior), y el más preferido es un ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 1E07/1 (SEQ ID NO: 2 o 3, véase Tabla A-1 y A-2-1).

B'. Un ISVD que se une específicamente a TNF α humano y comprende

- 25 i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 29;

- ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 32; y
 - iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14,
- 5 preferiblemente una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

Los ejemplos preferidos de tal ISVD que se une específicamente a TNF α humano tienen una o más regiones marco (y preferiblemente todas) indicadas para la construcción 1C02/1 en la

10 Tabla A-2-1 (además de las CDR que se definen en el punto B' anterior), y el más preferido es un ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 1C020/1 (SEQ ID NO: 4 o 6, véase Tabla A-1 y A-2-1).

El porcentaje de "*identidad de secuencia*" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos se puede calcular dividiendo [*el número de residuos de*

15 *aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos*] entre [*el número total de residuos de aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos*] y multiplicando por [100%], en el que cada delección, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos, en comparación con la

20 primera secuencia de aminoácidos, se considera una diferencia en un único residuo de aminoácido (es decir, en una única posición).

Usualmente, con el fin de determinar el porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos de acuerdo con el método de cálculo descrito anteriormente, se tomará como "primera" secuencia de aminoácidos la secuencia de aminoácidos con mayor

25 número de residuos de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la "segunda" secuencia de aminoácidos.

Una "diferencia de aminoácidos" como se usa en este documento se refiere a una delección, inserción o sustitución de un único residuo de aminoácido con respecto a una secuencia de referencia, y preferiblemente es una sustitución.

Las sustituciones de aminoácidos son preferiblemente sustituciones conservativas. Tales sustituciones conservativas son preferiblemente sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) - (e) está sustituido por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) residuos alifáticos pequeños, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares cargados negativamente y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) residuos alifáticos no polares grandes: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

Las sustituciones conservativas particularmente preferidas son las siguientes: Ala en Gly o en Ser; Arg en Lys; Asn en Gln o en His; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; Ile en Leu o en Val; Leu en Ile o en Val; Lys en Arg, en Gln o en Glu; Met en Leu, en Tyr o en Ile; Phe en Met, en Leu o en Tyr; Ser en Thr; Thr en Ser; Trp en Tyr; Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en Ile o en Leu.

5.2 Especificidad

Los términos "*especificidad*", "*unir específicamente*" o "*unión específica*" se refieren al número de moléculas diana diferentes, tales como antígenos, del mismo organismo al que puede unirse una unidad de unión particular, tal como un ISVD, con una afinidad suficientemente alta (véase más abajo). "*Especificidad*", "*unir específicamente*" o "*unión específica*" se usan aquí indistintamente con "*selectividad*", "*unir selectivamente*" o "*unión selectiva*". Las unidades de unión, como los ISVD, preferiblemente se unen específicamente a sus dianas designadas.

La especificidad/selectividad de una unidad de unión se puede determinar basándose en la afinidad. La afinidad denota la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se expresa comúnmente como KD, o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también se puede expresar como una constante de asociación, KA, que es igual a 1/KD y tiene unidades de (mol/litro)⁻¹ (o M⁻¹).

La afinidad es una medida de la fuerza de unión entre una fracción y un sitio de unión en la molécula diana: cuanto menor es el valor de KD, más fuerte es la fuerza de unión entre una molécula diana y una fracción que se une a la diana.

Típicamente, las unidades de unión usadas en la presente tecnología (tales como los ISVDs) se unirán a sus dianas con una constante de disociación (KD) de 10^{-5} to 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (KA) de 10^5 a 10^{12} litro/moles o más, y preferiblemente 10^7 a 10^{12} litro/moles o más, y más preferiblemente 10^8 a 10^{12} litro/moles).

Cualquier valor de KD mayor que 10^{-4} mol/litro (o cualquier valor de KA menor que 10^4 litros/mol) generalmente se considera que indica unión no específica.

La KD para interacciones biológicas, como la unión de secuencias de inmunoglobulina a un antígeno, que se consideran específicas, se encuentra típicamente en el intervalo de 10^{-5} moles/litro (10000 nM o $10\mu\text{M}$) to 10^{-12} moles/litro (0.001 nM o 1 pM) o menos.

En consecuencia, la unión específica/selectiva puede significar que - utilizando el mismo método de medición, p. ej. SPR - una unidad de unión (o polipéptido que la comprende) se une a TNF α y/o OX40L con un valor KD de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y se une a citoquinas relacionadas con un valor de KD mayor que 10^{-4} moles/litro. Ejemplos de dianas relacionadas con OX40L son TRAIL, CD30L, CD40L y RANKL humanos. Ejemplos de citoquinas relacionadas para TNF α son miembros de la superfamilia de TNF FASL, TNF β , LIGHT, TL-1A, RANKL. Por tanto, en una realización de la presente tecnología, al menos dos ISVD comprendidos en el polipéptido se unen a TNF α con un valor KD de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y se unen a FASL, TNF β , LIGHT, TL-1A, RANKL de la misma especie con un valor KD mayor que 10^{-4} moles/litro, y al menos dos ISVD comprendidos en el polipéptido se unen a OX40L con un valor KD de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y se unen a TRAIL, CD30L, CD40L y RANKL humanos de la misma especie con un valor KD mayor que 10^{-4} moles/litro.

Así, el polipéptido de la presente tecnología tiene preferiblemente al menos la mitad de la afinidad de unión, más preferiblemente al menos la misma afinidad de unión, al TNF α humano y al OX40L humano en comparación con un polipéptido que consiste en el aminoácido de SEQ ID NO: 1, en donde la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

La unión específica a una determinada diana de una determinada especie no excluye que la unidad de unión también pueda unirse específicamente a la diana análoga de una especie diferente. Por ejemplo, la unión específica a TNF α humano no excluye que la unidad de unión (o un polipéptido que lo comprenda) también pueda unirse específicamente a TNF α de monos cynomolgus. Asimismo, por ejemplo, la unión específica a OX40L humano no excluye que la unidad de unión (o un polipéptido que lo comprenda) también pueda unirse específicamente a OX40L de monos cynomolgus. ("cino").

La unión específica de una unidad de unión a su diana designada se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida per se, incluido, por ejemplo, el análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas per se en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en este documento.

La constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente, como será evidente para el experto. Los métodos para determinar la constante de disociación serán claros para el experto y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas a continuación. A este respecto, también quedará claro que puede que no sea posible medir constantes de disociación de más de 10^{-4} moles/litro o 10^{-3} moles/litro (e.g. de 10^{-2} moles/litro). Opcionalmente, como también será evidente para el experto en la materia, la constante de disociación (real o aparente) se puede calcular sobre la base de la constante de asociación (real o aparente) (K_A), por medio de la relación [$K_D = 1/K_A$].

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas se puede medir mediante diferentes técnicas conocidas per se, como la conocida técnica de biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) (véase, por ejemplo, Ober et al. 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559). El término "resonancia de plasmón superficial", como se usa en este documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, donde una molécula se inmoviliza en el chip del biosensor y la otra molécula se hace pasar sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo produciendo mediciones de k_{on} , k_{off} y, por tanto, valores de K_D (o K_A). Esto se puede realizar, por ejemplo,

utilizando el conocido sistema BIAcore® (BIAcore International AB, una empresa de GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para otras descripciones, véase Jonsson et al. (1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26), Jonsson et al. (1991 Biotechniques 11: 620-627), Johnsson et al. (1995, J. Mol. Recognit. 8: 125-131), y Johnson et al. (1991, Anal. Biochem. 198: 268-277).

Otra técnica de biosensor muy conocida para determinar las afinidades de las interacciones biomoleculares es la interferometría de biocapa. (BLI) (véase, por ejemplo, Abdiche et al. 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217). El término "interferometría de biocapa" o "BLI", como se usa en este documento, se refiere a una técnica óptica sin etiquetas que analiza el patrón de interferencia de la luz reflejada desde dos superficies: una capa de referencia interna (haz de referencia) y una capa de proteína inmovilizada en la punta del biosensor (haz de señal). Un cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia, dado a conocer como un cambio de longitud de onda (nm), cuya magnitud es una medida directa del número de moléculas unidas a la superficie de la punta del biosensor. Dado que las interacciones se pueden medir en tiempo real, se pueden determinar las velocidades y afinidades de asociación y disociación. El BLI se puede realizar, por ejemplo, utilizando los conocidos sistemas Octet® (ForteBio, una división de Pall Life Sciences, Menlo Park, EE. UU.).

Alternativamente, las afinidades se pueden medir en el ensayo de exclusión cinética (KinExA) (véase, por ejemplo, Drake et al. 2004, Anal. Biochem., 328: 35-43), utilizando la plataforma KinExA® (Sapidyne Instruments Inc, Boise, EE. UU.). El término "KinExA", como se usa en este documento, se refiere a un método basado en solución para medir la verdadera afinidad de unión en equilibrio y la cinética de moléculas no modificadas. Las soluciones equilibradas de un complejo anticuerpo/antígeno se hacen pasar por una columna con perlas previamente recubiertas con antígeno (o anticuerpo), lo que permite que el anticuerpo (o antígeno) libre se una a la molécula recubierta. La detección del anticuerpo (o antígeno) así capturado se logra con una proteína marcada con fluorescencia que se une al anticuerpo (o antígeno).

El sistema de inmunoensayo GYROLAB® proporciona una plataforma para el bioanálisis automatizado y la entrega rápida de muestras (Fraley et al. 2013, Bioanalysis 5: 1765-74).

5.3 Extensión de semivida (*in vivo*)

El polipéptido puede comprender además uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de unión, opcionalmente conectadas a través de uno o más conectores peptídicos, en donde dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión proporcionan al polipéptido una semivida aumentada (*in vivo*), en comparación con el polipéptido correspondiente sin dichos uno o más de otros grupos, residuos, fracciones o unidades de unión. La extensión de la semivida *in vivo* significa, por ejemplo, que el polipéptido tiene una semivida aumentada en un mamífero, tal como un sujeto humano, después de la administración. La semivida se puede expresar, por ejemplo, como $t_{1/2\beta}$.

El tipo de grupos, residuos, fracciones o unidades de unión no está generalmente restringido y pueden elegirse, por ejemplo, del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas de suero o fragmentos de estas, unidades de unión que se pueden unir a proteínas del suero, una porción de Fc, y pequeñas proteínas o péptidos que se pueden unir a proteínas del suero.

Más específicamente, dicho uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de unión que proporcionan al polipéptido semivida aumentada pueden elegirse del grupo que consiste en unidades de unión que se pueden unir a seralbúmina, tal como seralbúmina humana, o a una inmunoglobulina del suero, como IgG, y preferiblemente es una unidad de unión que puede unirse a una seralbúmina humana. La unidad de unión es preferiblemente un ISVD.

Por ejemplo, el documento WO 04/041865 describe la unión de Nanobodies® a la seralbúmina (y en particular contra la seralbúmina humana) que se puede unir a otras proteínas (tales como uno o más nanocuerpos que se unen a una diana deseada) para aumentar la semivida de dicha proteína.

La solicitud internacional WO 06/122787 describe varios Nanobodies® contra albúmina de suero (humano). Estos Nanobodies® incluyen el Nanobody® llamado Alb-1 (SEQ ID NO: 52 en WO 06/122787) y variantes humanizadas del mismo, tales como Alb-8 (SEQ ID NO: 62 en WO 06/122787). Nuevamente, estos pueden usarse para extender la semivida de proteínas y polipéptidos terapéuticos y otras entidades o fracciones terapéuticas.

Además, el documento WO2012/175400 describe una versión mejorada adicional de Alb-1, llamada Alb-23.

En una realización preferida, el polipéptido comprende un resto de unión a albúmina sérica seleccionada de Alb-1, Alb-3, Alb-4, Alb-5, Alb-6, Alb-7, Alb-8, Alb-9, Alb-10 y Alb-23, preferiblemente Alb-8 o Alb-23 o sus variantes, como se muestra en las páginas 7-9 de WO2012/175400 y los aglutinantes de albúmina descritos en WO2012/175741, WO2015/173325, WO2017/080850, WO2017/085172, WO2018/104444, WO2018/134235, WO2018/134234. En la Tabla A-4 también se muestran algunos quelantes de albúmina sérica preferidos. Un componente adicional particularmente preferido del polipéptido de la presente tecnología es como se describe en el punto C:

C. Un ISVD que se une a seralbúmina humana y comprende

- i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 9;
- ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 12; y
- iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15;

preferiblemente una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

Los ejemplos preferidos de tal ISVD que se une a seralbúmina humana tienen una o más regiones marco (y preferiblemente todas) indicadas para la construcción ALB23002 en la Tabla A-2 (además de las CDR que se definen en el punto C anterior), y el más preferido es un ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos completa de la construcción ALB23002 (SEQ ID NO: 5, véase Tabla A-1 y A-2).

El punto C también se puede describir utilizando la definición de Kabat como:

C'. Un ISVD que se une a seralbúmina humana y comprende

- i. una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 o tiene dos o una diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 30;
- ii. una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 o tiene dos o una diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 33; y
- 5 iii. una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o tiene dos o una diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15;

preferiblemente una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

10 Los ejemplos preferidos de tal ISVD que se une a la seralbúmina humana tienen una o más, y preferiblemente todas, las regiones marco indicadas para la construcción ALB23002 en la Tabla A-2.1 (además de las CDR que se definen en el punto C' anterior), y el más preferido es un ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos completa de la construcción ALB23002 (SEQ ID NO: 5, véase Tabla A-1 y A-2.1).

15 También en una realización preferida, la secuencia de aminoácidos de un ISVD que se une a la seralbúmina humana puede tener una identidad de secuencia de más del 90%, tal como más del 95% o más del 99%, con SEQ ID NO: 5, en donde opcionalmente las CDR son como se definen en el ítem anterior C. En particular, la unión de ISVD a seralbúmina humana comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

20 Cuando dicha unión de ISVD a seralbúmina humana tiene una diferencia de 2 o 1 aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia de CDR de referencia correspondiente (punto C anterior), el ISVD tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, preferiblemente al menos la misma afinidad de unión por la seralbúmina humana que la construcción ALB23002 representada en SEQ ID NO: 5, en donde la afinidad de unión se mide usando el mismo
25 método, tal como SPR.

Cuando tal unión de ISVD a seralbúmina humana comprende una posición en el extremo C, exhibe una extensión de alanina (A) o glicina (G) en el extremo C y se selecciona preferiblemente de las SEQ ID NO: 46, 47, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56 y 58 (véase la tabla A-4

más abajo). En una realización preferida, el ISVD que se une a seralbúmina humana comprende otra posición que no es la posición en el extremo C (es decir, no es el ISVD en el extremo C del polipéptido de la presente tecnología) y se selecciona de las SEQ ID NO: 5, 44, 45, 48 y 50 (véase tabla A-4 más adelante).

5 5.4 Moléculas de ácido nucleico

También se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología.

Una "molécula de ácido nucleico" (usada indistintamente con "ácido nucleico") es una cadena de monómeros de nucleótidos unidos entre sí mediante un esqueleto de fosfato para formar una secuencia de nucleótidos. Un ácido nucleico puede usarse para transformar/transfectar una célula huésped u organismo huésped, p. ej., para la expresión y/o producción de un polipéptido. Los huéspedes o células huésped adecuados para fines de producción serán claros para el experto y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariótica o eucariótica adecuada o cualquier organismo fúngico, procariótico o eucariótico adecuado. Un huésped o una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología también está incluida en la presente tecnología.

Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN, ARN o un híbrido de los mismos, y también puede comprender nucleótidos modificados (por ejemplo, químicamente), como PNA. Puede ser monocatenario o bicatenario, y está preferiblemente en forma de ADN bicatenario. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la presente tecnología pueden ser ADN genómico, ADNc.

Los ácidos nucleicos de la presente tecnología se pueden preparar u obtener de una manera conocida per se y/o se pueden aislar de una fuente natural adecuada. Las secuencias de nucleótidos que codifican (poli)péptidos de origen natural se pueden someter, por ejemplo, a mutagénesis dirigida al sitio, para proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido con variación de secuencia. Además, como será evidente para el experto en la materia, para preparar un ácido nucleico, también se pueden unir entre sí de manera adecuada varias secuencias de nucleótidos, tal como al menos una secuencia de nucleótidos

que codifica una fracción que se dirige a la diana y, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican uno o más conectores.

Las técnicas para generar ácidos nucleicos resultarán claras para el experto y pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, síntesis automatizada de ADN; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más secuencias sintéticas y/o de origen natural (o dos o más partes de las mismas), introducción de mutaciones que conducen a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que pueden ser fácilmente digeridas y/o ligadas usando enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones por medio de una reacción de PCR usando uno o más cebadores "emparejados incorrectamente".

5.5 Vectores

También se proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología. Un vector como se usa en este documento es un vehículo adecuado para transportar material genético a una célula. Un vector incluye ácidos nucleicos desnudos, como plásmidos o ARNm, o ácidos nucleicos incrustados en una estructura más grande, como liposomas o vectores virales.

Los vectores comprenden generalmente al menos un ácido nucleico que está opcionalmente unido a uno o más elementos reguladores, como por ejemplo uno o más promotores, potenciadores, terminadores, etc. adecuados). El vector es preferiblemente un vector de expresión, es decir, un vector adecuado para expresar un polipéptido codificado o una construcción en condiciones adecuadas, p. ej. cuando el vector se introduce en una célula (por ejemplo, humana). Para los vectores basados en ADN, esto generalmente incluye la presencia de elementos para la transcripción (por ejemplo, un promotor y una señal poliA) y la traducción (por ejemplo, la secuencia de Kozak).

Preferiblemente, en el vector, dicho al menos un ácido nucleico y dichos elementos reguladores están "operativamente conectados" entre sí, lo que generalmente significa que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor se considera "operativamente conectado" a una secuencia codificante si dicho promotor es capaz de iniciar

o también de controlar/regular la transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en la que debe entenderse que dicha secuencia codificante está "bajo el control de" dicho promotor). Generalmente, cuando dos secuencias de nucleótidos están operativamente conectadas, estarán en la misma orientación y usualmente también en el mismo marco de lectura. Por lo general, también serán esencialmente contiguos, aunque esto también puede no ser necesario.

Preferiblemente, cualquier elemento regulador del vector es tal que es capaz de proporcionar su función biológica deseada a la célula huésped u organismo huésped deseado.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debería ser "operable" en la célula huésped u organismo huésped pretendido, lo que significa que, por ejemplo, dicho promotor debería ser capaz de iniciar o también de controlar/regular la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos - p. ej. una secuencia codificante - a la que está operativamente enlazado.

5.6 Composiciones

La presente tecnología también proporciona una composición que comprende al menos un polipéptido de la presente tecnología, al menos una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente tecnología o al menos un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. La composición puede ser una composición farmacéutica. La composición puede comprender además al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, comprender uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

5.7 Organismos huésped

La presente tecnología también se refiere a células huésped u organismos huésped que comprenden el polipéptido de la presente tecnología, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología y/o el vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología.

Las células hospedadoras u organismos hospedadores adecuados son claros para el experto y son, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o

cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Los ejemplos específicos incluyen células HEK293, células CHO, *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*. El huésped más preferido es *Pichia pastoris*.

5.8 Métodos y usos del polipéptido

- 5 La presente tecnología también proporciona un método para producir el polipéptido de la presente tecnología. El método puede comprender transformar/transfectar una célula huésped u organismo huésped con un ácido nucleico que codifica el polipéptido, expresando el polipéptido en el huésped, opcionalmente seguido de una o más etapas de aislamiento y/o purificación. Específicamente, el método puede comprender:
- 10 a) expresar, en una célula huésped u organismo huésped adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido; opcionalmente seguida de:
- b) aislar y/o purificar el polipéptido.

Las células huésped u organismos huésped adecuados para fines de producción serán claros para el experto en la materia y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariótica o eucariótica adecuada o cualquier organismo fúngico, procariótico o eucariótico adecuado. Los ejemplos específicos incluyen células HEK293, células CHO, *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*. El huésped más preferido es *Pichia pastoris*.

El polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o un vector como se describe, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, la molécula de ácido nucleico o el vector -preferiblemente el polipéptido o una composición que comprende el mismo- son útiles como medicamento.

Por consiguiente, la presente tecnología proporciona el polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o un vector como se describe, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, la molécula de ácido nucleico o el vector para uso como medicamento.

También se proporciona el polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o un vector como se describe, o una composición que comprende el polipéptido de

la presente tecnología, la molécula de ácido nucleico o el vector para su uso en el tratamiento (profiláctico o terapéutico) de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria.

Se proporciona además un método (profiláctico y/o terapéutico) para tratar una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria, en donde dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa del polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o un vector como se describe, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, la molécula de ácido nucleico o el vector.

Se proporciona además el uso del polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o un vector como se describe, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, la molécula de ácido nucleico o el vector en la preparación de una composición farmacéutica, preferiblemente para tratar una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria.

La enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria puede ser, por ejemplo, artritis reumatoide; enfermedad intestinal inflamatoria, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; psoriasis, hidradenitis supurativa; y enfermedad de injerto contra huésped.

Un "sujeto" como se menciona en el contexto de la presente tecnología puede ser cualquier animal, preferiblemente un mamífero. Entre los mamíferos, se puede hacer una distinción entre seres humanos y mamíferos no humanos. Los animales no humanos pueden ser, por ejemplo, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos), ganado (por ejemplo, animales bovinos, equinos, ovinos, caprinos o porcinos) o animales utilizados generalmente con fines de investigación y/o para producir anticuerpos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, caballos, cerdos, primates no humanos, como monos cynomolgus, o camélidos, como llama o alpaca).

En el contexto de propósitos profilácticos y/o terapéuticos, el sujeto puede ser cualquier animal, y más específicamente cualquier mamífero, pero preferiblemente es un sujeto humano.

Las sustancias (incluidos polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y vectores) o composiciones pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo, por administración enteral (tal como oral o rectal) o parenteral (tal como epicutánea, sublingual, bucal, nasal, intraarticular, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, transdérmica o transmucosa). Se prefiere la administración parenteral, tal como la administración intramuscular, subcutánea o intradérmica. La más preferida es la administración subcutánea.

Se puede administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido, una molécula de ácido nucleico o un vector como se describe, o una composición que comprende el polipéptido, la molécula de ácido nucleico o el vector a un sujeto para proporcionar los resultados del tratamiento pretendidos.

Se pueden administrar una o más dosis. Si se administra más de una dosis, las dosis se pueden administrar en intervalos adecuados para maximizar el efecto del polipéptido, de la composición, de la molécula de ácido nucleico o del vector.

Tabla A-1: Secuencias de aminoácidos de los diferentes bloques de construcción V_{HH} monovalentes identificados dentro del polipéptido pentavalente F027300252 ("ID" se refiere al SEQ ID NO usado aquí)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
1E07/1 (bloque de construcción 1)	2	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAKGWFRQAPGKER EFVAAISRSGRSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAL YYCAAVGGATTVTASEWDYWGQGTLVTVSS
1E07/1 (bloque de construcción 2)	3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAKGWFRQAPGKER EFVAAISRSGRSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAL YYCAAVGGATTVTASEWDYWGQGTLVTVSS
1C02/1 (bloque de construcción 3)	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKG LEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCARSPSGFN RGQGTLVTVSS
ALB23002 (bloque de construcción 4)	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWWSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
1C02/1 (bloque de construcción 5)	6	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKG LEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCARSPSGFN RGQGTLVKVSS

Tabla A-2: Secuencias para CDR de acuerdo con los marcos y la numeración de AbM ("ID" se refiere al SEQ ID NO dado)

ID	V _{HH}	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
2	1E07/1_B B1	16	DVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AAS	7	GRTFSSY AKG	18	WFRQAPGK EREFVA	10	AISRSG RSTS	21	YADSVKGRFTISRDN SKNT VYLQMNSLRPEDTALYYC AA	13	VGGATTVTAS EWDY	24	WGQGTL VTVSS
3	1E07/1_B B2	17	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AAS	7	GRTFSSY AKG	18	WFRQAPGK EREFVA	10	AISRSG RSTS	21	YADSVKGRFTISRDN SKNT VYLQMNSLRPEDTALYYC AA	13	VGGATTVTAS EWDY	24	WGQGTL VTVSS
4	1C02/1_B B3	17	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AAS	8	GFTFSDY WMY	19	WVRQAPGK GLEWVS	11	EINTNG LITK	22	YPDSVKGRFTISRDN AKNT LYLQMNSLRPEDTALYYCA R	14	SPSGFN	25	RGQGTL VTVSS
5	ALB23002	17	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AAS	9	GFTFRSF GMS	20	WVRQAPGK GPEWVS	12	SISGSGS DTL	23	YADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTALYYCT I	15	GGSLSR	26	SSQGTLV TVSS
6	1C02/1_B B5	17	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AAS	8	GFTFSDY WMY	19	WVRQAPGK GLEWVS	11	EINTNG LITK	22	YPDSVKGRFTISRDN AKNT LYLQMNSLRPEDTALYYCA R	14	SPSGFN	27	RGQGTL VKVSS

Tabla A-2.1: Secuencias para CDR de acuerdo con los marcos y la numeración de Kabat ("ID" se refiere a SEQ ID NO)

ID	V _{HH}	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
2	1E07/1_B B1	34	DVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AASGRTFS	28	SIYAKG	38	WFRQAPGK EREFVA	31	AISRSGR STSYADS VKG	41	RFTISRDNSKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAA	13	VGGATTVTAS EWDY	24	WGQGTL VTVSS
3	1E07/1_B B2	35	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AASGRTFS	28	SIYAKG	38	WFRQAPGK EREFVA	31	AISRSGR STSYADS VKG	41	RFTISRDNSKNTVYLQM NSLRPEDTALYYCAA	13	VGGATTVTAS EWDY	24	WGQGTL VTVSS
4	1C02/1_B B3	36	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AASGFTFS	29	DYWMY	39	WVRQAPGK GLEWVS	32	EINTNGL ITKYPDS VKG	42	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLRPEDTALYYCAR	14	SPSGFN	25	RGQGTL VTVSS
5	ALB23002	37	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AASGFTFR	30	SFGMS	40	WVRQAPGK GPEWVS	33	SISGSGS DTLYADS VKG	43	RFTISRDNSKNTLYLQMN SLRPEDTALYYCTI	15	GGSLSR	26	SSQGTLV TVSS
6	1C02/1_B B5	36	EVQLVESGGGV VQPGGSLRLSC AASGFTFS	29	DYWMY	39	WVRQAPGK GLEWVS	32	EINTNGL ITKYPDS VKG	42	RFTISRDNAKNTLYLQM NSLRPEDTALYYCAR	14	SPSGFN	27	RGQGTL VKVSS

Tabla A-3: Secuencias de aminoácidos del polipéptido multivalente seleccionado ("ID" se refiere a SEQ ID NO)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
F027300252	1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAKGWFRQAPGKEREFVAAISRSGRSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYC AAVGGATTVTASEWDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAKGWFRQAPGKEREFVAAISRSGRST SYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAVGGATTVTASEWDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR PEDTALYYCTIGGSLRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITK YPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCARSPSGFN RGQGT LVKVSSA

Tabla A-4: Secuencias de ISVD de unión a albúmina sérica ("ID" se refiere a SEQ ID NO como se usa en este documento)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Alb8	44	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23	45	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSS
Alb129	46	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	47	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb11	48	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSS
Alb11 (S112K)-A	49	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSRSSQGTLVKVSSA
Alb82	50	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSS

Alb82-A	51	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb82-AA	52	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSAA
Alb82-AAA	53	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSAAA
Alb82-G	54	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSG
Alb82-GG	55	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSGG
Alb82- GGG	56	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSGGG
Alb23002	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSS
Alb223	58	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSSA

Tabla A-5: Secuencias de conectores ("ID" se refiere a SEQ ID NO como se usa en este documento)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
conector 3A	59	AAA
conector 5GS	60	GGGGS
conector 7GS	61	SGGS
conector 8GS	62	GGGS
conector 9GS	63	GGGS
conector 10GS	64	GGGS
conector 15GS	65	GGGS
conector 18GS	66	GGGS
conector 20GS	67	GGGS
conector 25GS	68	GGGS
conector 30GS	69	GGGS
conector 35GS	70	GGGS
conector 40GS	71	GGGS
bisagra G1	72	EPKSCDKTHTCPPCP
bisagra 9GS-G1	73	GGGS
región bisagra larga superior de Llama	74	EPKTPKPQAAA
bisagra G3	75	ELKTP LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCP

6 Ejemplos

6.1 Ejemplo 1: Generación de construcciones de ISVD multiespecíficas

La identificación de la unión del polipéptido F027300252 (SEQ ID NO: 1) que contiene ISVD a TNF α y OX40L fue el resultado de una campaña de formateo e ingeniería multiespecífica basada en datos en la que se incluyeron bloques de construcción de V_{HH} anti-TNF α (TNF06C11 (WO2017081320), TNF01C02 (WO2015173325, SEQ ID NO: 327), y VHH#3 (WO2004041862)), bloques de construcción de V_{HH} anti-OX40L (OX40L1E07, OX40L1B11 y OX40L15B07, véase WO2011073180)) y bloque de construcción de V_{HH} anti-HSA ALB23002 (véase WO2017134234, SEQ ID NO:10/WO2018131234). Se aplicaron diferentes posiciones/orientaciones de los bloques de construcción y diferentes longitudes de conector (9GS, 20GS vs 35GS) y demostraron ser críticas para diferentes parámetros (potencia, reactividad cruzada, expresión, etc.). La potencia en este contexto se refiere a la inhibición de la activación de NF κ B inducida por TNF α y a la inhibición de la coestimulación de células T inducida por OX40L in vitro como se ensayó en los Ejemplos 7 y 9.

Se transformó un panel de 84 construcciones (Tabla 2) en *Pichia pastoris* para producciones a pequeña escala. La inducción de la expresión de la construcción ISVD se produjo mediante la adición escalonada de metanol. Se utilizó medio clarificado con la construcción de ISVD secretada como material de partida para la purificación mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguida de desalación. Las muestras purificadas se utilizaron para la caracterización funcional y la evaluación de expresión.

Tabla 2: Listado de los 84 diferentes formatos de ISVD multiespecíficos evaluados. BB = bloque de construcción, ALB = ALB23002.

Construcción ID	BB1	conec- tor 1	BB2	conec- tor 2	BB3	conec- tor 3	BB4	conec- tor 4	BB5
F027300010	6C11	35GS	ALB	35GS	1E07/1	35GS	1E07/1		
F027300011	6C11	35GS	ALB	35GS	1B11	35GS	1B11		
F027300012	6C11	35GS	ALB	35GS	15B07	35GS	15B07		
F027300013	1E07/1	35GS	ALB	35GS	1E07/1	35GS	6C11		
F027300014	1B11	35GS	ALB	35GS	1B11	35GS	6C11		
F027300015	15B07	35GS	ALB	35GS	15B07	35GS	6C11		
F027300016	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	ALB	35GS	6C11		
F027300017	1B11	35GS	1B11	35GS	ALB	35GS	6C11		
F027300018	15B07	35GS	15B07	35GS	ALB	35GS	6C11		
F027300019	6C11	35GS	1E07/1	35GS	ALB	35GS	1E07/1		

F027300020	6C11	35GS	1B11	35GS	ALB	35GS	1B11		
F027300021	6C11	35GS	15B07	35GS	ALB	35GS	15B07		
F027300022	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	6C11	35GS	ALB		
F027300023	1B11	35GS	1B11	35GS	6C11	35GS	ALB		
F027300024	15B07	35GS	15B07	35GS	6C11	35GS	ALB		
F027300025	6C11	35GS	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	ALB		
F027300026	6C11	35GS	1B11	35GS	1B11	35GS	ALB		
F027300027	6C11	35GS	15B07	35GS	15B07	35GS	ALB		
F027300028	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1
F027300029	1B11	35GS	1B11	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1
F027300030	15B07	35GS	15B07	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1
F027300031	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
F027300032	1B11	35GS	1B11	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
F027300033	15B07	35GS	15B07	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
F027300034	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	35GS	1E07/1	35GS	1E07/1
F027300035	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	35GS	1B11	35GS	1B11
F027300036	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	35GS	15B07	35GS	15B07
F027300037	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	1E07/1	35GS	1E07/1
F027300038	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	1B11	35GS	1B11
F027300039	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	15B07	35GS	15B07
F027300213	1B11	35GS	ALB	35GS	6C11				
F027300214	1B11	35GS	6C11	35GS	ALB				
F027300215	1E07/1	35GS	ALB	35GS	6C11				
F027300216	1E07/1	35GS	6C11	35GS	ALB				
F027300217	15B07	35GS	ALB	35GS	6C11				
F027300218	15B07	35GS	6C11	35GS	ALB				
F027300219	6C11	35GS	ALB	35GS	1B11				
F027300220	6C11	35GS	ALB	35GS	1E07/1				
F027300221	6C11	35GS	ALB	35GS	15B07				
F027300222	6C11	35GS	1B11	35GS	ALB				
F027300223	6C11	35GS	1E07/1	35GS	ALB				
F027300224	6C11	35GS	15B07	35GS	ALB				
F027300225	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	1B11		
F027300226	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	15B07		
F027300227	15B07	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E		
F027300228	1E07/1	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E		
F027300229	1E07/1	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1		
F027300230	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	1E07/1		
F027300231	1B11	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E		
F027300232	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	35GS	1E07/1		
F027300233	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	35GS	1B11		
F027300234	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	35GS	15B07		
F027300235	1B11	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1		
F027300236	15B07	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1		
F027300237	6C11	9GS	15B07	9GS	ALB	9GS	15B07		
F027300238	1E07/1	9GS	1E07/1	9GS	ALB	9GS	6C11		
F027300239	1B11	9GS	1B11	9GS	ALB	9GS	6C11		
F027300240	6C11	9GS	1B11	9GS	ALB	9GS	1B11		
F027300241	15B07	20GS	15B07	9GS	ALB	9GS	6C11		
F027300242	15B07	9GS	ALB	9GS	15B07	9GS	6C11		
F027300243	6C11	9GS	ALB	9GS	15B07	20GS	15B07		
F027300244	6C11	9GS	ALB	9GS	1E07/1	9GS	1E07/1		
F027300245	6C11	9GS	ALB	9GS	1B11	9GS	1B11		
F027300246	1E07/1	9GS	1E07/1	9GS	6C11	9GS	ALB		
F027300247	1B11	9GS	1B11	9GS	6C11	9GS	ALB		
F027300248	15B07	20GS	15B07	9GS	6C11	9GS	ALB		

F027300249	6C11	9GS	1E07/1	9GS	1E07/1	9GS	ALB		
F027300250	6C11	9GS	1B11	9GS	1B11	9GS	ALB		
F027300251	6C11	9GS	15B07	20GS	15B07	9GS	ALB		
F027300252	1E07/1	9GS	1E07/1	9GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1
F027300253	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	9GS	1B11	9GS	1B11
F027300254	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	9GS	15B07	20GS	15B07
F027300255	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	9GS	15B07	20GS	15B07
F027300256	1B11	9GS	1B11	9GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1
F027300257	1E07/1	9GS	1E07/1	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
F027300258	1B11	9GS	1B11	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
F027300259	15B07	20GS	15B07	9GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1
F027300260	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	9GS	1E07/1	9GS	1E07/1
F027300610	1B11	9GS	ALB	9GS	1B11	9GS	6C11		
F027300659	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	9GS	1E07/1	9GS	1E07/1
F027300660	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	9GS	1B11	9GS	1B11
F027300841	15B07	20GS	15B07	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
F027301194	1E07/1	9GS	6C11	9GS	ALB				
F027301195	1E07/1	9GS	ALB	9GS	6C11				

Algunas construcciones mostraron potencias deterioradas dependiendo de la valencia, la longitud del conector y la posición relativa de los bloques de construcción de ISVD. Por ejemplo: se observaron diferencias considerables en las potencias de OX40L para 6 construcciones de ISVD biespecíficas aunque comprendían los mismos bloques de construcción dirigidos a OX40L y TNF α . Se encontró que la composición exacta (valencia, orientación de los bloques de construcción y uso de longitudes de conector) era crítica para la potencia. Las potencias enumeradas para el bloqueo de OX40L como se muestra en la tabla 3 demuestran la importancia de la bivalencia y la posición en el extremo N del bloque de construcción anti-OX40L 1E07/1.

Tabla 3: Valores de IC50 de neutralización de OX40L humano y cino en el ensayo de actividad de PBMC para ISVD multiespecíficos con los mismos bloques de construcción que la construcción de ISVD F027300052 frente al compuesto de referencia mAb anti-hOX40L.

Construcción ID	BB1	conector 1	BB2	conector 2	BB3	conector 3	BB4	conector 4	BB5	OX40L Ensayo de PBMC (IC50, pM)	Relación IC50 mAb de referencia anti-hOX40L/construcción ISVD
F027300229	1E07/1	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1			51500	0.09

F027300232	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	35GS	1E07/1			86000	0.05
F027300252	1E07/1	9GS	1E07/1	9GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	1090	10.0
F027300659	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	9GS	1E07/1	9GS	1E07/1	4820	0.50
F027301097	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	866	2.00
F027301100	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	35GS	1E07/1	35GS	1E07/1	6520	0.67

Posteriormente, el panel grande se redujo a un panel de cinco construcciones multiespecíficas, que consisten en las construcciones ISVD F027300252, F027301140, F027301189, F027301197 y F027301199, que demostraron ser potentes sobre ambas dianas (humanas y cino) y que tienen el potencial de altos niveles de expresión, basado en estimaciones de rendimiento preliminares.

Se realizaron producciones de 2L y 5L a mayor escala en *Pichia pastoris* del panel que comprende las 5 construcciones de ISVD para la determinación del rendimiento de expresión, la evaluación de las propiedades biofísicas y la reactividad preexistente. Se demostró que se requiere una combinación específica de bloques de construcción anti-OX40L y bloques de construcción anti-TNF α para obtener altos rendimientos de expresión en *Pichia pastoris*, así como suficiente solubilidad y estabilidad biofísica. Como se ejemplifica en la tabla 5, comparando las construcciones de ISVD F027300252 y F07301199, ya el uso del bloque de construcción anti-TNF dio como resultado un perfil de CMC muy diferente. Tras la fermentación de 5L, la construcción de ISVD F027300252 no solo alcanzó un título de 6 g/l, que es 3 veces mayor que para la construcción de ISVD F07301199, sino que también exhibió propiedades de almacenamiento y viscosidad superiores.

Tabla 4: Composición de los bloques de construcción de las construcciones ISVD F027300252 y F07301199.

Construcción ID	BB1	conector 1	BB2	conector 2	BB3	conector 3	BB4	conector 4	BB5
F027300252	1E07/1	9GS	1E01	9GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1
F027301104	6C11	35GS	1B11	35GS	1B11	35GS	ALB		
F027301189	15B07	20GS	15B07	9GS	ALB	9GS	6C11		
F027301197	6C11	9GS	1B11	9GS	1B11	9GS	ALB		
F027301199	1E07/1	9GS	1E07/1	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E

Tabla 5: Rendimientos de expresión y propiedades biofísicas de las construcciones pentavalentes de ISVD F0273000252 y F027301199.

Construcción ID	Rendimiento de expresión 5 ml de cultivo (µg/ml)	Rendimiento de expresión fermentador 5 L (g/L)	solubilidad (mg/ml)	Almacenamiento a -60°C*	Almacenamiento a 5°C*	Estabilidad de congelación-descongelación *	Viscosidad (cP)*
F027300252	387	6.0	152	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	8.0
F027301104	140	4.3	154	Sin cambio	SVP después de 2-3 semanas	Sin cambio	16.8
F027301189	190	3.4	151	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	14.1
F027301197	80	4.6	144	Sin cambio	SVP después de 2-3 semanas	Sin cambio	9.6
F027301199	50	2.0	158	turbidez	Separación de fases, SVP	turbidez	19.3

* a alta concentración > 150 mg/ml. ALB = ALB23002, BB = bloque de construcción, SVP = partícula subvisible

Además, la tabla 6 y el ejemplo 12 demuestran que la reactividad del anticuerpo preexistente está impulsada por la composición, la valencia y las longitudes del conector

5 de las respectivas construcciones de ISVD.

Tabla 6: Unión de anticuerpos preexistentes presentes en 96 muestras de suero humano a F027300252, F027301140, F027301189, F027301197 y F027301199 en comparación con las construcciones de control de ISVD F027301099 y F027301186.

Construcción ID	BB1	conector 1	BB2	conector 2	BB3	conector 3	BB4	conector 4	BB5	percentil 25%	Mediana de nivel RU	percentil 75%
F027300252	1E07 /1	9GS	1E07 /1	9GS	1C02 /1	9GS	ALB	9GS	1C02 /1-A	-8	10	29
F027301104	6C11	35GS	1B11	35GS	1B11	35GS	ALB-A			30	56	85
F027301189	15B0 7	20GS	15B0 7	9GS	ALB	9GS	6C11-A			-13	-4	9
F027301197	6C11	9GS	1B11	9GS	1B11	9GS	ALB-A			22	32	47
F027301199	1E07 /1	9GS	1E07 /1	9GS	VHH# 3E	9GS	ALB	9GS	VHH# 3E-A	nt	nt	nt
F027301099	1B11	35GS	ALB	35GS	1B11	35GS	6C11			47	92	350
F027301186	1E07 /1	35GS	1E07 /1	35GS	1C02 /1	9GS	ALB	9GS	1C02 /1	61	135	622

BB = bloque de construcción, nt = no ensayado

Finalmente, se seleccionó la construcción F027300252 de ISVD en función de la potencia, unión reducida a anticuerpos preexistentes, niveles de expresión superiores y características de CMC y unión reducida a anticuerpos preexistentes.

5 **6.2 Ejemplo 2: Afinidad de unión de la construcción de ISVD multiespecífica a TNF α , OX40L y seralbúmina**

La afinidad, expresada como la constante de disociación en el equilibrio (K_D), de F027300252 hacia TNF α humano, de mono cynomolgus, conejillo de indias y ratón, OX40L humano y cino, y seralbúmina humana y cino se cuantificó por medio de mediciones de
10 afinidad en solución en una estación de trabajo Gyrolab xP (Gyros).

En mediciones controladas por K_D , una dilución en serie de TNF α o OX40L (que varía de 1 μ M a 0.1 pM) o albúmina sérica (de 10 μ M a 1 pM) y una cantidad fija de F027300252 (20 pM en el caso de TNF α , 30 pM en caso de OX40L y 300 pM en el caso de albúmina sérica) se mezclaron para permitir la interacción y se incubaron durante 24 o 48 horas (en el caso
15 de OX40L y TNF α) o 2 horas (en el caso de albúmina sérica) para alcanzar el equilibrio.

En mediciones controladas por receptor, se mezclaron una dilución en serie de TNF α o OX40L (que varía de 1 μ M a 0.1 pM) y una cantidad fija de F027300252 (5 nM en el caso de TNF α y 5 nM en el caso de OX40L para permitir la interacción y se incubaron durante 24 o 48 horas para alcanzar el equilibrio.

20 Se capturó TNF α /OX40L/seralbúmina humana biotinilada en las microestructuras de un Gyrolab Bioaffy 1000 CD, que contiene columnas de perlas y se usa como sonda molecular para capturar F027300252 libre procedente de la solución equilibrada. La mezcla de TNF α /OX40L/seralbúmina y F027300252 (que contiene TNF α /OX40L libre/seralbúmina, F027300252 libre y complejos de TNF α /OX40L/ seralbúmina - F027300252) se dejó fluir por
25 entre de las perlas, y se capturó un pequeño porcentaje de F027300252 libre, que es proporcional a la concentración de la construcción de ISVD libre. A continuación, se inyectó un anticuerpo anti- v_{HH} marcado con fluorescencia, ABH0086-Alexa647, para marcar cualquier F027300252 capturado y después de enjuagar el exceso de sonda fluorescente,

se determinó el cambio en la fluorescencia. El ajuste de la serie de diluciones se realizó utilizando el software Gyrolab Analysis, donde se analizaron las curvas controladas por receptor y K_D para determinar el valor de K_D .

Los resultados (Tabla 7) demuestran que la construcción de ISVD multiespecífica se une a OX40L humano/cino y TNF α humano/cino con alta afinidad.

Tabla 7: Afinidades de unión de F027500252 a OX40L, TNF α y serralbúmina humanos y cino.

	humano		mono cynomolgus		
Antígeno	K_D (pM)	95% CI (pM)	K_D (pM)	95% CI (pM)	Tiempo de incubación (h)
OX40L	49.7	32.2 – 67.1	8.3	3.1 – 13.5	24
	28.2	11.7 – 44.6	9.8	7.5 - 12.0	48
TNF α	8.9	6.4 – 11.5	41.3	23.0 – 59.6	24
	8.6	4.6 - 12.5	34.3	28.4 – 40.2	48
SA	10700	8800 - 12600	11200	9700 - 12700	2

6.3 Ejemplo 3: Construcción de ISVD multiespecífica que se une a TNF α unido a la membrana

La unión de F027300252 al TNF α unido a la membrana se demostró mediante citometría de flujo en células HEK293H que expresan TNF α de membrana humana y en células CD4+ activadas que se aislaron de PBMC y se estimularon con PMA y Ionomicina (datos mostrados para células HEK293H que expresan TNF α). Brevemente, las células se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pocillo y se incubaron con una serie de diluciones de F027300252 o compuesto de referencia mAb anti-hTNF α , comenzando en 100 nM hasta 0.5 pM, durante 1 hora a 4°C. En paralelo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% en PBS, antes de la siembra (para aumentar la detección de TNF α unido a la membrana), y se incubaron con una serie de

diluciones de construcción de ISVD o compuesto de referencia durante 1 hora a 4°C o durante 24 horas a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces y posteriormente se incubaron con un mAb anti- v_{HH} (ABH00119) durante 30 min a 4°C, se lavaron de nuevo y se incubaron durante 30 min a 4°C con un anticuerpo de cabra anti-ratón o anti-humano marcado con PE. Las muestras se lavaron y se resuspendieron en tampón FACS (D-PBS con FBS al 10% y azida sódica al 0.05% complementada con TOPRO3 5 nM). A continuación, se analizaron las suspensiones celulares en un iQuescreener. Los valores de CE50 se calcularon usando GraphPad Prism. Los valores de CE50 para F027300252 y mAb de referencia anti-hTNF α están en el mismo rango para células viables y fijadas después de 1 hora de incubación, aunque la fijación de las células da como resultado la presencia de niveles más altos de TNF α en la membrana (Tabla 8). Después de 24 horas de incubación, se alcanzó el equilibrio de unión. Las afinidades de F027300252 y el mAb de referencia anti-hTNF α son comparables.

Tabla 8: Afinidad de unión de F027300252 al TNF α expresado en la membrana después de tiempos de incubación de 1 hora o 24 horas, en comparación con el compuesto de referencia mAb anti-hTNF α .

	T=1h células viables	T=1h células fijadas	T = 24h células fijadas
Analito	EC50 (M)	EC50 (M)	EC50 (M)
F027300252	9.04 E-11	1.47 E-10	2.02 E-11
mAb de referencia anti-hTNF α	7.08 E-11	2.61 E10	1.28 E-11

6.4 Ejemplo 4: Construcción de ISVD multiespecífica que se une a OX40L unido a la membrana

La unión de F027300252 a OX40L humano y cino unido a la membrana se demostró usando citometría de flujo en células CHO-K1 que expresaban OX40L humano o cino. Brevemente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% en PBS, se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pocillo y se incubaron con una serie de diluciones de la construcción de ISVD F027300252 o el compuesto de referencia mAb anti-hOX40L a partir de 100 nM hasta 0.5 pM, durante 48 horas a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces y posteriormente se incubaron con un mAb anti- V_{HH} durante 30 min a 4°C, se lavaron de nuevo y se incubaron durante 30 min a 4°C con un anticuerpo de

cabra anti-ratón marcado con PE o FITC. Las muestras se lavaron y se resuspendieron en
 tampón FACS (D-PBS con FBS al 10% y azida sódica al 0.05% complementado con TOPRO3
 5 nM). A continuación, se analizaron las suspensiones de células en un iQuescreener. Los
 valores de CE50 se calcularon usando GraphPad Prism. F0273000252 muestra una mejor
 unión al OX40L unido a la membrana que el compuesto de referencia mAb anti-hOX40L
 del compuesto de referencia con un factor de más de 10 (Tabla 9).

**Tabla 9: Afinidad de unión de F027300252 a OX40L humano y cino expresado en la membrana en
 comparación con el compuesto de referencia mAb anti-hOX40L.**

	OX40L humano	OX40L cino
Analito	EC50 (M)	EC50 (M)
F027300252	1.33E-11	1.18E-11
mAb de referencia anti-hOX40L	1.80E-10	1.42E-10

6.5 Ejemplo 5: La construcción de ISVD multiespecífica se une selectivamente a TNFα y OX40L

La ausencia de unión a dianas humanas relacionadas con TNFα y OX40L se evaluó mediante
 SPR (Proteon XPR36). Como dianas relacionadas con OX40L, se evaluaron TRAIL, CD30L,
 CD40L y RANKL humanos. Los miembros de la superfamilia de TNF FASL, TNFβ, LIGHT, TL-
 1A, RANKL humanos se probaron como citoquinas relacionadas para TNFα.

Con este fin, las citoquinas relacionadas con TNF se inmovilizaron en un chip sensor de
 proteon GLC a 25 µg/ml durante 200 s utilizando acoplamiento de amina, con una inyección
 de 80 segundos de EDC/NHS para la activación y una inyección de 150 segundos de
 etanolamina HCl 1 M para la desactivación (Kit de acoplamiento ProteOn Amine. Cat. 176-
 2410). El caudal durante la activación, desactivación e inyección de ligando se fijó en 30
 µl/min. El pH del tampón de inmovilización de acetato 10 mM se eligió restando ~ 1.5 del
 pI de cada ligando.

A continuación, se inyectaron 10 nM o 300 nM de F027300252 durante 2 minutos y se dejó
 disociar durante 900 s a un caudal de 45 µL/min. Como tampón de funcionamiento se usó
 PBS (pH 7.4) + Tween 20 al 0.005%. Como controles positivos, se inyectaron 0,3 µM de α-

hFASL Ab, 0,3 μ M de α -hTNF β Ab, 0.5 μ M de α -hLIGHT Ab y 0,3 μ M de α -hTL-1A Ab. La interacción entre F027300252 y los controles positivos con las dianas inmovilizadas se midió mediante la detección de incrementos en el índice de refracción que se produce como resultado de cambios de masa en el chip tras la unión.

- 5 En el caso de las dianas relacionadas con OX40L, la construcción de ISVD F027500252 o los anticuerpos de control positivo α -hTRAIL, α -hCD30L, α -hCD40L y α -hRANKL V_{HH} se inmovilizaron en el chip sensor a 10 μ g/ml.

A continuación, se inyectó 1 μ M de TRAIL, CD30L, CD40L y RANKL humanos durante 2 minutos y se dejó disociar durante 900 s a un caudal de 45 μ L/min.

- 10 Todos los controles positivos se unieron a su diana respectivo. No se detectó unión de la construcción F027300252 de ISVD a TRAIL, CD30L, CD40L, FASL, TNF β , LIGHT, TL-1A y RANKL humanos.

6.6 Ejemplo 6: Unión simultánea de la construcción de ISVD multiespecífica a hOX40L, hTNF α y HSA

- 15 Se utilizó un tramo de Biacore T200 para determinar si la construcción F0273000252 de ISVD puede unirse simultáneamente a hOX40L y hTNF α *soluble* recombinante. Con este fin, se inmovilizó HSA en un chip sensor CM5 mediante acoplamiento de amina a un nivel de 6000 RU. Se inyectaron 100 nM de F0273000252 durante 2 min a 10 μ L/min sobre la superficie de HSA para capturar la construcción de ISVD a través del bloque de construcción
- 20 ALB23002. Posteriormente, se inyectaron 100 nM de hOX40L, hTNF α o hIL13 o mezclas de 100 nM de OX40L + 100 nM de TNF α , 100 nM de IL13 + 100 nM de OX40L o 100 nM de TNF α + 100 nM de IL13 a una velocidad de flujo de 45 μ L/min durante 2 minutos seguidos de una etapa de disociación subsiguiente de 600 segundos. Las superficies de HSA se regeneran con una inyección de 2 minutos de HCl (100 mM) a 45 μ L/min. El sensorgrama
- 25 (Figura 1) demuestra que la construcción F027300252 de ISVD puede unirse a hOX40L y hTNF α simultáneamente, como lo muestra el aumento en las unidades de respuesta después de la captura en HSA: aumento de $\sim$ 1770 RU desde hTNF α solo, aumento de $\sim$ 800 RU desde hOX40L solo y aumento de $\sim$ 2300 RU para la mezcla de OX40L y TNF α .

Usando citometría de flujo, se determinó si la construcción F0273000252 de ISVD puede unirse simultáneamente al hTNF α soluble recombinante y al hOX40L *unido a la membrana celular*. Con este fin, se sembraron células CHO-K1 que expresaban OX40L humano a una densidad de 5×10^4 células/pocillo y se incubaron con la construcción F0273000252 de ISVD 100 nM durante 90 minutos a 4°C. Posteriormente, la mezcla se incubó con una serie de diluciones de TNF α biotinilado desde 500 nM hasta 7.6 pM, y se incubó durante 30 min a 4°C, en presencia de HSA 30 μ M. Las células se lavaron 3 veces y posteriormente se incubaron con anti-estreptavidina marcada con PE durante 30 min a 4°C, y se lavaron nuevamente. Las muestras se lavaron y se resuspendieron en tampón FACS (D-PBS con FBS al 10% y azida sódica al 0.05% complementada con TOPRO3 5 nM). A continuación, se analizaron las suspensiones celulares en un iQuescreener. La curva de dosis-respuesta (Figura 2) demostró que la construcción F0273000252 de ISVD puede unirse a hOX40L unido a membrana y hTNF α soluble simultáneamente en presencia de HAS, mientras que el control negativo V_{HH}, IRR0096, no puede unirse.

6.7 Ejemplo 7: Inhibición por la construcción ISVD multiespecífica de la activación de NFkB inducida por TNF α *in vitro*

Las células HEK293_NFkB-NLucP son células que expresan el receptor de TNF que se transfectaron de manera estable con una construcción informadora que codifica Nano luciferasa bajo el control de un promotor dependiente de NFkB. La incubación de las células con TNF α humano y ciyno solubles dio como resultado la expresión del gen de Nano luciferasa mediada por NFkB. Se midió la luminiscencia de la Nano luciferasa usando sustrato Nano-Glo Luciferasa mezclado con tampón de lisis en una proporción de 1:50 añadida a las células. Las muestras se mezclaron durante 5 minutos en un agitador para obtener una lisis completa.

Se sembraron células HEK293_NFkB-NLucP Glo response™ a razón de 20000 células/pocillo en medio de crecimiento normal en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido (TC) blanco con fondo transparente. Se añadieron series de dilución de F0273000252 o

compuesto de referencia (mAb anti-hTNF α) a TNF α humano 25 pM o cino 70 pM y se incubaron con las células durante 5 horas a 37°C en presencia de HSA 30 μ M.

F027300252 inhibió la activación de NF κ B inducida por TNF α humano y cino de manera dependiente de la concentración con una CI50 de 31 pM (para TNF α humano) y 91 pM (para TNF α cino) comparable al compuesto de referencia mAb anti-hTNF α (Tabla 10, Figura 3). El control negativo V_{HH}, IRR00096, no mostró inhibición.

Tabla 10: Los valores de CI50 de F0275000252 mediados por la neutralización de TNF α humano y cino en el ensayo indicador Glo response™ HEK293_NF κ B-NLucP frente al compuesto de referencia mAb anti-hTNF α .

	F02750069		mAb anti-hTNF α de referencia	
antígeno	TNF α humano	TNF α cino	TNF α humano	TNF α cino
IC50 (M) en ensayo NF κ B	3.1E-11	9.1-11	5.5E-11	8.6E-11

6.8 Ejemplo 8: La inhibición de TNF α por la construcción ISVD multiespecífica reduce la expresión de luciferasa en una línea celular estable indicadora de luciferasa NF κ B

Para medir la neutralización de TNF α por anticuerpos o construcciones ISVD/V_{HH} mono o multiespecíficos se usó la línea celular estable informadora NF κ B A549/NF κ B-luc (n° de cat. RC002). El factor nuclear kappa B (NF κ B) es un miembro de la familia rel de factores de transcripción y desempeña una función clave en la regulación de la respuesta inflamatoria, la apoptosis o la tumorigénesis. La línea celular utilizada aquí se deriva de células de carcinoma de pulmón humano A549 con integración cromosómica de una construcción informadora de luciferasa regulada por 6 copias del elemento de respuesta NF κ B. Con esta línea celular, cualquier cambio que se produzca a lo largo de la vía NF κ B se puede controlar con precisión.

La potencia de la construcción ISVD se determinó en respuesta a la dosis de 10 concentraciones diluidas en serie neutralizando el TNF α humano (SIGMA # H8916) y el TNF α cino (Sino 90018-CNAE-5) en su EC90. Se usó TNF α humano a [15 ng/ml], y se usó TNF α cino a [10 ng/ml].

Las células A549/NFκB-luc descongeladas y utilizadas se resuspendieron en medio RPMI que contenía FCS al 1% y se sembraron en placas de 384 pocillos cada pocillo con células 10K en 10 μl. Se diluyeron 10 μl de la construcción ISVD multiespecífica anti-TNF/anti-OX40L F027300252, o los correspondientes anticuerpos de control positivo y negativo y V_{HH} en el medio RPMI y se añadieron a las células. Se usó un anticuerpo anti-TNFα producido internamente (mAb2 anti-TNFα) como control positivo, y el V_{HH} IRR00119 así como el anticuerpo RA11093885 se usaron como controles negativos. Después de la preincubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron a los pocillos 10 μl de TNFα en una concentración de 15 ng/ml. La reacción completa se terminó después de 5 horas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad mediante la adición de 20 μl de reactivos de detección de luciferasa Bio-Glo (Promega E7940). La señal de luminiscencia se midió con PheraStar (BMG). Se utilizó el programa XLfit en Speed para ajustar las curvas de respuesta a la dosis y calcular los valores de IC₅₀.

Tabla 11: Resultados de medias de IC₅₀.

Compuesto ID	media de IC ₅₀ [nM] (@15 ng/ml TNF humano)	media de IC ₅₀ [nM] (@10 ng/ml TNF cino)
F027300252	0.22	0.21
anti-TNFα mAb2	0.2	0.13
IRR00119 (control negativo V _{HH})	sin inhibición	sin inhibición
RA11093885 (control negativo IgG)	sin inhibición	sin inhibición

6.9 Ejemplo 9: Inhibición por la construcción ISVD multiespecífica de la coestimulación de células T inducida por OX40L *in vitro*

Se estudió la actividad funcional de OX40L humano y cino y la inhibición de la misma por la construcción F027300252 de ISVD usando un ensayo basado en células, investigando la coestimulación de células T inducida por OX40L (ensayo de actividad de PBMC). El ensayo se realizó cocultivando PBMC derivadas de la capa leucocitaria (a una densidad de 1 x 10⁵ células/pocillo) en presencia de una concentración subóptima de PHA-L (para inducir la expresión de OX40) con células CHO-K1 que sobreexpresan OX40L (a densidad de 1 x 10⁴

células/pocillo) en placas transparentes de 96 pocillos. Se añadió una serie de diluciones de la construcción F027300252 de ISVD o mAb anti-hOX40L del compuesto de referencia al cocultivo y se incubó en presencia de HSA 30 μ M durante 22 horas a 37°C en una incubadora humidificada. La lectura se realizó evaluando los niveles de IL2 en el sobrenadante de estas células usando ELISA.

La construcción F027300252 de ISVD inhibió la activación de células T inducida por OX40L humano y cino de una manera dependiente de la concentración con una IC50 de 2.58 nM (para OX40L humano) y 7.22 nM (para OX40L cino) comparable al compuesto de referencia mAb anti-hOX40L (Tabla 12, Figura 4).

Tabla 12: Valores de CI50 de la neutralización mediada por F0273000252 de OX40L humano y cino en el ensayo de actividad de PBMC frente al compuesto de referencia mAb anti-hOX40L.

	F02750069		mAb de referencia anti-hOX40L	
antígeno	OX40L humano	OX40L cino	OX40L humano	OX40L cino
IC50 (M) en el ensayo de actividad en PBMC	2.58E-09	3.89E-09	7.22E-09	1.72E-08

6.10 Ejemplo 10: La inhibición de TNF α y OX40L por la construcción ISVD multiespecífica F027300252 reduce la expresión de luciferasa en una línea celular estable indicadora de luciferasa NF κ B

Para medir la neutralización de TNF α y OX40L individualmente o en combinación por anticuerpos mono o multiespecíficos o construcciones ISVD/VHH, se usó la línea celular estable informadora NF κ B, Jurkat NF- κ B Luc2/OX40. El factor nuclear kappa B (NF κ B) es un miembro de la familia rel de factores de transcripción y juega un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria, apoptosis o tumorigénesis. La línea celular utilizada aquí se derivó de un linfocito T de sangre periférica humana, con integración cromosómica y que expresa establemente el receptor OX40 humano y una construcción del gen indicador de luciferasa luc2 de codón optimizado regulado por 6 copias del elemento de respuesta NF κ B. Con esta línea celular, cualquier cambio que se produzca a lo largo de la

vía NFκB se puede controlar con precisión. Las células Jurkat NF-κB Luc2/OX40 para usar tras descongelarlas se resuspendieron en medio RPMI que contenía FCS al 1% y se sembraron en placas de 96 pocillos, con 1×10^5 células / ml en cada pocillo para cultivo.

Al comienzo del ensayo, el TNFα humano y el OX40L humano recombinantes se añadieron a una concentración final de 5 ng/ml y 100 ng/ml a los pocillos de placas de cultivo en suspensión Eppendorf de 96 pocillos en 85 µl/pocillo, y se agregaron 85 µl del anticuerpo anti-TNFα pre-diluido PB03017 (de Sanofi), el anticuerpo anti-OX40L (Cat # AB00536 de Absolute Antibody), el anticuerpo de control negativo del isotipo IgG1 (Cat # 403502 de Biolegend), el control negativo V_{HH} IRR00119 (de Sanofi), el anti-TNFα V_{HH} ATN-103 mono-específico (de Sanofi), el anti-OX40L V_{HH} ALX-0632 mono-específico (de Sanofi), o las construcciones ISVD multiespecíficas anti-TNF/anti-OX40L F027300252, F027301104, F027301197, F027301189, y F027301199 (todos de Sanofi). Después de la preincubación durante 15 minutos a 37°C, se añadieron 75 µl de esa mezcla/pocillo a 50 µl de 1×10^5 células/pocillo y se incubaron durante 6 horas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad. La reacción se detuvo mediante la adición de 125 µl de reactivos de detección de luciferasa Bio-Glo (Promega E7940) y se midió la señal de luminiscencia. Se utilizó el programa XLfit en Speed para ajustar las curvas de dosis-respuesta y calcular los valores de IC₅₀ en Figura 7.

Los efectos aditivos de la combinación anti-TNFα y anti-OX40L en comparación con la potencia de los brazos individuales se determinaron a dosis de anticuerpos de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml y 5 µg/ml (Figura 5) . La IC₅₀ (Figura 7, tabla 13) y el % de inhibición (Figura 6, tabla 13) de las construcciones ISVD multiespecíficas en comparación con los V_{HH} mono-específicos se determinaron en respuesta a la dosis de 9 concentraciones diluidas en serie neutralizando el TNFα humano recombinante (Cat # H8916 de Sigma) y OX40L humano recombinante (Cat # 71185 de bpsbioscience) en su EC₉₀ y su EC₉₀ para lograr niveles comparables de inducción de luciferasa por cada estímulo individual (véase Figura 5). Se usó TNFα humano a 5 ng/ml y OX40L humano a una concentración de ensayo final de 100 ng/ml, respectivamente.

La incubación tanto con TNF α humano recombinante (hTNF α) como con OX40L humano recombinante (OX40L) conduce a una inducción mucho más fuerte (> 3 veces) de la actividad luciferasa en comparación con el tratamiento con cualquier estímulo solo (véase Figura 5). La incubación con ambos TNF α humano recombinante y OX40L humano recombinante (hTNF α + OX40L) se utilizó para caracterizar el efecto de inhibición por un anticuerpo anti-TNF α solo, inhibición por un anticuerpo anti-OX40L solo o una combinación de un anticuerpo anti-TNF α y anticuerpo anti-OX40L a diferentes concentraciones en el intervalo de 0.5 μ g/ml hasta 5 μ g/ml (Figura 5). Si bien el tratamiento con anti-TNF α o anti-OX40L solos condujo a cierta inhibición de la actividad luciferasa inducida por la combinación de hTNF α + OX40L, solo el tratamiento con anti-TNF α /anti-OX40L combinado pudo suprimir muy fuertemente la actividad luciferasa a un nivel muy bajo correspondiente al control sin estímulo (Figura 5). Por tanto, el tratamiento combinado con anti-TNF / anti-OX40L incluso a concentraciones muy bajas de p.ej. 0.5 μ g/ml o 1 μ g/ml suprimieron de forma mucho más potente la actividad luciferasa en comparación con el tratamiento con anti-TNF α o anti-OX40L solos a una alta concentración de 5 μ g/ml (Figura 5).

De manera similar, se utilizó la incubación con la combinación de TNF α humano recombinante y OX40L humano recombinante (hTNF α + OX40L) para caracterizar el efecto de inhibición por el anti-OX40L VHH ALX-0632 monoespecífico, o el anti-TNF α VHH ATN-103 monoespecífico, o las construcciones ISVD biespecíficas anti-TNF α /anti-OX40L F027300252, F027301104, F027301189, F027301197 y F027301199 a diferentes concentraciones en el intervalo de 1 pM hasta 20 nM (Figura 6 y Figura 7). Si bien el tratamiento con un anti-TNF α VHH o un anti-OX40L VHH solos condujo a cierta inhibición de la actividad luciferasa inducida por la combinación de hTNF α + OX40L hasta un nivel de aproximadamente <70% máximo, solo el tratamiento con las construcciones de ISVD anti-TNF α anti-OX40L biespecíficas pudieron suprimir completamente la inducción de la actividad luciferasa hasta un nivel del 100% (Figura 6). Además, el cálculo de los valores de IC₅₀ para las construcciones ISVD anti-TNF α /anti-OX40L biespecíficas F027300252, F027301104, F027301189, F027301197 y F027301199 a diferentes concentraciones en el

intervalo de 1 pM hasta 20 nM indicó que las construcciones de ISVD F027300301199 y F027300301199 tenían la potencia más fuerte en este conjunto específico de experimentos (Figura 7).

Tabla 13: Valores de IC50 y % de inhibición de las construcciones ISVD F027300252, F027301104, F027301189, F027301197 y F027301199 en el ensayo indicador Jurkat OX40/TNF-NFκB (véanse también las figuras 6 y 7).

Construcción ID	IC50 (pM)	% de inhibición
F027300252	438	100
F027301104	844	100
F027301189	1230	100
F027301197	659	100
F027301199	374	100
ATN-103	387	66
ALX-0632	3065	68

6.11 Ejemplo 11: La inhibición de OX40L y TNFα por la construcción ISVD multiespecífica reduce los niveles de GM-CSF en la reacción de linfocitos mixtos (MLR)

Con el fin de probar los efectos fisiológicos del bloqueo de OX40L sobre la activación de células T, se realizaron ensayos de reacción de linfocitos mixtos. Brevemente, las células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC) de un donante de sangre sano se maduraron in vitro para expresar OX40L y luego estas células se mezclaron con PBMC de otro donante sano no relacionado. Mezclar donantes no relacionados en el mismo pocillo indujo alorreacción y activación de células T. Esta respuesta alogénica de células T se controló mediante la medición de citoquinas en el sobrenadante 5 días después de mezclar las células. A continuación, se muestra una explicación detallada para la preparación de MoDC y la evaluación de la respuesta de las células T mediante la medición de citoquinas.

Preparación de células dendríticas derivadas de monocitos a partir de PBMC de donantes de sangre sanos:

Se aislaron PBMC de sangre total o capas leucocíticas mediante centrifugación en gradiente. Se contaron las células y se sembraron en placa 3×10^7 células por pocillo de una placa de 6 pocillos en 3 ml de medio RPMI 1640 que contenía Glutamax, suero humano al 10%, Hepes 10 mM y 20 µg/ml de gentamicina. 1-2 horas más tarde, las células no adherentes se lavaron con 3 rondas de lavado y las células se incubaron durante 5 días en presencia de 500 UI/ml de IL-4 y 500 UI/ml de GM-CSF. En el tercer día de esta incubación de 5 días, el medio se reemplazó parcialmente con medio de nueva aportación que contenía IL-4 y GM-CSF. Al final del período de incubación de 5 días, se recogieron y contaron las CD diferenciadas pero aún inmaduras. A continuación, las CD se volvieron a sembrar para una maduración adicional (5×10^5 células/ml) en placas de 6 o 24 pocillos. Las células se incubaron en medio (igual que el anterior) que contenía un nuevo cóctel de citoquinas [500 UI/ml de IL-4, 500 UI/ml de GM-CSF, 10 ng/ml de IL-1b, 1000 UI de IL-6, 10 ng/ml de TNFα, 1 µg/mL de PGE2] que ha sido identificado como el más adecuado entre otros estímulos para inducir la expresión de OX40L en DC (Figura 8). En los días 2, 3 y 4 de maduración, las CD se recolectaron y evaluaron para la expresión de marcadores de maduración como CD86, CD83, CD40, HLA-DR y OX40L mediante citometría de flujo. Después de 3-4 días de maduración, 30-70% de todas las CD maduras expresaron OX40L en la superficie. Después de confirmar la expresión de OX40L (Figura 8), las CD se congelaron en medio de congelación (suero de ternera fetal al 90% + DMSO al 10%) para utilizarlas posteriormente en los ensayos de MLR.

Reacción de linfocitos mixtos

Se aislaron PBMC de sangre total o capas leucocíticas mediante centrifugación en gradiente. Las células se resuspendieron en medio X-Vivo 15 (Lonza) y se contaron. Mientras tanto, las CD se descongelaron y se resuspendieron en medio X-Vivo 15. Se mezclaron 1×10^5 PBMC y 5×10^3 DC en el mismo pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U. Para caracterizar el efecto del tratamiento con anti-TNFα [10 µg/ml] solo, o anti-OX40L solo [10 µg/ml], o una combinación de anti-TNFα [10 µg/ml] + anti-OX40L [10 µg/ml], los anticuerpos se añadieron a las diluciones respectivas y las mezclas de PBMC y DC se incubaron durante 5 días. De manera similar, para caracterizar el efecto del

tratamiento con construcciones ISVD, se agregaron concentraciones variables de F027300252 (400 - 0.13 nM; dilución en serie de 5 veces) o control VHH IRR00119, y la mezcla de PBMC y DC se incubó durante 5 días. Se utilizó como control negativo la incubación con un isotipo de control IgG (Biolegend; Clone QA16A12). Después de 5 días, se recogió el sobrenadante y se evaluaron las cantidades de diversas citoquinas en el sobrenadante mediante ensayos multiplex basados en Luminex (Figura 9). Para la determinación de la eficacia anti-TNF α y/o anti-OX40L, se probaron CD de 3 donantes humanos diferentes frente a PBMC de 5 donantes alogénicos. Para la determinación del valor de IC50 para la inhibición de la producción de GM-CSF por F027300252, se probaron PBMC de 8 donantes frente a CD derivadas de 2 donantes alogénicos. Se utilizó el programa XLfit en Speed para ajustar las curvas de respuesta a la dosis y calcular los valores de IC50 para F027300252.

El tratamiento con un anticuerpo anti-TNF α solo o un anticuerpo anti-OX40L solo, ambos a concentraciones saturantes de 10 μ g/ml, condujo a una inhibición considerable de la secreción de GM-CSF en comparación con el tratamiento con isotipo (Fig. 9). Sin embargo, el tratamiento con la combinación de anticuerpos anti-TNF α y anti-OX40L fue capaz de suprimir la secreción de GM-CSF de forma significativamente más potente en comparación con el bloqueo por TNF (** p < 0.0016; Figura 9) o OX40L (**** p < 0.0001; Figura 9) solos, sugiriendo una potencia superior para el bloqueo combinado por TNF α y OX40L (Figura 9). Para la determinación del valor de IC50 para la inhibición de la producción de GM-CSF por F027300252, se probaron PBMC de 8 donantes frente a CD derivadas de 2 donantes alogénicos. Se utilizó el programa XLfit en Speed para ajustar las curvas de respuesta a la dosis y calcular los valores de IC50. F027300252 inhibe la producción de GM-CSF de una manera dependiente de la concentración con un IC50 de 51.69 $\pm$ 19.3 nM (SEM) y una inhibición máxima de 70.32 $\pm$ 5.59 %.

6.12 Ejemplo 12: Construcción de ISVD multiespecífica que se une a anticuerpos preexistentes

La unión de anticuerpos preexistentes, que están presentes en 96 muestras de suero de voluntarios sanos, a la construcción F027300252 de ISVD se determinó utilizando el ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se usó PBS/Tween (solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4, Tween20 al 0.005%) como tampón de funcionamiento y los experimentos se realizaron a 25°C.

Las construcciones de ISVD se capturaron en el chip mediante la unión del bloque de construcción ALB a HSA, que está inmovilizado en el chip. Para inmovilizar HSA, las pistas de ligando de un chip sensor ProteOn GLC se activaron con EDC/NHS (caudal 30 µl/min) y se inyectaron HSA a 100 µl/ml en tampón ProteOn Acetato pH 4.5 para producir niveles de inmovilización de aproximadamente 3200 RU. Después de la inmovilización, las superficies se desactivaron con etanolamina HCl (caudal 30 µl/min).

Posteriormente, las construcciones de ISVD se inyectaron durante 2 min a 45 µl/min sobre la superficie de HSA para producir un nivel de captura de construcciones de ISVD de aproximadamente 800 RU. Las muestras que contenían anticuerpos preexistentes se centrifugaron durante 2 minutos a 14 000 rpm y el sobrenadante se diluyó 1:10 en PBS-Tween20 (0.005%) antes de inyectarse durante 2 minutos a 45 µl/min seguido de una etapa de disociación de 400 segundos. Después de cada ciclo (es decir, antes de una nueva captura de construcción ISVD y etapa de inyección de muestra de sangre), las superficies de HSA se regeneraron con una inyección de HCl (100 mM) de 2 minutos a 45 µl/min. Se obtuvieron sensogramas que mostraban la unión de anticuerpos preexistente después de una doble referencia restando 1) la disociación de ISVD-HSA y 2) la unión no específica a la línea del ligando de referencia. Los niveles de unión de anticuerpos preexistentes se determinaron estableciendo los puntos de informe en 125 segundos (5 segundos después del final de la asociación). Se calculó el porcentaje de reducción en la unión del anticuerpo preexistente en relación con los niveles de unión a los 125 segundos de una construcción ISVD de referencia.

La construcción de ISVD pentavalente F027300252, optimizada para reducir la unión de anticuerpos preexistentes mediante la introducción de las mutaciones L11V y V89L en cada bloque de construcción y una alanina C-terminal, mostró sustancialmente menos unión a anticuerpos preexistentes en comparación con el control pentavalente no optimizado.

5 Construcción ISVD F027301186 (Tabla 6, Tabla 14, Figura 10 y Figura 11).

La unión de anticuerpos preexistente dependía de la valencia y composición de las construcciones multiespecíficas. La Tabla 6 y la Figura 10 demuestran que la construcción de ISVB pentavalente F027300252 mostró una menor reactividad de anticuerpos preexistentes que las construcciones de ISVD tetravalentes F027301104 y F027301099.

- 10 Cuatro construcciones ISVD, compuestas por los mismos bloques de construcción parentales que la construcción ISVD F027300252, mostraron diferentes reactividades de anticuerpos preexistentes (Tabla 14, Figura 11). La comparación de la construcción F027300028 de ISVD con la construcción F027301186 de ISVD muestra que la introducción de las mutaciones L11V y V89L en cada bloque de construcción y una alanina en el extremo
- 15 C redujo significativamente la reactividad del anticuerpo preexistente. La comparación de la construcción ISVD F027300028 con la construcción ISVD F027301097 muestra que la introducción de una mutación T110K en el bloque de construcción en el extremo C redujo ligeramente más la reactividad del anticuerpo preexistente. La reactividad del anticuerpo preexistente se redujo aún más de manera significativa reemplazando los conectores 35GS
- 20 en la construcción F027301097 de ISVD por conectores 9GS más cortos en la construcción F027300252 del ISVD. Por lo tanto, el uso de conectores cortos 9GS en construcciones multivalentes fue fundamental para obtener una baja reactividad de anticuerpos preexistentes.

Tabla 14: Unión de anticuerpos preexistentes presentes en 96 muestras de suero humano a la construcción F027500252 de ISVD en comparación con tres construcciones de ISVD que consisten en los mismos bloques de construcción en el mismo orden, pero con conectores diferentes o mutaciones diferentes en el bloque de construcción. L11V + y V89L + se refieren a la presencia de las mutaciones respectivas en todos los bloques de la construcción. T110K + se refiere a la presencia de esta mutación en el bloque de construcción en el extremo C de la construcción. -A = alanina presente en el extremo C.

Construcción ID	BB1	conector 1	BB2	conector 2	BB3	conector 3	BB4	conector 4	BB5		L11V	V89L	T110K	percentil 25%	Mediana de nivel de RU	percentil 75%
F027301186	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1		-	-	-	61	135	622
F027300028	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	- A	+	+	-	15	51	128
F027301097	1E07/1	35GS	1E07/1	35GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	- A	+	+	+	9	46	106
F027300252	1E07/1	9GS	1E07/1	9GS	1C02/1	9GS	ALB	9GS	1C02/1	- A	+	+	+	-8	10	29

5

6.13 Ejemplo 13: Evaluación de la construcción F027300252 de ISVD anti-TNF α /OX40L multiespecífica en el modelo de poliartritis crónica Tg197 transgénica dirigida por TNF α humano.

La construcción de ISVD anti-TNF α /OX40L multiespecífica F027300252 se perfiló en el modelo Tg197 de poliartritis progresiva en ratones dirigida por TNF (Keffer y col., 1991, EMBO J., 10: 4025-4031). En estos ratones, se insertó como transgén en ratones un gen de TNF α humano modificado. El gen humano se modificó de manera que el ARNm transcrito fuera más estable y, por lo tanto, condujo a una sobreexpresión de TNF α y una artritis progresiva espontánea en las cuatro patas al 100% de penetrancia. Los signos y síntomas se hicieron visibles aproximadamente a las 6 semanas de edad y aumentaron constantemente hasta que, si no se trataban, conducían a una morbilidad y mortalidad significativas desde las 10 semanas de edad en adelante. La gravedad de la artritis se evaluó clínicamente mediante un sistema de puntuación como se detalla a continuación:

PUNTUACIÓN DE ARTRITIS ¹	CARACTERÍSTICAS
0 / sin enfermedad	sin artritis (apariencia normal, el ratón puede soportar su peso aferrándose a una superficie invertida o inclinada como una rejilla de alambre o la tapa de una jaula durante un período de tiempo, flexibilidad/evasión de todo el cuerpo normal, fuerza de agarre máxima)
0.5 / enfermedad leve	aparición de artritis (inflamación articular leve, todos los demás parámetros como los anteriores)
1 / enfermedad de leve a moderada	leve a moderada (distorsión de la articulación por la hinchazón, pata inflamada, todos los demás parámetros como los anteriores)
1.5 / enfermedad moderada	artritis moderada (inflamación de la articulación de la pata, distorsión + deformación del último dedo hacia adentro, agarre breve en una superficie invertida o inclinada, como una rejilla de alambre o la tapa de la jaula, flexibilidad de todo el cuerpo reducida, fuerza de agarre reducida)
2 / enfermedad de moderada a severa	artritis de moderada a severa (hinchazón severa de articulaciones, patas y dedos, deformación de articulaciones y patas traseras, no se agarran a una superficie invertida o inclinada, tal como una rejilla de alambre o una tapa de jaula, sin flexibilidad de todo el

	cuerpo, sin fuerza de agarre, trepado y alimentación afectados, comienza a temblar al intentar moverse, pero logra avanzar)
2.5 / enfermedad severa	artritis severa (como arriba en 2 + deformación de los dedos en las patas delanteras, movimiento alterado del ratón, temblores sin ganas de moverse)
3 / enfermedad muy severa	artritis muy grave (anquilosis detectada en flexión y movimiento gravemente alterado, ratón moribundo, que ya ni tiembla, no puede girar/voltearse fácilmente cuando se inclina hacia un lado).

¹Puntuación de artritis como se indica en el eje-y en la Figura 12.

La artritis fue sensible al tratamiento con agentes terapéuticos dirigidos a la inhibición del TNF α humano. (Shealy et al., 2002, Arthritis Res. 4(5): R7).

Con el fin de establecer la eficacia dependiente de la dosis, se administraron diferentes dosis de la construcción ISVD mediante inyección intraperitoneal dos veces por semana de manera terapéutica a animales de 6 semanas de vida con signos y síntomas visibles de artritis (n = 8 animales por grupo). Se usó IgG1 humana purificada de suero de mieloma humano (BioXcell # BE0297) como control negativo, y se usó un mAb de referencia anti-hTNF α como control positivo para suprimir la artritis. La construcción ISVD F027300252 se administró a cuatro concentraciones de dosis diferentes de 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente. El tratamiento se continuó hasta las 11 semanas de vida. Las puntuaciones de artritis clínica se determinaron una vez por semana. Como se muestra en la Figura 12, el tratamiento de la construcción ISVD dio como resultado una supresión de las puntuaciones de artritis clínica a lo largo del tiempo que era dependiente de la dosis.

Los animales tratados con anticuerpo de control negativo IgG1 humano desarrollan una puntuación media de artritis de 1.58 ± 0.06 en la semana 11. El mAb de referencia anti-hTNF α suprimió completamente la progresión de la artritis, con una puntuación media de 0.61 ± 0.06 en la semana 11. F027300252 redujo la progresión de la artritis a la semana 11 con puntuaciones medias de 1.30 ± 0.09 (1 mg/kg), 0.89 ± 0.10 (3 mg /kg), 0.67 ± 0.08 (10 mg/kg) y 0.28 ± 0.04 (30 mg/kg). La supresión global de la artritis se analizó por el Área bajo

la curva (AUC, Figura 13). Todas las dosis de F027300252 suprimieron significativamente la progresión de la artritis de forma comparable al mAb de referencia anti-hTNF α en el modelo de artritis Tg197.

Al finalizar el tratamiento, las articulaciones de los tobillos de las extremidades posteriores se procesaron para histología y se evaluó la sección para detectar signos estructurales de artritis con el siguiente sistema de puntuación:

CRITERIOS HISTOPATOLÓGICOS ACUMULATIVOS PARA LA PUNTUACIÓN DE FENOTIPO ARTRÍTICO EN LAS ARTICULACIONES DEL TOBILLO		
PUNTUACIÓN ¹	ENFERMEDAD	CRITERIOS
0	Normal	sin patología detectable
1	Leve	hiperplasia de la membrana sinovial y presencia de infiltrados polimorfonucleares. Puede haber tendinitis leve.
2	Moderada	pannus y formación de tejido fibroso y erosión ósea subcondrial focal
3	Moderada-Severa	destrucción del cartílago y erosión ósea
4	Severa	extensa destrucción de cartílago y erosión ósea. Se pierde la estructura del contorno óseo

¹Puntuación de artritis como se indica en el eje-y en la Figura 14.

Los resultados de la puntuación histológica se muestran en la Figura 14. La artritis estructural y la destrucción articular fueron suprimidas significativamente por F027300252 a dosis más altas.

En conclusión, los resultados demuestran la supresión dependiente de la dosis de los signos y síntomas de la artritis, así como la inhibición de la progresión estructural por la construcción F027300252 de ISVD en un grado comparable con el mAb de referencia anti-hTNF α .

6.14 Ejemplo 14: Evaluación de la construcción ISVD anti-TNF / OX40L en un modelo de ratón reumatoide con artritis aguda dirigido por TNF α humano (CAIA).

La eficacia *in vivo* de la construcción ISVD anti-TNF-OX40L (F027300252) se evaluó en un modelo de artritis reumatoide aguda llamado artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA). El CAIA es un modelo preclínico de artritis reumatoide y se usa ampliamente para evaluar los efectos de fármacos antiartríticos en el desarrollo de fármacos (Nandakumar y Holmdahl (2007), *Methods Mol Med.*; 136: 215-23). Es un modelo de artritis inducida a corto plazo (7 días) con un cóctel de anticuerpos monoclonales anti-colágeno II y LPS. Para este experimento se utilizó un ratón TNF α y TNFR1 humanizado: C57BL/6NTac - $Tnfrsf1a^{tm4504.1(TNFRSF1A)Tac}Tnf^{tm4503.1(TNF)Tac}$. Todos los animales fueron dosificados y monitoreados de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en protocolos de estudio aprobados por el Comité de Bienestar de Animales de Laboratorio en Sanofi bajo la licencia de la agencia gubernamental alemana de bienestar animal. Las puntuaciones de artritis *in vivo* se evaluaron de forma ciega al operador. Los ratones machos y hembras con una edad mínima de 10 semanas se asignaron al azar por igual a los respectivos grupos de tratamiento. Los ratones recibieron 8 mg de un cóctel de anticuerpos anti-colágeno monoclonales (ArthritoMab, MDBiosciense, CIA-MAB-2C) mediante inyección intraperitoneal (ip) en PBS estéril el día 0, seguido de 25 μ g de LPS IP en PBS 24 horas después. Los ratones se controlaron durante 7 días. El tratamiento se administró 6 horas después de LPS el día 1 con control de isotipo (IgG1 Isotipo 1.0 mg /kg ip 200 μ L/ratón), construcción multiespecífica TNF α -OX40L ISVD F027300252 a 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg (200 μ L/ratón) en comparación con mAb de referencia anti-hTNF α (anticuerpo convencional) a 0.1 y 0.5 mg/kg en 200 μ L/ratón. La dosis aplicada equivale a una exposición molar estimada en 0.45, 1.5, 4.5 y 15 nmol/kg para F027300252 y 0.65 y 3.3 nmol/kg para mAb de referencia anti-hTNF α . Para el mAb de referencia anti-hTNF α se realizaron dos estudios, y los animales vehículo se agruparon para el análisis final. Se aplicó una segunda dosis a todos los animales tres días después de la primera dosis el día 4 del experimento. Un diseño de estudio esquemático del experimento se muestra en la Figura 15.

Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 16. Los animales de control tratados con vehículo se combinaron a partir de dos experimentos con diferentes concentraciones de mAb de referencia anti-hTNF α ensayadas frente al control. Se consiguió un aumento máximo medio en la puntuación de artritis de 6.135 el día 6. El mAb de referencia anti-hTNF α de control positivo mostró un efecto pronunciado sobre la puntuación de artritis y bloqueó completamente el desarrollo de la enfermedad a la concentración más alta probada (3.3 nmol/kg). La construcción de ISVD anti-TNF α -OX40L F027300252 demostró un efecto dependiente de la dosis con una potencia *in vivo* similar en comparación con el mAb de referencia anti-hTNF α . Solo la dosis más baja de 0.45 nmol/kg mostró aproximadamente un 50% de efecto que es comparable al mAb de referencia anti-hTNF α de dosis más baja con 0.65 nmol/kg, pero todas las demás dosis probadas para la construcción ISVD bloquearon completamente el desarrollo de la enfermedad. La segunda dosis más baja probada con 1.5 nmol/kg para F027300252 parece ser al menos similar, si no más eficaz, que el mAb de referencia anti-hTNF α a 3.3 nmol/kg.

El pronunciado efecto dosis-dependiente de la construcción ISVD F027300252 es más obvio en la Figura 17, donde se representa el AUC de los datos de puntuación de artritis en la Figura 16. Todas las dosis de F027300252 redujeron significativamente la puntuación de artritis con una inhibición completa de la enfermedad desde 1.5 nmol/kg hacia arriba. El efecto fue comparable al mAb de referencia anti-hTNF α a exposición/dosis equimolar.

En conclusión, estos resultados demuestran que la construcción ISVD anti-TNF-OX40L fue tan buena o potencialmente superior en cuanto a la selección de TNF α humano en comparación con el mAb de referencia anti-hTNF α en un modelo de artritis reumatoide aguda en ratones, lo que destaca su potencial inmunosupresor para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide. Las estadísticas son ANOVA de 1 vía y prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

6.15 Ejemplo 15: Prueba del mecanismo en un modelo combinado de respuesta de anticuerpos dependiente de células T de primates no humanos (TDAR) e hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) con F027300252.

El modelo de respuesta de anticuerpos dependiente de células T (TDAR) es una medida de la función inmunitaria que depende de la eficacia de múltiples procesos inmunitarios, incluida la captación y presentación de antígenos, la ayuda de las células T, la activación de las células B y la producción de anticuerpos. En este estudio se usó para determinar el efecto farmacodinámico de la construcción F027300252 de ISVD anti TNF-OX40L in vivo en primates no humanos. El objetivo de este estudio, además de la farmacodinamia, fue determinar la farmacocinética y la seguridad de F027300252 después de 5 administraciones subcutáneas semanales a monas cynomolgus hembras seguidas de un período de 30 días sin tratamiento después de la última dosis de F027200252 el día 29. Para evaluar los efectos de F027300252 en las funcionalidades del sistema inmunológico, la respuesta humoral se evaluó in vivo a través de un ensayo TDAR (después de la inmunización con hemocianina Keyhole Limpet - KLH -), mientras que la respuesta inmunitaria celular se evaluó mediante el ensayo in vivo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y los ensayos ex vivo ELISPOT utilizando el mismo antígeno que para TDAR, KLH.

Para este estudio se utilizó un total de 20 monos cynomolgus hembra (*Macaca fascicularis*) criados específicamente. Se seleccionaron primates no humanos como especie debido a la unión altamente selectiva de F027300252 a las dianas humanas. Los primates no humanos se eligieron basándose en la alta reactividad cruzada con el mono cynomolgus para F027300252. El elemento de ensayo no presenta reactividad cruzada con otras especies de roedores o no roedores. Por lo tanto, según los datos disponibles, el mono cynomolgus fue seleccionado como la especie de no roedores para las pruebas farmacológicas y no clínicas de seguridad, y los datos de antecedentes de estudios anteriores están disponibles en la organización de investigación por contrato (CRO) con la que trabajamos, Citoxlab, Francia. Además, los ensayos TDAR y DTH han sido validados en monos cynomolgus antes en el CRO con el que trabajamos.

La seguridad preliminar de F027300252 se evaluó en un estudio cino de dosis repetidas a 25 mg/kg por vía subcutánea (sc) con dos administraciones separadas por 2 semanas (estudio n° DIV1953). Las dosis seleccionadas en este estudio combinado TDAR-DTH abarcan un rango que cubre tanto las dosis potencialmente farmacológicas (3 y 10 mg/kg) como las dosis más altas para la evaluación de la seguridad (30 y 100 mg/kg). Las formulaciones de dosis se administraron semanalmente durante un período de 29 días con un total de 5 administraciones. El día 1 corresponde al primer día del período de tratamiento con los elementos de ensayo y control.

La farmacocinética de las dosis seleccionadas se muestra en la Figura 19.

El antígeno KLH se administró el día 3 y el día 31 por vía subcutánea a una dosis de 10 mg/animal en 1 ml (Figura 18). Utilizamos Imject® Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin (ThermoFisher Scientific, ref. No. 77600). Para la cuantificación de IgG anti-KLH, se recogió sangre venosa (1 ml) de una vena adecuada en un tubo plano de acuerdo con un programa de planificación predefinido. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente para permitir la coagulación (máximo 2 horas) pendiente de centrifugación (aproximadamente 3000 g durante 10 minutos a + 4°C), y el suero resultante se dividió en 3 alícuotas de 80 µL + 1 alícuota del volumen restante. Los tubos se mantuvieron congelados a -20°C hasta el análisis. Los niveles de IgG anti-KLH se midieron utilizando un método ELISA específico desarrollado y validado en Citoxlab France (Citoxlab France/Estudio núm. 41106 RDP para IgG anti KLH). Para cada uno de los dos períodos (Día 3 [antes de la inyección de KLH] al Día 31 [antes de la inyección de KLH] y Día 31 [antes de la inyección de KLH] al Día 59), se calculó el área bajo la curva (AUC) para cada animal. Los valores de AUC se transformaron en logaritmos ($\log_{10}(\text{valor} + 1)$) y se analizaron por período utilizando una prueba de Wilcoxon.

Como era de esperar, la respuesta primaria a KLH con IgG fue menor. Después de la segunda exposición a KLH, se provocó una fuerte respuesta de IgG anti KLH en el grupo tratado con vehículo de control. El tratamiento con F027300252 dio como resultado una fuerte inhibición de esta respuesta desde la dosis más baja probada hacia arriba (Figura

20). En comparación con los datos de un estudio piloto utilizando herramientas de anticuerpos monoclonales contra TNF α (mAb de referencia anti-hTNF α) y OX40L (mAb de referencia anti-hOX40L), se representó el AUC del estudio F027300252 (Figura 21). Incluso con la dosis más baja probada para F027300252 (denominado "nanocuerpo" en la Figura 21) (3 mg/kg), observamos una reducción más pronunciada en el AUC en comparación con la monoterapia de mAb de referencia anti-hOX40L y mAb de referencia anti-hTNF α .

En la necropsia, recolectamos células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los monos para una reestimulación ex vivo usando el mismo antígeno (KLH) en un ensayo de inmunospot ligado a enzimas (ELISPOT) para medir la respuesta inmune celular. El ensayo ELISPOT es un inmunoensayo sensible que mide la frecuencia de células secretoras de citoquinas a nivel de una sola célula. En este ensayo, las células se sembraron en los pocillos de una placa de 96 pocillos prerrecubiertos con un anticuerpo de captura específico para la citoquina que se estaba ensayando (IFN- γ e IL-4 en este caso). Las citoquinas que son secretadas por las células en presencia (o ausencia) de estímulos, fueron capturadas por los anticuerpos específicos en la superficie del fondo del pozo en la vecindad de la célula secretora. Después de un tiempo de incubación apropiado, se extrajeron las células y se visualizó la citoquina secretada usando un anticuerpo de detección biotinilado. Después de varios pasos de lavado, se añadió una enzima (fosfatasa alcalina) acoplada con estreptavidina. Mediante el uso de un sustrato de precipitación, la citoquina inmovilizada se reveló como un ImmunoSpot (es decir, una célula secretora de citoquina individual). En cada muestra de PBMC, se analizó la frecuencia de las células secretoras de IFN- γ e IL-4 después de la estimulación con KLH.

Las placas ELISPOT se escanearon numéricamente en el sitio de prueba usando un analizador Immunospot® ELISPOT (imágenes de pocillos individuales tomadas por el instrumento). Luego, las imágenes se analizaron en un software dedicado para la evaluación del recuento de puntos. Se evaluó la presencia de manchas y el número de manchas en cada pocillo y se calcularon los resultados correspondientes expresados como

el número de células formadoras de manchas de IFN- γ o IL-4 (sfc). El número de sfc se normalizó por millón de PBMC.

Las células estimuladas de animales de control con vehículo mostraron un marcado aumento en IFN- γ (Figura 22) e IL-4 (Figura 23). Tras el tratamiento, ambas citoquinas disminuyeron notablemente en todas las dosis probadas para F027300252 (Figuras 22 y 23).

En conclusión, estos resultados demuestran que la construcción ISVD anti-TNF-OX40L inhibió fuertemente la interacción entre células presentadoras de antígeno, células T, células B en un modelo de prueba de mecanismo de respuesta de anticuerpos dependiente de células T realizado en primates no humanos.

La segunda parte del estudio de primates no humanos se centró en una lectura in vivo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en la piel para evaluar la respuesta inmunitaria celular in vivo. Se utilizaron como antígeno toxoide tetánico (TTx) e hidróxido de aluminio. La provocación con DTH se aplicó como se describe en la Figura 18. Se delimitó una cuadrícula de aproximadamente 21 cm de largo x 3 cm de ancho (es decir, con cuadrados de 3 cm de lado) a cada lado del dorso (Figura 24) con un bolígrafo quirúrgico indeleble en la piel, con un punto que indica el lugar de la inyección en el centro de cada cuadrado. El lugar de la inyección se desinfectó con una solución de gluconato de clorhexidina (Antisept® Spray).

Los antígenos (TTx/ALU y KLH) se inyectaron cada uno en el centro de seis cuadrados el día de la inyección. Las inyecciones intradérmicas se realizaron utilizando una jeringa de plástico estéril de un solo uso equipada con una aguja 29 G estéril de un solo uso, estirando la piel e introduciendo la aguja en el grosor de la piel (bisel hacia arriba). Apareció una pequeña vesícula en el lugar de la inyección. Luego, la aguja se retiró rápidamente de la piel.

Durante la fase in vivo de la DTH se evaluaron y documentaron los siguientes parámetros (tabla 15).

Tabla 15

Formación de eritema	
. sin eritema	0
. eritema muy leve (apenas perceptible)	1
. eritema bien definido.....	2
. eritema moderado a severo	3
. eritema severo (enrojecimiento color remolacha) a leve formación de escaras (lesiones en profundidad)	4
Formación de edema	
. sin edema.....	0
. edema muy leve (apenas perceptible).....	1
. edema leve (bordes del área bien definidos por una elevación definida).....	2
. edema moderado(elevado aproximadamente 1 milímetro)	3
. edema severo (elevado más de 1 milímetro y extendido más allá de la zona de la exposición).....	4

Ninguno de los parámetros enumerados anteriormente mostró una tendencia clara para un efecto del tratamiento con F027300252, lo que indica que una evaluación histopatológica y una inmunohistoquímica podrían ser más sensibles para demostrar una diferencia en comparación con las alteraciones macroscópicas de la piel durante la fase in vivo de la parte DTH del modelo.

Para la inmunohistoquímica se evaluaron los siguientes marcadores: CD3 (linfocitos T), CD4 (células T auxiliares), CD8 (células T citotóxicas), CD30 (linfocitos B), CD68 (macrófagos), Ki67 (marcador de proliferación) y FoxP3 (T regulador células). Los resultados de la tinción histopatológica e inmunohistoquímica (IHC) convencional de H&E se resumen a continuación.

Para el primer antígeno, TTx/ALU, el día 34 la respuesta inmunitaria estuvo dominada por macrófagos. Se observó una ligera disminución dependiente de la dosis en la gravedad de la inflamación con efectos más pronunciados a la dosis más alta. La inmunohistoquímica reveló una disminución notable en la puntuación de todos los marcadores en la dosis más alta probada, disminuyendo principalmente los macrófagos. En la necropsia del día 59, se observó una respuesta inflamatoria general ligeramente inferior en comparación con el día 34. De manera similar al día 34, la IHC reveló el efecto más destacado sobre el marcador

de proliferación Ki67. En general, el efecto fue el más pronunciado con la dosis más alta ensayada para F027300252.

Para el segundo antígeno ensayado, KLH, la observación en el día 34 mostró una respuesta inmunitaria dominada por los granulocitos eosinófilos. En general, la respuesta inflamatoria fue moderadamente menor en comparación con TTX/Alu el día 34. IHC reveló una disminución notable en la puntuación de todos los marcadores a la dosis más alta ensayada con CD8+, CD20 y Ki67 principalmente disminuidos. El día 59, la respuesta inflamatoria fue nuevamente moderadamente menor en comparación con TTX/Alu el día 59 y mínimamente menor en comparación con KLH el día 34. Fue una disminución mínima con una clara respuesta a la dosis en la gravedad de la inflamación observada. Al igual que en el día 34, IHC reveló el efecto más prominente a la dosis más alta ensayada de F027300252 en CD3, CD8+, CD20 y FoxP3, que disminuyeron principalmente.

En general, los datos descritos proporcionan una prueba del mecanismo en un modelo combinado de respuesta de anticuerpos dependiente de células T de primates no humanos (TDAR) y de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) con F027300252, una nueva construcción ISVD multiespecífica dirigida a TNF α y OX40L que se confirmó con un ensayo ELISPOT ex vivo inducido por KLH que mide la liberación de IFN- γ e IL4.

6.16 Ejemplo 16: Evaluación de la construcción F027300252 de ISVD anti-TNF/OX40L en el modelo de enfermedad xenogénica de injerto contra huésped.

Se evaluó la eficacia *in vivo* de la construcción F027300252 de ISVD anti-TNF α /OX40L en un modelo de enfermedad xenogénica de injerto contra huésped (xeno-EICH). En este modelo, se inyectan células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC) en ratones NOD-scid IL2rgamma(null) (NSG) inmunodeprimidos e irradiados (King et al. (2009), *Clin Exp Immunol.*, 157 (1): 104-118). Las hPBMC injertadas atacan al huésped murino de una manera dependiente del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que da lugar a síntomas de EICH aguda (Brehm et al. (2019), *FASEB J.*, 33(3):3137-3151).

Se asignaron al azar ratones hembra NSG con una edad mínima de 6 semanas por igual a los respectivos grupos de tratamiento. Los ratones se irradiaron con 1 Gy un día antes de la inyección intravenosa (iv) con 2×10^7 hPBMC. Los animales se puntuaron individualmente de forma ciega al operador tres veces por semana utilizando el siguiente sistema de puntuación (Riesner *et al.* (2016), *Bone Marrow Transplant.*, 51(3):410-417):

Tabla 16:

Puntuación	Postura	Pelo	Actividad	Piel	Pérdida de peso
0.5	cifosis leve, solo en reposo	leve rizado	leve disminución	áreas rojizas e irritadas	>5 %
1	cifosis moderada	rizado moderado (>20 %)	moderada disminución, aislamiento	descamación, áreas de piel seca (<20 %)	>10 %
1.5	cifosis fuerte, movimiento levemente alterado	rizado severo (> 40%), leve pérdida de pelo	inmóvil hasta ser estimulado, trastornos de coordinación, estereotipos	descamación, áreas de piel seca (>20 %)	>15 %
2 =aborto	cifosis severa, movimiento deficiente distintivo	rizado severo (> 60%), aseo deficiente, pérdida de pelo de moderada a grave	letargo, parálisis, tambaleo	descamación, áreas de piel secas (> 40%), áreas de piel abiertas y con sangre	>20%

La puntuación de la EICH se determinó mediante la suma de estos parámetros. Los animales se sacrificaron cuando alcanzaron una puntuación única de 2 o superaron una puntuación acumulada de 6. El grado de injerto de hPBMC en ratones hospedadores se evaluó determinando las células CD45+ humanas entre todas las células CD45+ en la sangre periférica de los ratones hospedadores usando citometría de flujo. Se administró por vía intraperitoneal Nanocuerpo F027300252 (10 mg/kg) anti-TNF/OX40L biespecífico tres veces por semana, comenzando el día 1 y se comparó con los animales de control tratados con Isotipo. Todos los animales fueron dosificados y monitoreados de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales sobre protocolos de estudio aprobados por el Comité de Bienestar Animal de Laboratorio en Sanofi bajo la licencia de la agencia gubernamental alemana de bienestar animal.

Para validar TNF y OX40L como dianas para construcciones de ISVD en el modelo de ratón xeno-EICH, se administraron IP 150 nmol/kg de ISVD F027500018 anti-TNF humano, 150 nmol/kg de ISVD F027300044 anti-OX40L humano o el ISVD F027300252 anti-TNF/OX40L

biespecífico (150 nmol/kg) tres veces a la semana, comenzando el día 1 y se compararon con los animales de control tratados con isotipo. Los primeros síntomas de EICH en ratones hospedadores se observaron dentro de las dos semanas posteriores a la inyección de hPBMC. En los animales de control tratados con isotipo, la puntuación EICH aumentó continuamente con la progresión de los estudios hasta que todos los ratones de este grupo fueron encontrados muertos o sacrificados cuando se alcanzaron los puntos finales humanitarios descritos anteriormente. El bloqueo de TNF tuvo solo un efecto leve sobre el desarrollo de la enfermedad, mientras que el bloqueo de OX40L pudo mejorar significativamente la progresión de la enfermedad (Figura 25). La doble focalización mediante el tratamiento con F027300252 dio como resultado un desarrollo de enfermedad similar al observado para el bloqueo de OX40L solo. En consecuencia, la supervivencia de los grupos tratados con F027500018 se prolongó sólo ligeramente, mientras que F027300044 solo o el tratamiento de combinación con F027300252 anti-TNF/OX40L dio como resultado una supervivencia más prolongada (Figura 26). Además, el bloqueo de OX40L usando F02730044 o F027300252 tendió a inhibir el injerto de células CD45+ humanas en ratones hospedadores (Fig. 27).

Para evaluar el ISVD F027300252 anti-TNF/OX40L biespecífico en el modelo de ratón xeno-EICH, se recopilaron datos adicionales y se combinaron los resultados de dos estudios independientes. La aparición de EICH se observó a los pocos días en ratones transferidos con hPBMC. El 50% de los animales que recibieron solo el isotipo ISVD fueron encontrados muertos o alcanzaron los criterios de aborto dentro de las cinco semanas posteriores a la transferencia. Aunque el tratamiento con F027300252 no previno la aparición de la enfermedad, pudo mejorar la progresión de la enfermedad (Figura 28) y, en consecuencia, prolongó la supervivencia de los ratones tratados con F027300252. Más del 50% de los animales permanecieron vivos más allá de la semana 9 (Figura 29). En algunos casos, los ratones tratados con F027300252 pudieron recuperarse de la enfermedad y sobrevivir hasta el final de los estudios. Además, se encontró que la aplicación de F027300252 inhibe el injerto de células CD45+ humanas en ratones NSG huésped (Figura 30), lo que se

correlaciona con un desarrollo más lento de la enfermedad y una supervivencia prolongada.

En resumen, estos resultados demuestran la eficacia del bloqueo de OX40L y el tratamiento con F027300252 en el modelo de ratón xeno-EICH.

6.17 Ejemplo 17: Inhibición de la liberación de IL-8 inducida por PHA en sangre completa humana por un anticuerpo anti-TNF y las construcciones ISVD anti-TNF α anti-OX40L biespecíficas F027300252, F027301104, F027301189, F027301197 y F027301199.

Para medir el efecto del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-TNF α RA14956298 (de Sanofi) así como de los ISVD anti-TNF α /anti-OX40L biespecíficos F027300252, F027301104, F027301189, F027301197 y F027301199 (todos de Sanofi) sobre la liberación de IL-8 inducida por PHA en sangre humana completa, se extrajo sangre de donantes humanos sanos en tubos de recogida de sangre Vacutainer (BD # 368480) en presencia de Na-Heparina [17 UI/ml] como anticoagulante. Se reconstituyó PHA-L (fitohemaglutinina-L; de Merck Millipore; número de pedido # M5030) como solución madre [1 mg/ml] en agua estéril, y se preparó una solución de trabajo con [50 μ g/ml] PHA-L. Las soluciones de trabajo del anticuerpo de control negativo RA11944493 (Sanofi; ctrl de isotipo IgG1), del anticuerpo de control positivo RA14956298 (de Sanofi, el control negativo VHH IRR00119 (de Sanofi/Ablynx) y de las construcciones biespecíficas anti-TNF α /anti-OX40L ISVD F027300252 , F027301104, F027301189, F027301197 y F027301199 (todos de Sanofi / Ablynx) se prepararon a 500 nM en PBS.

Diluciones en serie de los anticuerpos y las construcciones de ISVD entre concentraciones finales de 8 pM a 25 nM en medio [RPMI-1640 (de Gibco; número de pedido 61870-010) + suero AB humano al 10% (de Sigma; número de pedido H3667) + 1% PenStrep (de Gibco; número de pedido 15140-122)] se añadieron en 25 μ l a microplacas de 96 pocillos (fondo en V, PP; de Eppendorf; número de pedido 0030601300). Se añadieron 200 μ l de sangre humana a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con una tapa sobre la placa. Se diluyó PHA-L a una concentración de 50 μ g/ml en medio [RPMI-1640

+ suero AB humano al 10% + PenStrep al 1%], y se agregaron 25 μ l de este PHA-L en medio a cada pocillo de la mezcla de preincubación de sangre humana con los anticuerpos o construcciones ISVD en la placa de 96 pocillos. Las muestras se mezclaron suavemente, las placas se sellaron con una tapa estéril (usando el sellador de placas Thermo Scientific; número de pedido 236366) y las placas se incubaron durante 6 h a 37°C, 5% de CO₂, 95% de HR. Después de la incubación, las muestras de sangre se centrifugaron durante 12 min a 2000 x g, utilizando una rampa intermedia para aceleración y rotura. El sobrenadante de plasma se recogió y se almacenó a -80°C en una nueva microplaca de 96 pocillos para análisis adicionales mediante ELISA. Los niveles de IL-8 se determinaron utilizando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA; de Invitrogen; número de catálogo 88-8086) para la detección cuantitativa de IL-8 humana de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Se utilizó el programa XLfit en Speed para ajustar las curvas de respuesta a la dosis y calcular los valores de IC₅₀ en la Figura 31 basándose en los resultados de 3 donantes de sangre diferentes.

La incubación de sangre entera humana con el anticuerpo de control negativo RA11944493 o el control negativo VHH IRR00119 no condujo a ninguna inhibición de la liberación de IL-8 inducida por PHA (datos no mostrados). Por el contrario, la incubación de sangre entera humana con el anticuerpo monoclonal anti-TNF monoespecífico (mAB) RA14956298 condujo a una fuerte inhibición de la liberación de IL-8 inducida por PHA con una IC₅₀ de 0,96 nM ($\pm$ 0.08 SEM) (Figura 31). La incubación de sangre entera humana con la construcción ISVD anti-TNF α /anti-OX40L biespecífica F027300252 condujo a una inhibición aún más fuerte de la liberación de IL-8 inducida por PHA con una IC₅₀ de 0,33 nM ($\pm$ 0.09 SEM) (Figura 31). Las construcciones ISVD anti-TNF α /anti-OX40L biespecíficas F027301104, F027301197 y F027301199 también condujeron a una fuerte inhibición de la liberación de IL-8 inducida por PHA con valores de IC₅₀ de 0,8233 ($\pm$ 0,4 SEM), 0.5667 ($\pm$ 0,27 SEM) y 0.3133 ($\pm$ 0.08 SEM), respectivamente (Figura 31). La construcción biespecífica anti-TNF α /anti-OX40L ISVD F027301189 tuvo la potencia más baja con un IC₅₀ de 2.143 ($\pm$ 1.54 SEM) (Figura 31).

7 Aplicabilidad industrial

Los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico que codifican los mismos, los vectores que comprenden los ácidos nucleicos y las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento de sujetos que padecen una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria.