

## **POLIPÉPTIDOS QUE COMPRENEN DOMINIOS VARIABLES ÚNICOS DE INMUNOGLOBULINA DIRIGIDOS A TNF $\alpha$ E IL-23**

### **DESCRIPCIÓN**

#### **1 Campo de la presente tecnología**

La presente tecnología se refiere a polipéptidos dirigidos a TNF $\alpha$  y la subunidad p19 de IL-23. 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, ácido nucleico o vector. La presente tecnología se refiere además a estos productos para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, artritis psoriásica o hidradenitis supurativa. Además, la presente tecnología se refiere a métodos de producción de estos productos.

#### **2 Antecedentes tecnológicos**

Las enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias son el resultado de una respuesta inmunitaria producida por un organismo contra su propio tejido. Las enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias a menudo son crónicas e incluso pueden ser potencialmente mortales. Entre otras, las enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa. La enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, es una enfermedad inflamatoria crónica que implica inflamación intestinal y lesión epitelial simultánea. Otras enfermedades autoinmunitarias crónicas, tales como psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa, se caracterizan por máculas de piel roja, seca, pruriginosa 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 mayor probabilidad de tener determinadas comorbilidades, incluyendo diabetes y enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, y cáncer.

La interleucina 23 (IL-23) es una citocina importante en la activación de diversos inmunocitos durante la inducción de la inflamación crónica. La IL-23 es un regulador retrógrado de las

citocinas IL-6, IL-17, GM-CSF e IL-22, y es un heterodímero que consiste en una subunidad p19 (subunidad alfa de IL-23, también denominada en la presente memoria IL-23p19) unida covalentemente a una subunidad p40 (la subunidad p40 está compartida con la citocina IL-12 y también se llama subunidad beta de IL-12). Además, la IL-23 desempeña una función importante en la respuesta inmunitaria inflamatoria de linfocitos T, así como en la regulación de la actividad inflamatoria de las células linfáticas innatas. La IL-23 se ha implicado con enfermedades inflamatorias incluyendo enfermedad inflamatoria del intestino y otras enfermedades autoinmunitarias.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una citocina homotrimérica que se produce principalmente por monocitos y macrófagos, pero también se sabe que se secreta por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en la sangre periférica. El TNF $\alpha$  puede existir como una forma soluble o como una proteína transmembranaria. La función principal de TNF $\alpha$  es en la regulación de los inmunocitos. El TNF $\alpha$  actúa como pirógeno endógeno y la desregulación de su producción se ha implicado en una diversidad de enfermedades humanas incluyendo enfermedad inflamatoria del intestino y otras enfermedades autoinmunitarias, tales como psoriasis.

Los tratamientos actualmente aprobados por la FDA para enfermedad inflamatoria del intestino incluyen productos biológicos anti-TNF $\alpha$  (tales como Simponi<sup>®</sup> [golimumab], Enbrel<sup>®</sup> [etanercept], Remicade<sup>®</sup> [infliximab] y Humira<sup>®</sup> [adalimumab]). Sin embargo, los tratamientos anti-TNF $\alpha$  actuales para enfermedad inflamatoria del intestino afrontan un gran porcentaje de pacientes que no son sensibles a los tratamientos actualmente disponibles, y se produce pérdida de respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  en un alto porcentaje de pacientes después de 12 meses de tratamiento.

Para la psoriasis y la artritis psoriásica, únicamente una minoría de pacientes se trata con productos biológicos (incluyendo REMICADE<sup>®</sup> [infliximab] y HUMIRA<sup>®</sup> [adalimumab], así como STELARA<sup>®</sup> [ustekinumab] que está dirigido a la subunidad p40 compartida de las citocinas IL-12 e IL-23). Están en marcha tratamientos adicionales con anticuerpos dirigidos a IL-23, incluyendo guselkumab (Tremfya; aprobado en psoriasis y en ensayo clínico en fase 3 para enfermedad inflamatoria del intestino y artritis psoriásica) y risankizumab (Skyrizi; aprobado en psoriasis y en ensayo clínico en fase 3 para artritis psoriásica y enfermedad de Crohn). Aunque la clase de anticuerpos anti-IL-23 dirigidos a p19 podría conferir alguna eficacia

supresora de enfermedad en psoriasis, pacientes con diferentes enfermedades autoinmunitarias y/o adicionales no necesariamente se benefician de esos tratamientos en la misma medida. En artritis psoriásica, por ejemplo, el tratamiento con anti-IL23 no mejora la respuesta de las articulaciones inflamadas. En enfermedades inflamatorias del intestino, más  
5 de la mitad de los pacientes no responden o pierden respuesta a inhibidores de TNF. Lo mismo es válido para la hidradenitis supurativa, para la que el único tratamiento aprobado hasta ahora es HUMIRA® [adalimumab], aunque solo aproximadamente un 50 % de los pacientes responden.

Abordar múltiples factores de la enfermedad puede conseguirse, por ejemplo, mediante  
10 coadministración o uso combinado de dos productos biológicos diferentes, por ejemplo, anticuerpos que se unen a diferentes dianas terapéuticas. Sin embargo, la coadministración o uso combinado de productos biológicos diferentes puede ser problemático, tanto desde un punto de vista práctico como desde un punto de vista comercial. Por ejemplo, dos inyecciones de productos diferentes da como resultado una pauta de tratamiento más incómoda y más  
15 dolorosa para los pacientes, lo que puede afectar negativamente a su cumplimiento. Con respecto a una sola inyección de dos productos diferentes, 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 coformulación requiere la producción de dos fármacos diferentes, lo que puede aumentar los  
20 costes globales.

Se han sugerido anticuerpos biespecíficos que pueden unirse a dos antígenos diferentes como una estrategia para abordar dichas limitaciones asociadas con la coadministración o uso combinado de productos biológicos diferentes, tales como anticuerpos.

Se ha propuesto construcciones de anticuerpos biespecíficos en múltiples formatos. Por  
25 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): pág. 81-83; Glennie, M. J., *et al.*, J Immunol, 1987. 139(7): pág. 2367-2375). En determinados formatos, un fragmento de Fv monocatenario (scFv) que se une a un antígeno específico se une a un anticuerpo IgG que se une a un antígeno diferente (por ejemplo, documento WO  
30 2016/073406 que describe un anticuerpo biespecífico IgG-scFv anti-TNF $\alpha$ /anti-IL-23). El

documento WO 2019/027780 describe un anticuerpo IgG heterodimérico en que un par de región variable de la cadena pesada y ligera se dirige a TNF $\alpha$  y el otro par de región variable de la cadena pesada y ligera se dirige a IL-23.

Las desventajas de dichos formatos de anticuerpos biespecíficos incluyen, sin embargo, alta viscosidad a alta concentración, haciendo que, por ejemplo, la administración subcutánea sea problemática, y que cada unidad de unión requiera la interacción de dos dominios variables para una unión específica y de alta afinidad, lo que comprende implicaciones sobre la estabilidad del polipéptido y la eficacia de producción. Dichos formatos de anticuerpos biespecíficos también pueden dar lugar posiblemente a cuestiones de química, fabricación y control (CMC) relacionadas con el mal emparejamiento de las cadenas ligeras o el mal emparejamiento de las cadenas pesadas.

### 3 Compendio de la presente tecnología

En algunas realizaciones, la presente tecnología se refiere a un polipéptido o construcción dirigida específicamente a TNF $\alpha$  e IL-23. La dirección a TNF $\alpha$  e IL-23 al mismo tiempo da lugar a una eficacia aumentada de modulación de una respuesta inflamatoria en comparación con polipéptidos monoespecíficos anti-TNF $\alpha$  o anti-IL-23.

Dichos polipéptidos mostraron ser muy potentes sobre TNF $\alpha$  e IL-23 (por ejemplo, TNF $\alpha$  e IL-23 humanos y de macaco), podrían producirse de forma eficaz (por ejemplo, en hospedadores microbianos tales como *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*) y mostraron baja viscosidad a altas concentraciones, lo que es ventajoso y conveniente para administración subcutánea. Además, dichos polipéptidos podrían mostrar reactividad limitada contra los anticuerpos preexistentes en el sujeto a tratar (es decir, los anticuerpos presentes en el sujeto antes del primer tratamiento con la construcción de anticuerpo). En otras realizaciones, dichos polipéptidos muestran una semivida en el sujeto a tratar que se suficientemente larga de modo que puedan espaciarse convenientemente los tratamientos consecutivos.

El polipéptido de la presente tecnología comprende o consiste en al menos tres dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD), en el que al menos un ISVD se une específicamente a TNF $\alpha$  y al menos dos ISVD se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23. En una realización, el al menos un ISVD que se une a TNF $\alpha$  se une específicamente a

TNF $\alpha$  humano y los al menos dos ISVD que se unen a IL-23 se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23 humana.

En una realización, el polipéptido comprende además uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos, en que dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión proporcionan al polipéptido una semivida aumentada, en comparación con el correspondiente polipéptido sin dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión. Por ejemplo, la unidad de unión puede ser un ISVD que se une a una proteína sérica (humana), tal como a seroalbúmina humana.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico que puede expresar el polipéptido de la presente tecnología, un vector que comprende el ácido nucleico y una composición que comprende el polipéptido, ácido nucleico o vector.

El polipéptido de la presente tecnología, una composición que comprende el polipéptido y una composición que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido puede usarse como medicamento. El polipéptido para su uso como medicamento comprende o consiste en al menos tres dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD), en el que cada uno de dichos ISVD comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos; y en el que:

a) un primer ISVD comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 6;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 10; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14;

b) un segundo ISVD comprende

- iv. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 7;
- v. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11; y
- vi. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15; y

c) un tercer ISVD comprende

- vii. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 9;
- viii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13; y
- ix. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 17,

en el que los ISVD están en el orden empezando desde el extremo N.

La composición de la presente tecnología es para su uso como medicamento. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende además al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprende uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

El polipéptido tal cual (posiblemente presente en una composición o posiblemente codificado por un ácido nucleico) comprende o consiste en al menos tres dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD), en el que cada uno de dichos ISVD comprende tres regiones

determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos; y en el que:

a) un primer ISVD comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 6;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 10; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14;

b) un segundo ISVD comprende

- iv. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 7;
- v. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11; y
- vi. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15; y

c) un tercer ISVD comprende

- vii. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 9;
- viii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13; y

- ix. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 17,

en el que los ISVD están en el orden empezando desde el extremo N.

- 5 En una realización, el polipéptido se une específicamente a TNF $\alpha$  y la subunidad p19 de IL-23. En una realización, el polipéptido se une específicamente a TNF $\alpha$  humano y la subunidad p19 de IL-23 humana. En una realización, el primer ISVD presente en el polipéptido se une específicamente a TNF $\alpha$  y el segundo y tercer ISVD presentes en el polipéptido se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23. En una realización, el primer ISVD presente en el polipéptido se une específicamente a TNF $\alpha$  humano y el segundo y tercer ISVD presentes en el polipéptido se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23 humana.

El polipéptido de la presente tecnología puede comprender:

- 15 a) un primer ISVD que comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- b) un segundo ISVD que comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y
- 20 c) un tercer ISVD que comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

El polipéptido de la presente tecnología puede comprender:

- a) un primer ISVD que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 2;
- 25 b) un segundo ISVD que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 3; y
- c) una tercera secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) de identidad con SEQ ID NO: 5.

El polipéptido de la presente tecnología puede comprender:

- a) un primer ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- b) un segundo ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y
- c) un tercer ISVD que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

5 El polipéptido de la presente tecnología puede comprender además uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos, en que dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión proporcionan al polipéptido una semivida aumentada, en comparación con el correspondiente polipéptido sin dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades  
 10 de unión. Dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se pueden elegir del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una parte Fc y proteínas pequeñas o péptidos que pueden unirse a proteínas séricas. Las unidades de unión que proporcionan al polipéptido  
 15 una semivida aumentada pueden elegirse del grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG), por ejemplo, seroalbúmina humana.

El polipéptido de la presente tecnología puede comprender un ISVD que se une a seroalbúmina humana que comprende:

- 20 i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 8;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 12; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o una secuencia  
 25 de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 16.

En una realización, el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En una

realización, el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 4. En una realización, el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

- 5 La unión de ISVD a la albúmina de suero humano se puede colocar en el polipéptido de la presente tecnología en cualquier posición (es decir, en el extremo N, entre dos bloques de construcción, o en el extremo C. En una realización, la unión de ISVD a la seroalbúmina humana se coloca entre el segundo y el tercer ISVD que se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23.
- 10 El polipéptido de la presente tecnología puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 1. En una realización, el polipéptido de la presente tecnología comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

También se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que  
15 codifica un polipéptido de la presente tecnología.

También se proporciona un hospedador o célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico.

También se proporciona un método para producir un polipéptido de la presente tecnología, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- 20 a) expresar, en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología; opcionalmente seguido de:
- b) aislar y/o purificar el polipéptido.

También se proporciona una composición que comprende al menos un polipéptido de la  
25 presente tecnología, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente tecnología. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende además al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y

opcionalmente comprende uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

El polipéptido de la presente tecnología puede usarse en el tratamiento. Más específicamente, el polipéptido de la presente tecnología puede usarse en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, tal como una enfermedad seleccionada de enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa.

Por consiguiente, la presente tecnología también abarca un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. En algunas realizaciones, la presente tecnología abarca un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa, en el que dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido de la presente tecnología, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente tecnología o una composición que comprende el mismo.

Por consiguiente, la presente tecnología también abarca el uso de un polipéptido de la presente tecnología, en la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmune o inflamatoria. En algunas realizaciones, la presente tecnología también abarca el uso de un polipéptido de la presente tecnología, en la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad seleccionada de enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa.

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 tres dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD), en el que cada uno de dichos ISVD comprende tres regiones determinantes de la

complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos; y en el que:

a) un primer ISVD comprende

- x. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 6;
- xi. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 10; y
- xii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14;

b) un segundo ISVD comprende

- xiii. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 7;
- xiv. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11; y
- xv. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15; y

c) un tercer ISVD comprende

- xvi. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 9;
- xvii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13; y

xviii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 17,

en el que los ISVD están en el orden empezando desde el extremo N.

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

10 Realización 3. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con la realización 1 o 2, en el que el polipéptido se une específicamente a TNF $\alpha$  y la subunidad p19 de IL-23.

Realización 4. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en el que el polipéptido se une específicamente a TNF $\alpha$  y la subunidad p19 de IL-23.

15 Realización 5. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que primer ISVD se une específicamente a TNF $\alpha$  y el segundo y tercer ISVD se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23

Realización 6. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que el primer ISVD se une específicamente a TNF $\alpha$  humano y el segundo y tercer ISVD se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23 humana.

20 Realización 7. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que:

a) dicho primer ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

25 b) dicho segundo ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y

c) dicho tercer ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

Realización 8. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en el que:

a) la secuencia de aminoácidos de dicho primer ISVD comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95%) con SEQ ID NO: 2;

b) la secuencia de aminoácidos de dicho segundo ISVD comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 3; y

c) la secuencia de aminoácidos de dicho tercer ISVD comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) de identidad con SEQ ID NO: 5.

Realización 9. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en el que:

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; y

c) dicho tercer ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de des SEQ ID NO: 5.

Realización 10. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en el que dicho polipéptido comprende además uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos, en que dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión proporcionan al polipéptido una semivida aumentada, en comparación con el correspondiente polipéptido sin dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión.

Realización 11. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con la realización 10, en que dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión  
5 que pueden unirse a proteínas séricas, una parte Fc y proteínas pequeñas o péptidos que pueden unirse a proteínas séricas.

Realización 12. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 10 a 11, en que dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se eligen del  
10 grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).

Realización 13. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con la realización 12, en que dicha unidad de unión que proporciona al polipéptido una semivida aumentada es un ISVD que puede unirse a seroalbúmina humana.

Realización 14. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con la realización 13, en el que el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 8;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 12; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 16.

Realización 15. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 13 a 14, en el que dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que es la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

Realización 16. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 13 a 15, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 4.

Realización 17. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 13 a 16, en el que dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

Realización 18. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 1.

Realización 19. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en el que el polipéptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Realización 20. El polipéptido o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 19, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad seleccionada de enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa.

Realización 21. Un polipéptido que comprende o consiste en al menos tres dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD), en el que cada uno de dichos ISVD comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos; y en el que:

a) un primer ISVD comprende

- x. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 6;
- xi. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 10; y
- xii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14;

b) un segundo ISVD comprende

- xiii. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 7;
- xiv. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11; y
- xv. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15; y

c) un tercer ISVD comprende

- xvi. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 9;
- xvii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13; y
- xviii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 17,

en el que los ISVD están en el orden empezando desde el extremo N.

Realización 22. El polipéptido de acuerdo con la realización 21, en el que el polipéptido se une específicamente a TNF $\alpha$  y la subunidad p19 de IL-23.

Realización 23. El polipéptido de acuerdo con las realizaciones 21 o 22, en el que el polipéptido se une específicamente a TNF $\alpha$  humano y la subunidad p19 de IL-23 humana.

5 Realización 24. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 23, en el que el primer ISVD se une específicamente a TNF $\alpha$  y el segundo y tercer ISVD se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23.

Realización 25. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 24, en el que el primer ISVD se une específicamente a TNF $\alpha$  humano y el segundo y tercer ISVD se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23 humana.

Realización 26. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 25, en el que:

15 a) dicho primer ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

b) dicho segundo ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y

20 c) dicho tercer ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

Realización 27. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 26, en el que:

25 a) la secuencia de aminoácidos de dicho primer ISVD comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 2;

b) la secuencia de aminoácidos de dicho segundo ISVD comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 3; y

- c) la secuencia de aminoácidos de dicho tercer ISVD tiene una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) de identidad con SEQ ID NO: 5.

Realización 28. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 27, en el que:

- 5 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; y  
c) dicho tercer ISVD comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Realización 29. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 28, en el que dicho polipéptido comprende además uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos, en que  
10 dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión proporcionan al polipéptido una semivida aumentada, en comparación con el correspondiente polipéptido sin dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión.

Realización 30. El polipéptido de acuerdo con la realización 29, en que dicho uno o más  
15 distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una parte Fc y proteínas pequeñas o péptidos que pueden unirse a proteínas séricas.

20 Realización 31. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 29 a 30, en que dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada se eligen del grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a seroalbúmina (tal como seroalbúmina humana) o una inmunoglobulina sérica (tal como IgG).

25 Realización 32. El polipéptido de acuerdo con la realización 31, en que dicha unidad de unión que proporciona al polipéptido una semivida aumentada es un ISVD que puede unirse a seroalbúmina humana.

Realización 33. El polipéptido de acuerdo con la realización 32, en el que el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 8;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 12; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 16.

Realización 34. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32 a 33, en el que el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

Realización 35. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32 a 33, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 4.

Realización 36. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32 a 35, en el que dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

Realización 37. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32 a 36, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende una identidad de secuencia de más de un 90 % (tal como un 95 %) con SEQ ID NO: 1.

Realización 38. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 37, en el que el polipéptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Realización 39. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 38.

Realización 40. Un hospedador o célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la realización 39.

5 Realización 41. Un método para producir un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 38, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a) expresar, en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, un ácido nucleico de acuerdo con la realización 39; opcionalmente seguido de:

10 b) aislar y/o purificar el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 38.

Realización 42. Una composición que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 38, o un ácido nucleico de acuerdo con la realización 39.

15 Realización 43. La composición de acuerdo con la realización 42, que es una composición farmacéutica que comprende además al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprende uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

20 Realización 44. Un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria, en el que dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 38 o una composición de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 42 a 43.

25 Realización 45. El método según la realización 44, en el que la enfermedad autoinmunitaria o la enfermedad inflamatoria se selecciona de enfermedad inflamatoria intestinal, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa.

Realización 46. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 38 o una composición de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 42 a 43, en la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria.

- 5 Realización 47. Uso del polipéptido o de la composición según la reivindicación 46, en el que la enfermedad autoinmunitaria o la enfermedad inflamatoria se selecciona de enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa.

#### 4 Breve descripción de los dibujos

- 10 **Figura 1:** Sensograma que muestra la unión simultánea de TNF $\alpha$  e IL-23 a F027500069 capturado mediante seroalbúmina humana (HSA).

**Figura 2:** Inhibición de TNF $\alpha$  soluble humano (A) y de macaco (B) en el ensayo indicador Glo response™ de HEK293\_NF $\kappa$ B-NLucP por F027500069 y mAb de referencia anti-hTNF $\alpha$ . IRR00096 es un V<sub>HH</sub> de control negativo. Los datos puntuales son valores medios globales  
15 (n = 2), las barras de erros representan +/- DT.

**Figura 3:** Inhibición de IL-23 humana (A) y de macaco (B) usando el ensayo indicador Glo response™ de HEK293\_humana IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P por F027500069, un mAb1 de referencia anti-hIL-23, un mAb2 de referencia anti-hIL-23. IRR00096 es un V<sub>HH</sub> de control negativo. Los datos puntuales son valores medios globales (n = 2), las barras de erros  
20 representan +/- DT.

**Figura 4:** Diagrama de cajas que muestra la unión de los anticuerpos preexistentes presentes en 96 muestras de suero humano a F027500069 en comparación con F027301099 de control.

**Figura 5:** Diagrama de cajas que muestra la unión de los anticuerpos preexistentes presentes en 96 muestras de suero humano a F027500069, F027500093, F027500095 y F027500096 en  
25 comparación con los polipéptidos de control F027301099 y F027301186.

**Figura 6:** Inhibición de la poliartritis en modelo Tg197 de ratón transgénico para TNF humano. Se representa gráficamente la 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 a la semana, empezando a las 6 semanas de edad. Se muestra la media de las puntuaciones de artritis semanales  $\pm$  ETM. Los datos estadísticos son ANOVA bilateral y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Figura 7:** Gráfico de barras del área bajo la curva para la puntuación de artritis en el modelo Tg197 de ratón a lo largo del tiempo. Se muestran valores individuales (símbolos) y las medias  $\pm$  ETM (barras). Los datos estadísticos son ANOVA unilateral y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Figura 8:** Gráfico de barras de la puntuación histológica de patas del modelo Tg197 de ratón. Se muestran valores individuales (símbolos) y las medias  $\pm$  ETM (barras). Los datos estadísticos son ANOVA unilateral y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Figura 9:** Inhibición de la inflamación cutánea en el modelo de IL-23 humana. El gráfico de barras ilustra la hinchazón de la piel de la oreja de diferentes grupos de tratamiento ( $n = 10$  ratones/grupo). Los animales recibieron diariamente inyecciones intradérmicas de IL-23 humana recombinante o PBS desde el día 1 hasta el 4. Los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de los compuestos indicados en el día 1 y 3. Se muestra el cambio medio en el grosor de la piel de la oreja desde la medida inicial en el día 5  $\pm$  ETM. Los datos estadísticos son ANOVA y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Figura 10:** Gráfico de barras de concentraciones de IL-22 en tejido de biopsias de piel en el día 5 del modelo de inflamación cutánea inducida por IL-23 humana. Se muestran valores individuales (símbolos) y las medias  $\pm$  ETM (barras). Los datos estadísticos son ANOVA y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Figura 11:** Inhibición de la inflamación cutánea por F027500069 administrando tanto por vía intraperitoneal, como también por vía subcutánea. El gráfico de barras ilustra la hinchazón de la piel de la oreja de diferentes grupos de tratamiento ( $n = 8$  ratones/grupo). Los animales recibieron diariamente inyecciones intradérmicas de IL-23 humana recombinante o PBS desde el día 1 hasta el 4. Las inyecciones intraperitoneales (IP) o subcutáneas (SC) de las dosis indicadas se administraron en el día 1 y 3. Se muestra el cambio medio en el grosor de la piel de la oreja desde la medida inicial en el día 5  $\pm$  ETM. Los datos estadísticos son ANOVA y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Figura 12:** Gráfico de barras de las concentraciones de IL-22 en tejido de biopsias de piel en el día 5 con F027500069 suministrado tanto por vía intraperitoneal, como también por vía subcutánea. Se muestran valores individuales (símbolos) y las medias  $\pm$  ETM (barras). Los datos estadísticos son ANOVA y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

5 **Figura 13:** Supresión de la puntuación de artritis en el modelo de artritis inducida por anticuerpos contra colágeno (CAIA) en ratones de inserción de TNF $\alpha$ /TNFR1 humano. Se muestra la puntuación de artritis a lo largo del tiempo en diferentes grupos de tratamiento (n = 8 ratones/grupo). Los animales recibieron una sola inyección intraperitoneal de los compuestos indicados en el día 1 6 horas después de la inyección de LPS. Se muestra la media  
10 de las puntuaciones de artritis diarias  $\pm$  ETM. Los datos estadísticos son ANOVA bilateral y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Figura 14:** Inhibición doble de inflamación inducida por IL-23 y TNF $\alpha$  en el modelo de inyección cutánea de IL-23 humana realizado en ratones de inserción de TNF $\alpha$  humano (n = 4-10 ratones/grupo). Los animales recibieron diariamente inyecciones intradérmicas de IL-23  
15 humana recombinante o PBS desde el día 1 hasta el 4. Inyecciones intraperitoneales de los compuestos indicados en el día 1 y 3. Se muestra el cambio medio en el grosor de la piel de la oreja desde la medida inicial en el día 5  $\pm$  ETM. Los datos estadísticos son ANOVA y ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni.

**Figura 15:** Expresión génica diferencial en tejido cutáneo en tejido cutáneo inflamado después  
20 de inhibición mono- o biespecífica de citocinas. Diagrama de Venn de genes expresados de forma diferencial (DEG, con factor de cambio  $>2$  en  $p < 0,001$ ). De un total de 769 DEG en el F027500069, 199 fueron específicos para este tratamiento.

**Figura 16:** Presentación esquemática de la construcción de ISVD F027500069 que muestra, desde el extremo N al extremo C, los componentes básicos monovalentes/ISVD 6C11,  
25 119A03/1, ALB23002 y 81A12 conectados mediante conectores 9GS.

## 5 Descripción detallada de la presente tecnología

La presente tecnología tiene como objetivo proporcionar un tipo novedoso de fármaco para tratar enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa.

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que un polipéptido que comprende al menos tres ISVD, en el que al menos un ISVD se une específicamente a TNF $\alpha$  y al menos dos ISVD se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23, puede usarse para un tratamiento más eficaz de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias en comparación con polipéptidos monoespecíficos anti-TNF $\alpha$  o anti-IL-23p19.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente tecnología muestran alta potencia sobre TNF $\alpha$  e IL-23 (por ejemplo, TNF $\alpha$  e IL-23 humanos o de macaco). En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente tecnología se producen de forma eficaz (por ejemplo, en hospedadores microbianos tales como *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*). En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente tecnología tienen baja viscosidad a altas concentraciones, lo que es ventajoso y conveniente para administración subcutánea. Además, en dichas realizaciones, los polipéptidos de la presente tecnología tienen reactividad limitada contra los anticuerpos preexistentes en el sujeto a tratar (es decir, los anticuerpos presentes en el sujeto antes del primer tratamiento con la construcción de anticuerpo). En otras realizaciones, dichos polipéptidos muestran una semivida en el sujeto a tratar que se suficientemente larga de modo que puedan espaciarse convenientemente los tratamientos consecutivos.

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

Los términos “*biespecífico*”, “*triespecífico*”, “*tetraespecífico*” o “*pentaespecífico*” están todos dentro del término “*multiespecífico*” y se refieren a la unión a dos, tres, cuatro o cinco diferentes moléculas diana, respectivamente. Los términos “*bivalente*”, “*trivalente*”, “*tetravalente*” o “*pentavalente*” están todos dentro del término “*multivalente*” e indican la presencia de dos, tres, cuatro o cinco unidades de unión (tales como ISVD), respectivamente. Por ejemplo, el polipéptido puede ser triespecífico-tetravalente, tal como un polipéptido que comprende o que consiste en cuatro ISVD, en el que un ISVD se une a TNF $\alpha$  humano, dos ISVD se unen a IL-23 humana y un ISVD se une a seroalbúmina humana. Dicho polipéptido puede ser, al mismo tiempo, biparatópico, por ejemplo, si dos ISVD se unen a dos epítomos diferentes

en la subunidad p19 de IL-23. El término “*biparatópico*” se refiere a la unión a dos partes diferentes (es decir, epítopos) de la misma molécula diana.

Las expresiones “primer ISVD”, “segundo ISVD”, “tercer ISVD”, etc., como se usan en la presente memoria, solamente indican la posición relativa de los ISVD entre sí, en los que la numeración se inicia desde el extremo N del polipéptido de la presente tecnología. El “primer ISVD”, por tanto, 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. Por consiguiente, la disposición de ISVD es inversa cuando se considera desde el extremo C. Como la numeración no es absoluta y solamente indica la posición relativa de los al menos tres ISVD, no se excluye que puedan estar presentes en el polipéptido otras unidades de unión/componentes básicos, tales como ISVD adicionales que se unen a TNF $\alpha$  o la subunidad p19 de IL-23, o ISVD que se unen a otra diana. Además, no se excluye la posibilidad de que se coloquen entremedias otras unidades de unión/componentes básicos tales como ISVD. Por ejemplo, como se describe adicionalmente a continuación (véase, en particular, la sección 5.3 “Prolongación de la semivida (*in vivo*)”), el polipéptido puede comprender además otro ISVD que se une a seroalbúmina humana, que puede incluso ubicarse entre, por ejemplo, el “segundo ISVD” y el “tercer ISVD”.

En vista de lo anterior, la presente tecnología proporciona un polipéptido que comprende o que consiste en al menos tres ISVD, en el que al menos un ISVD se une específicamente a TNF $\alpha$  y al menos dos ISVD se unen específicamente a la subunidad p19 de IL-23.

Los al menos dos ISVD que se unen específicamente a IL-23 se unen a la subunidad p19 de IL-23. Los al menos dos ISVD que se unen específicamente a IL-23 pueden unirse a diferentes epítopos en la subunidad p19 de IL-23. Al menos uno de los ISVD que se une específicamente a IL-23 puede bloquear una función de IL-23, tal como bloquear la interacción entre IL-23 e IL-23R y/o inhibir la liberación inducida por IL-23 de IL-22.

Los componentes, por ejemplo, los ISVD, del polipéptido pueden unirse entre sí mediante uno o más conectores adecuados, tales como conectores peptídicos.

El uso de conectores para conectar dos o más (poli)péptidos es bien conocido en la técnica. Se muestran conectores peptídicos ejemplares en la tabla A-5. Una clase usada a menudo de

conector peptídico se conoce como conectores “Gly-Ser” o “GS”. Estos son conectores que consisten esencialmente en residuos de glicina (G) y serina (S), y habitualmente comprenden una o más repeticiones de un motivo peptídico tal como el motivo GGGGS (SEQ ID NO: 47) (por ejemplo, tiene la fórmula (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> en que n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más). Algunos ejemplos usados a menudo de dichos conectores GS son conectores 9GS (GGGGSGGGGS, SEQ ID NO: 50), conectores 15GS (n = 3; SEQ ID NO: 52) y conectores 35GS (n = 7; SEQ ID NO: 57). Se hace referencia, por ejemplo, a Chen *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 2013 Oct 15; 65(10): 1357–1369; y Klein *et al.*, Protein Eng. Des. Sel. (2014) 27 (10): 325-330. En una realización del polipéptido de la presente tecnología, se usan conectores 9GS para unir los componentes del polipéptido entre sí.

En una realización, el ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  se coloca en el extremo N del polipéptido. Los autores de la invención descubrieron sorprendentemente que dicha configuración puede aumentar el rendimiento de producción del polipéptido.

Además, en una realización, uno de los ISVD que se unen específicamente a IL-23 se coloca en el extremo C del polipéptido.

Por consiguiente, el polipéptido comprende o consiste en lo siguiente, en orden empezando desde el extremo N del polipéptido: un ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$ , un primer ISVD que se une específicamente a IL-23 que puede bloquear una función de IL-23, una unidad de unión opcional que proporciona al polipéptido una semivida aumentada como se define en la presente memoria, y un segundo ISVD que se une específicamente a IL-23. En una realización, la unidad de unión que proporciona al polipéptido una semivida aumentada es un ISVD.

En una realización, el polipéptido comprende o consiste en lo siguiente, en orden empezando desde el extremo N del polipéptido: un ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$ , un conector, un primer ISVD que se une específicamente a IL-23 que puede bloquear una función de IL-23, un conector, un ISVD que se une a seroalbúmina humana, un conector, y un segundo ISVD que se une específicamente a IL-23. En un aspecto cada conector es un conector 9GS.

Dichas configuraciones del polipéptido pueden proporcionar un rendimiento de producción aumentado y buenas características de CMC, incluyendo rendimiento de expresión, viscosidad y otras propiedades biofísicas.

En una realización, el polipéptido de la presente tecnología muestra unión reducida por los anticuerpos preexistentes en el suero humano. Para este fin, en una realización, el polipéptido comprende una valina (V) en la posición del aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición del aminoácido 89 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un ISVD. En una realización, el polipéptido comprende una valina (V) en la posición del aminoácido 11 y una leucina (L) en la posición del aminoácido 89 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en cada ISVD. En otra realización, el polipéptido comprende una prolongación de 1 a 5 aminoácidos (de origen natural), tal como una prolongación de una sola alanina (A), en el extremo C del ISVD carboxiterminal. El extremo C de un ISVD normalmente es VTVSS (SEQ ID NO: 112). En otra realización, el polipéptido comprende una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 110 (de acuerdo con 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 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un ISVD. En estas realizaciones, el extremo C del ISVD es VKVSS (SEQ ID NO: 113), VQVSS (SEQ ID NO: 114), VTVKS (SEQ ID NO:146), VTVQS (SEQ ID NO:147), VKVKS (SEQ ID NO:148), VKVQS (SEQ ID NO:149), VQVKS (SEQ ID NO:150) o VQVQS (SEQ ID NO:151) de modo que, después de la adición de una sola alanina, el extremo C del polipéptido, por ejemplo, tiene la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 115), VKVSSA (SEQ ID NO: 116), VQVSSA (SEQ ID NO: 117), VTVKSA (SEQ ID NO:152), VTVQSA (SEQ ID NO:153), VKVKSA (SEQ ID NO:154), VKVQSA (SEQ ID NO:155), VQVKSA (SEQ ID NO:156) o VQVQSA (SEQ ID NO:157). En una realización, el extremo C comprende VKVSSA (SEQ ID NO: 116). 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 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en cada ISVD, opcionalmente una lisina (K) o glutamina (Q) en la posición 110 (de acuerdo con la numeración de Kabat) en al menos un ISVD, y comprende una prolongación de 1 a 5 aminoácidos (de origen natural), tal como una prolongación de una sola alanina (A), en el extremo C del ISVD carboxiterminal, de modo que el extremo C del polipéptido, por ejemplo, comprende la secuencia VTVSSA (SEQ ID NO: 115), VKVSSA (SEQ ID NO: 116) o VQVSSA (SEQ ID NO: 117), tal

como VKVSSA (SEQ ID NO: 116). Véanse, por ejemplo, los documentos WO2012/175741 y WO2015/173325 para información adicional a este respecto.

En otra realización, el polipéptido de la presente tecnología comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con SEQ ID NO: 1, en el que las CDR de los cuatro ISVD son como se definen en los puntos A a D (o A' a D' si se usa la definición de Kabat) expuestos en las secciones “5.1 Dominios variables únicos de inmunoglobulina” y “5.3 Prolongación de la semivida (*in vivo*)” a continuación, respectivamente, en el que, en particular:

- el ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- el primer ISVD que se une específicamente a la subunidad p19 de IL-23 comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- el segundo ISVD que se une específicamente a la subunidad p19 de IL-23 comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y
- el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16,

o, como alternativa, si se usa la definición de Kabat:

- el ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138;
- el primer ISVD que se une específicamente a la subunidad p19 de IL-23 comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123, una CDR2 que es la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139;

- el segundo ISVD que se une específicamente a la subunidad p19 de IL-23 comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141; y
- el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140.

En otra realización, el polipéptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el polipéptido de la presente tecnología tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a TNF $\alpha$  humano y a IL-23 humana en comparación con un polipéptido que consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como resonancia de plasmón superficial (SPR).

## 5.1 Dominios variables únicos de inmunoglobulina

La expresión “dominio variable único de inmunoglobulina” (ISVD), usado indistintamente con “dominio variable único”, define moléculas de inmunoglobulina en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un solo dominio de inmunoglobulina. Esto establece ISVD separados de las inmunoglobulinas “convencionales” (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o sus fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, discFv), en los que dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. Típicamente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) y un dominio variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tanto de V<sub>H</sub> como de V<sub>L</sub> contribuirán en el sitio de unión a antígeno, es decir, un total de 6 CDR estarán implicadas en la formación del sitio de unión a antígeno.

En vista de la definición anterior, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo convencional de 4 cadenas (tal 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 fragmento Fv o scFv unido por disulfuro, o un diacuerpo (todos conocidos en la técnica) derivados de dicho anticuerpos convencional de 4 cadenas, normalmente no se consideraría un ISVD, ya que, en estos casos, la unión al epítipo respectivo de un antígeno normalmente no se produciría por un solo dominio de inmunoglobulina, sino por un par de dominios de inmunoglobulina en asociación tales como los dominios variables de la cadena pesada y ligera, es decir, por un par  $V_H$ - $V_L$  de dominios de inmunoglobulina, que se unen conjuntamente a un epítipo del antígeno respectivo.

En contraste, los ISVD pueden unirse específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un ISVD se forma por un solo dominio  $V_H$ , un solo dominio  $V_{HH}$  o un solo dominio  $V_L$ .

Por tanto, el ISVD puede ser una secuencia del dominio variable de la cadena ligera (por ejemplo, un secuencia de  $V_L$ ) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia del dominio variable de la cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de  $V_H$  o secuencia de  $V_{HH}$ ) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que pueda formar una sola unidad de unión a antígeno; es decir, una unidad de unión a antígeno funcional que consista esencialmente en el ISVD, de modo que el dominio de unión a antígeno individual no tiene que interactuar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional.

Un ISVD puede ser, por ejemplo, un ISVD de cadena pesada, tal como un  $V_H$ ,  $V_{HH}$ , incluyendo un  $V_H$  camelizado o  $V_{HH}$  humanizado. En una realización, es un  $V_{HH}$ , incluyendo un  $V_H$  camelizado o  $V_{HH}$  humanizado. Los ISVD de cadena pesada pueden derivar de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas o de un anticuerpo de cadena pesada.

Por ejemplo, el ISVD puede ser un anticuerpo de un solo dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como un anticuerpo de un solo dominio), un "dAb" o dAb (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb) o un Nanobody® (como se define en la presente memoria, e incluyendo, aunque sin limitación, un  $V_{HH}$ ); otros dominios variables únicos o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos.

En particular, el ISVD puede ser un Nanobody® (tal como un V<sub>HH</sub>, incluyendo un V<sub>HH</sub> humanizado o V<sub>H</sub> camelizado) o un fragmento adecuado del mismo. *Nanobody®*, *Nanobodies®* y *Nanoclone®* son marcas registradas.

Los “dominios V<sub>HH</sub>”, también conocidos como V<sub>HH</sub>, fragmentos de anticuerpo V<sub>HH</sub> y anticuerpos V<sub>HH</sub>, 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”, véase Hamers-Casterman *et al.* Nature 363: 446-448, 1993. La expresión “dominio V<sub>HH</sub>” se ha elegido para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de la cadena pesada que están presentes en anticuerpos convencionales de 4 cadenas, que se denominan en la presente memoria “dominios V<sub>H</sub>”, y de los dominios variables de la cadena ligera que están presentes en anticuerpos convencionales de 4 cadenas, que se denominan en la presente memoria “dominios V<sub>L</sub>”. Para una descripción adicional de los V<sub>HH</sub>, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001).

Típicamente, la generación de inmunoglobulinas implica la inmunización de animales experimentales, la fusión de células productoras de inmunoglobulina para crear hibridomas y cribar especificidades deseadas. Como alternativa, las inmunoglobulinas pueden generarse cribando colecciones vírgenes, inmunológicas o sintéticas, por ejemplo, por presentación en fagos.

La generación de secuencias de inmunoglobulina, tales como Nanobodies®, se ha descrito ampliamente en diversas publicaciones, entre las que pueden ejemplificarse el documento WO 94/04678, Hamers-Casterman *et al.* 1993 (Nature 363: 446-448, 1993) y Muyldermans *et al.* 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001). En estos métodos, se inmunizan camélidos con el antígeno diana para inducir una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno diana. El repertorio de Nanobodies® obtenido a partir de dicha inmunización se criba adicionalmente para los Nanobodies® que se unen al antígeno diana.

En estos casos, la generación de anticuerpos requiere antígenos purificados para inmunización y/o cribado. Los antígenos pueden purificarse de fuentes naturales, o en el transcurso de producción recombinante.

Puede realizarse inmunización y/o cribado de secuencias de inmunoglobulina usando fragmentos peptídicos de dichos antígenos.

La presente tecnología puede usarse secuencias de inmunoglobulina de diferente origen, que comprenden secuencias inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, humana y de 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 camelizados, por ejemplo, dAb camelizado como se describe por Ward *et al.* (Nature 341: 544, 1989) (véase, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies 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, por ejemplo, que 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 a, por ejemplo, los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221), y secuencias de inmunoglobulina que comprenden marcas u otros restos funcionales, por ejemplo, toxinas, marcadores, productos radioquímicos, etc., que 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  $V_{HH}$  de origen natural, pero que se ha “humanizado”, es decir, remplazando uno o más residuos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia  $V_{HH}$  de origen natural (y, en particular, en las secuencias flanqueantes) por uno o más de los residuos aminoacídicos que existen en la una o más posiciones correspondientes en un dominio  $V_H$  de un anticuerpo convencional de 4 cadenas de un ser humano (por ejemplo, indicado anteriormente). Esto puede realizarse de una manera conocida *per se*, que estará clara para los expertos en la materia, por ejemplo, basándose en la descripción adicional de la presente memoria y la técnica anterior (por ejemplo, documento WO 2008/020079). De nuevo, debe apreciarse que dichos  $V_{HH}$  humanizados pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida *per se* y, por tanto, no están estrictamente

limitados 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 se ha “camelizado”,

es decir, remplazando uno o más residuos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos de un dominio  $V_H$  de origen natural de un anticuerpo convencional de 4 cadenas por uno o más de los residuos aminoacídicos que existen en la una o más posiciones correspondientes en un dominio  $V_{HH}$  de un anticuerpo de cadena pesada. Esto puede realizarse de una manera conocida *per se*, que estará clara para los expertos en la materia, por ejemplo, basándose en

la descripción adicional de la presente memoria y la técnica anterior (por ejemplo, documento WO 2008/020079). Dichas sustituciones “camelizantes” se insertan habitualmente en las posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfase  $V_H$ - $V_L$ , y/o en los llamados residuos distintivos de *Camelidae*, como se definen en la presente memoria (véase, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann, 1994 y 1996, *supra*). En una

realización, la secuencia  $V_H$  que se usa como material de partida o punto de inicio para generar o diseñar el  $V_H$  camelizado es una secuencia  $V_H$  de un mamífero, o la secuencia  $V_H$  de un ser humano, tal como una secuencia  $V_H3$ . Sin embargo, debe apreciarse que dicho  $V_H$  camelizado puede obtenerse de cualquier manera adecuada conocida *per se* y, por tanto, no está estrictamente limitado a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio  $V_H$  de origen natural como material de partida.

La estructura de una secuencia de ISVD puede considerarse compuesto de cuatro regiones flanqueantes (“FR”), que se denominan en la técnica y en la presente memoria “región flanqueante 1” (“FR1”); “región flanqueante 2” (“FR2”); “región flanqueante 3” (“FR3”); y “región flanqueante 4” (“FR4”), respectivamente; que son regiones flanqueantes interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad (“CDR”), que se denominan en la técnica y la presente memoria “región determinante de la complementariedad 1” (“CDR1”); “región determinante de la complementariedad 2” (“CDR2”); y “región determinante de la complementariedad 3” (“CDR3”), respectivamente.

Como se describe adicionalmente en el párrafo q) en las páginas 58 y 59 del documento WO 08/020079, los residuos aminoacídicos de un ISVD pueden numerarse de acuerdo con la

numeración general para dominios  $V_H$  dada por Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, publicación n.º 91), que se aplica a dominios  $V_{HH}$  de 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).

5 Debe apreciarse que, como se conoce bien en la técnica para dominios  $V_H$  y para dominios  $V_{HH}$ , el número total de residuos aminoacídicos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de residuos aminoacídicos indicado por la numeración de Kabat. Es decir, una o más posiciones de acuerdo con la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más residuos aminoacídicos  
10 que el número permitido por la numeración de Kabat. Esto significa que, en general, la numeración de acuerdo con Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los residuos aminoacídicos en la secuencia real. El número total de residuos aminoacídicos en un dominio  $V_H$  y un dominio  $V_{HH}$  habitualmente estará en el intervalo de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. Debe apreciarse, sin embargo, que secuencias más pequeñas y más grandes  
15 también pueden ser adecuadas para los propósitos descritos en la presente memoria.

En la presente solicitud, salvo que se indique de otro modo, las secuencias 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 Berlín, Martin, capítulo 3, pág. 33-51). De acuerdo con este método, la FR1 comprende los residuos aminoacídicos en  
20 las posiciones 1-25, la CDR1 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 26-35, la FR2 comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 50-58, la FR3 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 59-94, la CDR3 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 95-102 y la FR4 comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 103-113.

25 La determinación de las regiones CDR también puede hacerse de acuerdo con diferentes métodos. En la determinación de las CDR de acuerdo con Kabat, la FR1 de un ISVD comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 1-30, la CDR1 de un ISVD comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 31-35, la FR2 de un ISVD comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 de un ISVD comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones  
30 50-65, la FR3 de un ISVD comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 66-94, la

CDR3 de un ISVD comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 95-102 y la FR4 de un ISVD comprende los residuos aminoacídicos en las posiciones 103-113.

En dicha secuencia de inmunoglobulina, las secuencias flanqueantes pueden ser cualquier secuencia flanqueante adecuada, y los ejemplos de secuencias flanqueantes adecuadas  
5 estarán claros para los expertos en la materia, por ejemplo, basándose en libros de texto convencionales y la divulgación adicional y técnica anterior mencionada en la presente memoria.

Las secuencias flanqueantes son una combinación adecuada de secuencias flanqueantes de inmunoglobulina o secuencias flanqueantes que se han derivado de secuencias flanqueantes  
10 de inmunoglobulina, por ejemplo, por humanización o camelización. Por ejemplo, las secuencias flanqueantes pueden ser secuencias flanqueantes derivadas de un dominio variable de la cadena ligera (por ejemplo, una secuencia  $V_L$ ) y/o de un dominio variable de la cadena pesada (por ejemplo, una secuencia  $V_H$  o secuencia  $V_{HH}$ ). En un aspecto, las secuencias flanqueantes son secuencias flanqueantes que se han derivado de una secuencia  $V_{HH}$  en que  
15 dichas secuencias flanqueantes opcionalmente pueden haberse humanizado parcial o completamente o son secuencias  $V_H$  convencionales que se han camelizado (como se define en la presente memoria).

En particular, las secuencias flanqueantes presentes en la secuencia de ISVD usadas en la presente tecnología pueden contener uno o más residuos distintivos (como se definen en la  
20 presente memoria), de modo que la secuencia de ISVD es un Nanobody®, tal como un  $V_{HH}$ , incluyendo un  $V_{HH}$  humanizado o  $V_H$  camelizado. Algunos ejemplos no limitantes de combinaciones adecuadas de dichas secuencias flanqueantes quedarán claras a partir de la divulgación adicional de la presente memoria.

De nuevo, como se describe en general en la presente memoria para las secuencias de  
25 inmunoglobulina, también es posible usar fragmentos adecuados o combinaciones de fragmentos de cualquiera de los anteriores, tales como fragmentos que contienen una o más secuencias CDR, flanqueadas adecuadamente por y/o unidas mediante una o más secuencias flanqueantes; por ejemplo, en el mismo orden que estas CDR y secuencias flanqueantes pueden aparecer en la secuencia de inmunoglobulina de tamaño completo de la que se ha  
30 derivado el fragmento.

Sin embargo, debe apreciarse que la presente tecnología no está limitada en cuanto al origen de la secuencia de ISVD o el origen de la secuencia de nucleótidos usada para expresarla, ni en cuanto a la manera en que se genera u obtiene o se ha generado u obtenido la secuencia de ISVD o secuencia de nucleótidos. 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, aunque no limitante, la secuencia de ISVD es una secuencia de origen natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia sintética o semisintética incluyendo, aunque sin limitación, secuencias de inmunoglobulina “humanizadas” (como se definen en la presente memoria) (tales como secuencias de inmunoglobulina de ratón o conejo parcial o completamente humanizadas y, en particular, secuencias V<sub>HH</sub> parcial o completamente humanizadas), secuencias de inmunoglobulina “camelizadas” (como se definen en la presente memoria), así como secuencias de inmunoglobulina que se han obtenido por técnicas tales como maduración de la afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o de origen natural), injerto de CDR, rebarnizado, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR usando cebadores solapantes y técnicas similares para genomanipular secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por los expertos en la materia; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las anteriores.

Asimismo, 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 por 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 colección (y, en particular, una colección de expresión), secuencias de nucleótidos que se han preparado introduciendo mutaciones en una secuencia de nucleótidos de origen natural (usando cualquier técnica adecuada conocida *per se*, tal como PCR con emparejamientos incorrectos), secuencia de nucleótidos que se ha preparado por PCR usando cebadores solapantes, o secuencias de nucleótidos que se han preparado usando técnicas para la síntesis de ADN conocidas *per se*.

Como se describe anteriormente, un ISVD puede ser un Nanobody® o un fragmento adecuado del mismo. Para una descripción general de Nanobodies®, se hace referencia a la descripción adicional a continuación, así como a la técnica anterior citada en la presente memoria. A este

respecto, sin embargo, debe apreciarse que esta descripción y la técnica anterior describían principalmente Nanobodies de la llamada “clase V<sub>H3</sub>”, es decir Nanobodies con un alto grado de homología de secuencia con secuencias de la línea germinal humana de la clase V<sub>H3</sub> tales como DP-47, DP-51 o DP-29. Sin embargo, debe apreciarse que la presente tecnología en su

5 sentido más amplio en general puede usar cualquier tipo de Nanobody<sup>®</sup> y, por ejemplo, también usa los Nanobodies<sup>®</sup> que pertenecen a la llamada “clase V<sub>H4</sub>”, es decir, Nanobodies<sup>®</sup> con un alto grado de homología de secuencia con secuencias de la línea germinal humana de la clase V<sub>H4</sub> tales como DP-78, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/118670.

10 En general, los Nanobodies<sup>®</sup> (en particular, secuencias V<sub>HH</sub> incluyendo secuencias V<sub>HH</sub> (parcialmente) humanizadas y secuencias V<sub>H</sub> camelizadas) pueden caracterizarse por la presencia de uno o más “*residuos distintivos*” (como se describe en la presente memoria) en una o más de las secuencias flanqueantes (de nuevo como se describe adicionalmente en la presente memoria). Por tanto, en general, un Nanobody<sup>®</sup> puede definirse como una secuencia

15 de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones flanqueantes 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que uno o más de los residuos distintivos son como se describen

20 adicionalmente en la presente memoria.

En particular, un Nanobody<sup>®</sup> puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

en que FR1 a FR4 se refieren a las regiones flanqueantes 1 a 4, respectivamente, y en que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en que las secuencias flanqueantes son como se describen adicionalmente

25 en la presente memoria.

Más en particular, un Nanobody<sup>®</sup> puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

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

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

- 5 uno o más de los residuos aminoacídicos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 de acuerdo con la numeración de Kabat se eligen de los residuos distintivos mencionados en la tabla A-6 a continuación.

**Tabla A-6: Residuos distintivos en Nanobodies**

| Posición          | V <sub>H</sub> 3 humano         | Residuos distintivos                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11                | L, V;<br>predominantemente L    | L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I;<br>preferiblemente L                                                                                                                                                                           |
| 37                | V, I, F; habitualmente V        | F <sup>(1)</sup> , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P,<br>preferiblemente F <sup>(1)</sup> o Y                                                                                                                                              |
| 44 <sup>(8)</sup> | G                               | E <sup>(3)</sup> , Q <sup>(3)</sup> , G <sup>(2)</sup> , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I;<br>preferiblemente G <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> o Q <sup>(3)</sup> ; mucho más<br>preferiblemente G <sup>(2)</sup> o Q <sup>(3)</sup> . |
| 45 <sup>(8)</sup> | L                               | L <sup>(2)</sup> , R <sup>(3)</sup> , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V;<br>preferiblemente L <sup>(2)</sup> o R <sup>(3)</sup>                                                                                                               |
| 47 <sup>(8)</sup> | W, Y                            | F <sup>(1)</sup> , L <sup>(1)</sup> o W <sup>(2)</sup> G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q,<br>N, D; preferiblemente W <sup>(2)</sup> , L <sup>(1)</sup> o F <sup>(1)</sup>                                                               |
| 83                | R o K; habitualmente R          | R, K <sup>(5)</sup> , T, E <sup>(5)</sup> , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H;<br>preferiblemente K o R; mucho más preferiblemente<br>K                                                                                                          |
| 84                | A, T, D;<br>predominantemente A | P <sup>(5)</sup> , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E;<br>preferiblemente P                                                                                                                                                              |

|     |                                  |                                                                                                                         |
|-----|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 103 | W                                | W <sup>(4)</sup> , R <sup>(6)</sup> , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P <sup>(6)</sup> , E, C;<br>preferiblemente W |
| 104 | G                                | G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferiblemente G                                                                         |
| 108 | L, M o T;<br>predominantemente L | Q, L <sup>(7)</sup> , R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L <sup>(7)</sup>                                   |

**Notas:**

- (1) En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE o KQRE en las posiciones 43-46.
- (2) Habitualmente como GLEW en las posiciones 44-47.
- (3) Habitualmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, por ejemplo, como KEREL, KEREF, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW o KQREG en las posiciones 43-47. Como alternativa, también son posibles secuencias tales como TERE (por ejemplo, TEREL), TQRE (por ejemplo, TQREL), KECE (por ejemplo, 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) Con tanto GLEW en las posiciones 44-47 como KERE o KQRE en las posiciones 43-46.
- (5) A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de dominios V<sub>HH</sub> 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 es siempre Q en secuencias V<sub>HH</sub> (no humanizadas) que también contienen una 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 usa, *inter alia*, ISVD que pueden unirse a TNF $\alpha$  o la subunidad p19 de IL-23. En el contexto de la presente tecnología, “unión a” una determinada molécula diana tiene el significado habitual en la técnica comprendido en el contexto de anticuerpos y sus antígenos respectivos.

- 5 El polipéptido de la presente tecnología puede comprender uno o más ISVD que se unen a TNF $\alpha$  y dos o más ISVD que se unen a IL-23. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender un ISVD que se une a TNF $\alpha$  y dos ISVD que se unen a la subunidad p19 de IL-23.

En algunas realizaciones, al menos un ISVD puede bloquear funcionalmente su molécula diana. Por ejemplo, el ISVD pueden bloquear la interacción entre TNF $\alpha$  y TNFR (receptor de  
 10 TNF) o pueden bloquear la interacción entre IL-23 e IL-23R (receptor de IL-23). En el polipéptido de la presente tecnología, al menos un ISVD puede bloquear funcionalmente IL-23, por ejemplo, bloqueando la interacción entre IL-23 e IL-23R y/o inhibiendo la liberación inducida por IL-23 de IL-22. Por consiguiente, en una realización, el polipéptido de la presente tecnología comprende un ISVD que se une a TNF $\alpha$  y bloquea funcionalmente TNF $\alpha$  y dos ISVD  
 15 que se unen a IL-23, de los que uno de ellos puede bloquear funcionalmente IL-23.

Los ISVD usados en la presente tecnología forman parte de un polipéptido de la presente tecnología, que comprende o consiste en al menos tres ISVD, de modo que el polipéptido puede unirse específicamente a TNF $\alpha$  e IL-23.

Por consiguiente, las moléculas diana para los al menos tres ISVD, como se usan en el  
 20 polipéptido de la presente tecnología, son TNF $\alpha$  e IL-23. Ejemplos son TNF $\alpha$  e IL-23 de mamífero. Además de TNF $\alpha$  humano (acceso Uniprot P01375) e IL-23 humana (acceso Uniprot para la subunidad p19, IL-23A: Q9NPF7), las versiones de otras especies también son susceptibles a la presente tecnología, por ejemplo, TNF $\alpha$  e IL-23 de ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, caballos, cerdos, primates no humanos, tales como macacos  
 25 (también denominados en la presente memoria “*cyno*”) o camélidos, tales como llamas o alpacas.

Ejemplos específicos de ISVD que se unen específicamente a TNF $\alpha$  o la subunidad p19 de IL-23 que pueden usarse en la presente tecnología son como se describen en los siguientes puntos A a C:

A. Un ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  humano y comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 6;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 10; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 14.

En una realización, el ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

Ejemplos de dicho ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  humano tienen una o más, o todas, las regiones flanqueantes indicadas para la construcción 6C11 de la tabla A-2 (además de las CDR definidas en el punto precedente A). En una realización, es un ISVD que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 6C11 (SEQ ID NO: 2, véase la tabla A-1 y A-2).

En otra realización, la secuencia de aminoácidos del ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  humano puede tener una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con SEQ ID NO: 2, en la que las CDR son como se definen en el punto precedente A. En una realización, el ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Cuando dicho ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia CDR de referencia correspondiente (punto A anterior), el ISVD tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a TNF $\alpha$  humano en comparación con la construcción 6C11 (SEQ ID NO: 2), en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

B. Un ISVD que se une específicamente a la subunidad p19 de IL-23 humana y comprende

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

- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 15.

5 En una realización, el ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

Ejemplos de dicho ISVD que se une específicamente a IL-23 humana tienen una o más, o todas, las regiones flanqueantes indicadas para la construcción 119A03/1 de la tabla A-2 (además de  
10 las CDR definidas en el punto precedente B). En una rea, es un ISVD que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 119A03/1 (SEQ ID NO: 3, véase la tabla A-1 y A-2).

Además, en otra realización, la secuencia de aminoácidos de un ISVD que se une específicamente a IL-23 humana puede tener una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con SEQ ID NO: 3, en la que las CDR son como se  
15 definen en el punto precedente B. En una realización, el ISVD que se une a IL-23 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Cuando dicho ISVD que se une a IL-23 tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia CDR de referencia correspondiente (punto B anterior), el  
20 ISVD tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a IL-23 humana en comparación con la construcción 119A03/1 (SEQ ID NO: 3), en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

En una realización, un ISVD que comprende una CDR2, que tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11 (TIESGSRTN), no tiene una sustitución de E a N en la posición  
25 del aminoácido 3 de la secuencia CDR2 y/o no tiene una sustitución de N a Y en la posición del aminoácido 9 de la secuencia CDR2. En otra realización, dicho ISVD no tiene una sustitución de E a N en la posición del aminoácido 3 de la secuencia CDR2 y no tiene una sustitución de N a Y en la posición del aminoácido 9 de la secuencia CDR2. En dichas realizaciones de un ISVD que comprende una CDR2, que tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 11

(TIESGSRTN), E se mantiene como aminoácido en la posición 3 y/o N se mantiene como aminoácido en la posición 9 de dicha secuencia CDR2. En otra realización, tanto E en la posición del aminoácido 3 y N en la posición del aminoácido 9 de dicha secuencia CDR2 se mantienen. Usar un ISVD que comprenda N en la posición del aminoácido 3 de dicha secuencia CDR2 puede provocar una estabilidad reducida de la secuencia de aminoácidos durante la producción del polipéptido, por ejemplo, debido a desaminación, en comparación con el mismo polipéptido que no comprende N en dicha posición de aminoácido y, especialmente, en comparación con el mismo polipéptido que comprende E en dicha posición de aminoácido. Usar un ISVD que comprenda Y en la posición del aminoácido 9 de dicha secuencia CDR2 puede provocar una agregación proteínica aumentada del polipéptido en comparación con el mismo polipéptido que no comprende Y en dicha posición de aminoácido y, especialmente, en comparación con el mismo polipéptido que comprende N en dicha posición de aminoácido.

C. Un ISVD que se une específicamente a la subunidad p19 de IL-23 humana y comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 9;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 13; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 17.

En una realización, el ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

Ejemplos de dicho ISVD que se une específicamente a IL-23 humana tienen una o más, p todas, las regiones flanqueantes indicadas para la construcción 81A12 de la tabla A-2 (además de las CDR definidas en el punto precedente C). En una realización, es un ISVD que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 81A12 (SEQ ID NO: 5, véase la tabla A-1 y A-2).

Además, en otra realización, la secuencia de aminoácidos de un ISVD que se une específicamente a IL-23 humana puede tener una identidad de secuencia de más de un 90 %,

tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con SEQ ID NO: 5, en la que las CDR son como se definen en el punto precedente C. En una realización, el ISVD que se une a IL-23 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Cuando dicho ISVD que se une específicamente a IL-23 tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia CDR de referencia correspondiente (punto C anterior), el ISVD tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a IL-23 humana en comparación con la construcción 81A12 (SEQ ID NO: 5), en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

En una realización, cada uno de los ISVD como se definen en los puntos A a C anteriores está comprendido en el polipéptido de la presente tecnología. Dicho polipéptido de la presente tecnología que comprende cada uno de los ISVD como se definen en los puntos A a C anteriores tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a TNF $\alpha$  humano y a IL-23 humana en comparación con un polipéptido que consiste en los aminoácidos 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 mencionadas en los puntos A a C anteriores se basan en la definición de CDR de acuerdo con la definición AbM (véase la tabla A-2). Se aprecia que las SEQ ID NO que definen las mismas CDR de acuerdo con la definición de Kabat (véase la tabla A-2.1) pueden usarse asimismo en los puntos A a C anteriores.

Por consiguiente, los ISVD específicos que se unen específicamente a TNF $\alpha$  o la subunidad p19 de IL-23 que pueden usarse en la presente tecnología como se describe anteriormente usando la definición AbM también pueden describirse usando la definición de Kabat como se expone en los puntos A' a C' a continuación:

A'. Un ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  humano y comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 122;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 130 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 130; y

- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 138.

En una realización, el ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138.

Ejemplos de dicho ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  humano tienen una o más, o todas, las regiones flanqueantes indicadas para la construcción 6C11 de la tabla A-2.1 (además de las CDR definidas en el punto precedente A'). En una realización es un ISVD que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 6C11 (SEQ ID NO: 2, véase la tabla A-1 y A-2.1).

Además, en otra realización, la secuencia de aminoácidos del ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  humano puede tener una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con SEQ ID NO: 2, en la que las CDR son como se definen en el punto precedente A'. En una realización, el ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Cuando dicho ISVD que se une específicamente a TNF $\alpha$  tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia CDR de referencia correspondiente (punto A' anterior), el ISVD tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a TNF $\alpha$  humano en comparación con la construcción 6C11 (SEQ ID NO: 2), en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

B'. Un ISVD que se une específicamente a la subunidad p19 de IL-23 humana y comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 123 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 123;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 131 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 131; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 139 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 139.

En una realización, el ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

Ejemplos de dicho ISVD que se une específicamente a IL-23 humana tienen una o más, o todas, las regiones flanqueantes indicadas para la construcción 119A03/1 de la tabla A-2.1 (además de las CDR definidas en el punto precedente B'). En una realización, es un ISVD que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 119A03/1 (SEQ ID NO: 3, véase la tabla A-1 y A-2.1).

Además, en otra realización, la secuencia de aminoácidos de un ISVD que se une específicamente a IL-23 humana puede tener una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con SEQ ID NO: 3, en la que las CDR son como se definen en el punto B' precedente. En una realización, el ISVD que se une a IL-23 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Cuando dicho ISVD que se une a IL-23 tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia CDR de referencia correspondiente (punto B' anterior), el ISVD tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a IL-23 humana en comparación con la construcción 119A03/1 (SEQ ID NO: 3), en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

En una realización, un ISVD que comprende una CDR2, que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 131 (TIESGSRTNYADSVKG), no tiene una sustitución de E a N en la posición del aminoácido 3 y/o no tiene una sustitución de N a Y en la posición del aminoácido 9 de dicha secuencia CDR2. En otra realización, dicho ISVD no tiene una sustitución de E a N en la posición del aminoácido 3 de la secuencia CDR2 y no tiene una sustitución de N a Y en la secuencia del aminoácido 9 de la secuencia CDR2. En dichas realizaciones de un ISVD que comprende una CDR2, que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 131 (TIESGSRTNYADSVKG), E se mantiene como aminoácido en la posición 3 y/o N se mantiene como aminoácido en la posición 9 de dicha secuencia CDR2. En otra realización, tanto E en la posición del aminoácido 3 como N en la posición del aminoácido 9 de dicha secuencia CDR2 se mantienen. Usar un ISVD que comprenda N en la

posición del aminoácido 3 de dicha secuencia CDR2 puede provocar una estabilidad reducida de la secuencia de aminoácidos durante la producción del polipéptido, por ejemplo, debido a desaminación, en comparación con el mismo polipéptido que no comprende N en dicha posición de aminoácido y, especialmente, en comparación con el mismo polipéptido que comprende E en dicha posición de aminoácido. Usar un ISVD que comprenda Y en la posición del aminoácido 9 de dicha secuencia CDR2 puede provocar una agregación proteínica aumentada del polipéptido en comparación con el mismo polipéptido que no comprende Y en dicha posición de aminoácido y, especialmente, en comparación con el mismo polipéptido que comprende N en dicha posición de aminoácido.

C'. Un ISVD que se une específicamente a la subunidad p19 de IL-23 humana y comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 125;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 133; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 141.

En una realización, el ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141.

Ejemplos de dicho ISVD que se une específicamente a IL-23 humana tienen una o más, o todas, las regiones flanqueantes indicadas para la construcción 81A12 de la tabla A-2.1 (además de las CDR definidas en el punto precedente C'). En una realización, es un ISVD que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos completa de la construcción 81A12 (SEQ ID NO: 5, véase la tabla A-1 y A-2.1).

Además, en otra realización, la secuencia de aminoácidos de un ISVD que se une específicamente a IL-23 humana puede tener una identidad de secuencia de más de un 90 %,

tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con SEQ ID NO: 5, en la que las CDR son como se definen en el punto C' precedente. En una realización, el ISVD que se une a IL-23 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Cuando dicho ISVD que se une específicamente a IL-23 tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia CDR de referencia correspondiente (punto C' anterior), el ISVD tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a IL-23 humana en comparación con la construcción 81A12 (SEQ ID NO: 5), en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

En una realización, cada uno de los ISVD como se definen en los puntos A' a C' anteriores está comprendido en el polipéptido de la presente tecnología. Dicho polipéptido de la presente tecnología que comprende cada uno de los ISVD como se definen en los puntos A' a C' anteriores tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a TNF $\alpha$  humano y a IL-23 humana en comparación con un polipéptido que consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

El porcentaje de “*identidad de secuencia*” entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos puede calcularse dividiendo [*el número de residuos aminoacídicos en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos aminoacídicos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos*] por [*el número total de residuos aminoacídicos en la primera secuencia de aminoácidos*] y multiplicando por [100%], en que cada eliminación, inserción, sustitución o adición de un residuo aminoacídico en la segunda secuencia de aminoácidos, en comparación con la primera secuencia de aminoácidos, se considera como una diferencia en un solo residuo aminoacídico (es decir, en una sola posición).

Habitualmente, con el propósito de determinar el porcentaje de “*identidad de secuencia*” entre dos secuencias de aminoácidos de acuerdo con el método de cálculo resumido anteriormente en la presente memoria, la secuencia de aminoácidos con el número mayor de residuos aminoacídicos se tomará como la “*primera*” secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la “*segunda*” secuencia de aminoácidos.

Una “diferencia de aminoácido”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una eliminación, inserción o sustitución de un solo residuo aminoacídico frente a una secuencia de referencia. En una realización, una “diferencia de aminoácido” es una sustitución.

En una realización, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservativas. Dichas

5 sustituciones conservativas son sustituciones en que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) – (e) se sustituye con otro residuo aminoacídico dentro del mismo grupo: (a) residuos pequeños alifáticos, apolar 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 grandes alifáticos, apolares: Met,  
10 Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

En una realización, las sustituciones conservativas 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; His en Asn o en Gln; 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;  
15 Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en Ile o en Leu.

## 5.2 Especificidad

Las expresiones “*especificidad*”, “*especificidad de unión*” 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 afinidad suficientemente  
20 alta (véase a continuación). “*Especificidad*”, “*especificidad de unión*” o “*unión específica*” se usan indistintamente con “*selectividad*”, “*selectividad de unión*” o “*unión selectiva*”. Las unidades de unión, tales como ISVD, se unen específicamente a sus dianas señaladas.

La especificidad/selectividad de una unidad de unión puede determinarse basándose en la afinidad. La afinidad indica la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se  
25 da comúnmente mediante la KD, o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también puede expresarse como una constante de asociación, KA, que es igual a  $1/KD$  y tiene unidades de  $(\text{mol/litro})^{-1}$  (o  $M^{-1}$ ).

La afinidad es una medida de la fuerza de unión entre un resto y un sitio de unión en la molécula diana: cuanto menor sea el valor de la KD, más fuerte será la fuerza de unión entre una molécula diana y un resto de dirección.

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

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

La KD para las interacciones biológicas, tales como la unión de secuencias de inmunoglobulina a un antígeno, que se consideran específicas típicamente está en el intervalo de  $10^{-5}$  moles/litro (10 000 nM o 10  $\mu$ M) a  $10^{-12}$  moles/litro (0,001 nM o 1 pM) o menos.

Por consiguiente, la unión específica/selectiva puede significar que, usando el mismo método de medición, por ejemplo, SPR, una unidad de unión (o polipéptido que comprende la misma) se une a TNF $\alpha$  y/o IL-23 con un valor de KD de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos y se une a citocinas relacionadas con un valor de KD mayor de  $10^{-4}$  moles/litro. Un ejemplo de una citocina relacionada de IL-23 es IL-12, ya que comparte la subunidad p40 con IL-23. Ejemplos de citocinas relacionadas de TNF $\alpha$  son los miembros de la superfamilia de TNF FASL, TNF $\beta$ , LIGHT, TL-1A, RANKL. Por tanto, en una realización de la presente tecnología, al menos un ISVD comprendido en el polipéptido se une a TNF $\alpha$  (humano) con un valor de KD de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos y se une a FASL, TNF $\beta$ , LIGHT, TL-1A, RANKL de la misma especie con un valor de KD mayor de  $10^{-4}$  moles/litro, y al menos dos ISVD comprendidos en el polipéptido se unen a IL-23 con un valor de KD de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos y se unen a IL-12 de la misma especie con un valor de KD mayor de  $10^{-4}$  moles/litro.

Por tanto, el polipéptido de la presente tecnología tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a TNF $\alpha$  humano y a IL-23 humana en comparación con un polipéptido que consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que 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 $\alpha$  humano no excluye que la unidad de unión o un polipéptido que comprende el mismo también pueda unirse específicamente a TNF $\alpha$  de macacos. Asimismo, por ejemplo, la unión específica a IL-23 humana no excluye que la unidad de unión o un polipéptido que comprende el mismo también pueda unirse específicamente a IL-23 de macacos ("cyno").

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

La constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente, como estará claro para los expertos en la materia. Los métodos para determinar la constante de disociación estarán claros para los expertos en la materia y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas a continuación. A este respecto, también estará claro que puede no ser posible medir las constantes de disociación de más de  $10^{-4}$  moles/litro o  $10^{-3}$  moles/litro (por ejemplo, de  $10^{-2}$  moles/litro). Opcionalmente, como estará claro también para los expertos en la materia, la constante de disociación (real o aparente) puede calcularse basándose en 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 puede medirse mediante diferentes técnicas conocidas *per se*, tales como la técnica de biosensor por resonancia de plasmón superficial (SPR) bien conocida (véase, por ejemplo, Ober *et al.* 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559). La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se usa en la presente memoria, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas instantáneas por detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de la matriz del biosensor, donde una molécula se inmoviliza en el chip biosensor y la otra molécula se pasa sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo que producen mediciones de  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y, por tanto, valores de  $K_D$  (o  $K_A$ ).

Esto puede realizarse, por ejemplo, usando el sistema BIAcore® bien conocido (BIAcore International AB, una empresa GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, 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  
5 Johnsson *et al.* (1991, Anal. Biochem. 198: 268-277).

Otra técnica de biosensor bien conocida para determinar las afinidades de interacciones biomoleculares es interferometría de biocapa (BLI) (véase, por ejemplo, Abdiche *et al.* 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217). La expresión “interferometría de biocapa” o “BLI”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una técnica óptica sin marcador que analiza el patrón de  
10 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 desplazamiento en el patrón de interferencia, presentado como un desplazamiento de la longitud de onda (nm), cuya magnitud es una medida directa del número de moléculas unidas a la superficie de  
15 la punta del biosensor. Como las interacciones pueden medirse instantáneamente, pueden determinarse las tasas y afinidades de asociación y disociación. Puede realizarse BLI, por ejemplo, usando los sistemas Octet® bien conocidos (ForteBio, una división de Pall Life Sciences, Menlo Park, EE. UU.).

Como alternativa, las afinidades pueden medirse en ensayo de exclusión cinética (KinExA)  
20 (véase, por ejemplo, Drake *et al.* 2004, Anal. Biochem., 328: 35-43), usando la plataforma KinExA® (Sapidyne Instruments Inc, Boise, EE. UU.). El término "KinExA", como se usa en la presente memoria, se refiere a un método basado en solución para medir la afinidad de unión equilibrio verdadera y la cinética de moléculas sin modificar. Se pasan soluciones equilibradas de un complejo de anticuerpo/antígeno sobre una columna con microesferas recubiertas  
25 previamente con antígeno (o anticuerpo), lo que permite que el anticuerpo libre (o antígeno) se una a la molécula recubierta. La detección del anticuerpo (o antígeno) capturado de este modo se consigue con una proteína marcada de forma fluorescente que se une al anticuerpo (o antígeno).

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

### 5.3 Prolongación de la semivida (*in vivo*)

- 5 El polipéptido puede comprender además uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión, opcionalmente unidos mediante uno o más conectores peptídicos, en que dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión proporcionan al polipéptido una semivida (*in vivo*) aumentada, en comparación con el correspondiente polipéptido sin dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión.
- 10 Prolongación 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 puede expresarse, por ejemplo, como  $t_{1/2\beta}$ .

El tipo de grupos, residuos, restos o unidades de unión en general no está restringido y puede elegirse, por ejemplo, del grupo que consiste en una molécula de polietilenglicol, proteínas séricas o fragmentos de las mismas, unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas, una parte Fc y pequeñas proteínas o péptidos que pueden unirse a proteínas séricas.

Más específicamente, dichos uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumentada pueden elegirse del grupo que consiste en unidades de unión que pueden unirse a seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana o una inmunoglobulina sérica, tal como IgG. En una realización, dicho uno o más distintos grupos, residuos, restos o unidades de unión que proporcionan al polipéptido una semivida aumenta es una unidad de unión que puede unirse a seroalbúmina humana. En una realización, la unidad de unión es un ISVD.

Por ejemplo, el documento WO 2004/041865 describe ISVD que se unen a seroalbúmina humana (y, en particular, contra seroalbúmina humana) que pueden unirse a otras proteínas (tal como uno o más distintos ISVD que se unen a una diana deseada) para aumentar la semivida de dicha proteína.

La solicitud internacional WO 2006/122787 describe varios ISVD contra seroalbúmina (humana). Estos ISVD incluyen ISVD denominado Alb-1 (SEQ ID NO: 52 en el documento WO

2006/122787) y variantes humanizadas del mismo, tal como Alb-8 (SEQ ID NO: 62 en el documento WO 2006/122787). De nuevo, estos pueden usarse para prolongar la semivida de proteínas y polipéptidos terapéuticos y otras entidades o restos terapéuticos.

Además, el documento WO 2012/175400 describe una versión más mejorada de Alb-1 denominada Alb-23.

En una realización, el polipéptido comprende un resto de unión a seroalbúmina seleccionado de Alb-1, Alb-3, Alb-4, Alb-5, Alb-6, Alb-7, Alb-8, Alb-9, Alb-10 (WO 2006/122787) y Alb-23. En una realización, el resto de unión a seroalbúmina es Alb-8 o Alb-23 o sus variantes, como se muestra en las páginas 7-9 del documento WO 2012/175400. En una realización, el resto de unión a seroalbúmina se selecciona de los productos de unión a albúmina descritos en los documentos WO 2012/175741, WO2015/173325, WO2017/080850, WO2017/085172, WO2018/104444, WO2018/134235 y WO2018/134234. Algunos productos de unión a seroalbúmina se muestran también en la tabla A-4. En una realización, un componente adicional del polipéptido de la presente tecnología es como se describe en el siguiente punto

D:

D. Un ISVD que se une a seroalbúmina humana y comprende

- i. una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 8;
- ii. una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 12; y
- iii. una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 16.

En una realización, el ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

Ejemplos de dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana tienen una o más, o todas, las regiones flanqueantes indicadas para la construcción ALB23002 de la tabla A-2 (además de las CDR definidas en el punto precedente D). En una realización, y es un ISVD que comprende o

que consiste en la secuencia de aminoácidos completa de la construcción ALB23002 (SEQ ID NO: 4, véase la tabla A-1 y A-2).

El punto D también puede describirse usando la definición de Kabat como:

D'. Un ISVD que se une a seroalbúmina humana y comprende

- 5           i.       una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 124;
- ii.       una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 132; y
- 10          iii.       una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 o una secuencia de aminoácidos con 2 o 1 diferencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 140.

En una realización, el ISVD comprende una CDR1 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, una CDR2 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 y una CDR3 que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140.

Ejemplos de dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana tienen una o más, o todas, las regiones flanqueantes indicadas para la construcción ALB23002 de la tabla A-2.1 (además de las CDR definidas en el punto precedente D'). En una realización, es un ISVD que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos completa de la construcción ALB23002 (SEQ ID NO: 4, véase la tabla A-1 y A-2.1).

Además, en otra realización, la secuencia de aminoácidos de un ISVD que se une a seroalbúmina humana puede tener una identidad de secuencia de más de un 90 %, tal como más de un 95 % o más de un 99 %, con SEQ ID NO: 4, en la que las CDR son como se definen en el punto precedente D o D'. En una realización, el ISVD que se une a seroalbúmina humana comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

Cuando dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana tiene 2 o 1 diferencias de aminoácidos en al menos una CDR con respecto a una secuencia CDR de referencia correspondiente (punto

D o D' anterior), el ISVD tiene al menos la mitad de la afinidad de unión, o al menos la misma afinidad de unión, a seroalbúmina humana en comparación con la construcción ALB23002 (SEQ ID NO: 4), en el que la afinidad de unión se mide usando el mismo método, tal como SPR.

En una realización, cuando dicho ISVD que se une a seroalbúmina humana tiene una posición carboxiterminal, muestra una prolongación carboxiterminal, tal como una prolongación carboxiterminal de alanina (A) o glicina (G). En una realización, dicho ISVD se selecciona de SEQ ID NO: 33, 34, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43 y 45 (véase la tabla A-4 a continuación). En otra realización, el ISVD que se une a seroalbúmina humana tiene otra posición distinta de la posición carboxiterminal (es decir, no es el ISVD carboxiterminal del polipéptido de la tecnología). En una realización, dicho ISVD se selecciona de SEQ ID NO: 4, 31, 32, 35, y 37 (véase la tabla A-4 a continuación).

#### 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 nucleotídicos unidos entre sí mediante el armazón de fosfato para formar una secuencia de nucleótidos. Un ácido nucleico puede usarse para transformar/transfectar una célula hospedadora u organismo hospedador, por ejemplo, para la expresión y/o producción de un polipéptido. Los hospedadores o células hospedadoras adecuadas con propósitos de producción estarán claros para los expertos en la materia, y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Un hospedador o célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología también está abarcado por 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 APN. Puede ser monocatenario o bicatenario. En una realización, está 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 pueden prepararse u obtenerse de una manera conocida *per se*, y/o pueden aislarse de una fuente natural adecuada. Las secuencias de nucleótidos que codifican (poli) péptidos de origen natural puede someterse, por ejemplo, a mutagénesis dirigida al sitio, para proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifique el polipéptido con variación de secuencia. Además, como estará claro para los expertos en la materia, para preparar un ácido nucleico, también varias secuencias de nucleótidos, tales como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de dirección y, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican uno o más conectores pueden unirse conjuntamente de una manera adecuada.

Las técnicas para generar ácidos nucleicos estarán claras para los expertos en la materia y pueden incluir, por ejemplo, aunque sin limitación, síntesis automatizada de ADN; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más secuencias de origen natural y/o sintéticas (o dos o más partes de las mismas), introducción de mutaciones que dan lugar a la expresión de un producto de expresión trunca; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que pueden digerirse fácilmente y/o ligarse 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 una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente tecnología. Un vector, como se usa en la presente memoria, es un vehículo adecuado para transportar material genético a una célula. Un vector incluye ácidos nucleicos desnudos, tales como plásmidos o ARNm, o ácidos nucleicos incluidos en una estructura más grande, tal como liposomas o vectores víricos.

En algunas realizaciones, los vectores comprenden al menos un ácido nucleico que se une opcionalmente a uno o más elementos reguladores, tales como, por ejemplo, uno o más promotores, potenciadores, terminadores adecuados, etc. En una realización, el vector es un vector de expresión, es decir, un vector adecuado para expresar un polipéptido codificado o construcción en condiciones adecuadas, por ejemplo, cuando el vector se introduce en una célula (por ejemplo, humana). Los vectores basados en ADN incluyen la presencia de

elementos para la transcripción (por ejemplo, un promotor y una señal de poliA) y traducción (por ejemplo, secuencia Kozak).

En una realización, en el vector, dicho al menos un ácido nucleico y dichos elementos reguladores están “unidos de forma funcional” entre sí, mediante lo que se entiende, en general, que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor se considera “unido de forma funcional” a una secuencia codificante si dicho promotor puede iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia codificante (en que dicha secuencia codificante debe entenderse “bajo el control de” dicho promotor). En general, cuando dos secuencias de nucleótidos están unidas de forma funcional, estarán en la misma orientación y habitualmente también en el mismo marco de lectura. Habitualmente serán también esencialmente contiguas, aunque también puede que esto no sea necesario.

En una realización, cualquier elemento regulador del vector es de tal manera que puede proporcionar su función biológica pretendida en la célula hospedadora u organismo hospedador pretendido.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debe ser “funcional” en la célula hospedadora u organismo hospedador pretendido, mediante lo que se entiende que, por ejemplo, dicho promotor debe poder iniciar o controlar/regular de otro modo la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia codificante, a la que está unido de forma funcional.

## **5.6 Composiciones**

La presente tecnología también proporciona una composición que comprenden 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 comprende uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

## 5.7 Organismos hospedadores

La presente tecnología también se refiere a células hospedadoras u organismos hospedadores 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 están claros para los expertos en la materia y son, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Ejemplos específicos incluyen células HEK293, células CHO, *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*.

En una realización, el hospedador es *Pichia pastoris*.

## 5.8 Métodos y usos del polipéptido

La presente tecnología también proporciona un método para producir el polipéptido de la presente tecnología. El método puede comprender transformar/transfectar una célula hospedadora u organismo hospedador con un ácido nucleico que codifica el polipéptido, expresar el polipéptido en el hospedador, opcionalmente seguido de una o más etapas de aislamiento y/o purificación. Específicamente, el método puede comprender:

a) expresar, en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado o en otro sistema de expresión adecuado, una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido; opcionalmente seguido de:

b) aislar y/o purificar el polipéptido.

Las células hospedadoras u organismos hospedadores adecuados con propósitos de producción estarán claros para los expertos en la materia, y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado. Ejemplos específicos incluyen células HEK293, células CHO, *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*. En una realización, el hospedador es *Pichia pastoris*.

El polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o vector como se describen, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, molécula de ácido nucleico o vector son útiles como medicamento.

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

10 También se proporciona el polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o vector como se describen, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, molécula de ácido nucleico o vector para su uso en el tratamiento (profiláctico y/o terapéutico).

15 También se proporciona el polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o 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 en el tratamiento (profiláctico y/o terapéutico) de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria.

20 También se proporciona el polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o vector como se describen, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, molécula de ácido nucleico o vector para su uso en el tratamiento (profiláctico y/o terapéutico) de enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica e hidradenitis supurativa.

25 Se proporciona además un método (profiláctico y/o terapéutico) para tratar una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria, en el que 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 vector como se describe, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, molécula de ácido nucleico o vector.

Se proporciona además un método (profiláctico o terapéutico) de tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis

psoriásica e hidradenitis supurativa, en el que dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa del polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o vector como se describen, o una composición que comprende el polipéptido de la presente tecnología, molécula de ácido nucleico o vector.

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

10 Se proporciona además el uso del polipéptido de la presente tecnología, una molécula de ácido nucleico o vector como se describen, o una composición que comprende el polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector en la preparación de una composición farmacéutica para tratar enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, artritis psoriásica o hidradenitis supurativa.

15 La enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria puede ser, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

Un “sujeto”, como se menciona en el contexto de la presente tecnología, puede ser cualquier animal. En una realización, el sujeto es un mamífero. Entre los mamíferos, puede hacerse 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 usados en general con propósitos de investigación y/o para producir anticuerpos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cabras, ovejas, caballos, cerdos, primates no humanos, tales como macacos, o camélidos, tales como llamas o alpacas).

25 En el contexto de los propósitos profilácticos y/o terapéuticos, el sujeto puede ser cualquier animal, y más específicamente cualquier mamífero. En una realización, el sujeto es un sujeto humano.

Pueden administrarse sustancias, incluyendo polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y vectores, o composiciones a un sujeto por cualquier vía adecuada de administración, por ejemplo, por administración enteral (tal como oral o rectal) o parenteral (tal como epicutánea,

sublingual, yugal, nasal, intraarticular, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, transdérmica o transmucosa). En una realización, las sustancias se administran por administración parenteral, tal como administración intramuscular, subcutánea o intradérmica. En una realización, se usa administración subcutánea.

- 5 Una cantidad eficaz de un polipéptido, una molécula de ácido nucleico o vector como se describen, o una composición que comprende el polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector puede administrarse a un sujeto para proporcionar los resultados de tratamiento pretendidos.

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

**Tabla A-1: Secuencias de aminoácidos de los diferentes componentes básicos V<sub>HH</sub> monovalentes identificados dentro del polipéptido tetravalente F027500069 ("ID" se refiere a la SEQ ID NO como se usa en la presente memoria)**

| Nombre   | ID | Secuencia de aminoácidos                                                                                                                  |
|----------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6C11     | 2  | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR<br>EFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAL<br>YYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVTVSS         |
| 119A03/1 | 3  | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQ<br>APGKQREL VATIESGSR TN YADSVKGRFTISRDN SKKTVYLQMNSLR<br>PEDTALYYCQTSGSGSPNFWGQGTLVTVSS |
| ALB23002 | 4  | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP<br>EWWSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAL<br>YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS             |
| 81A12    | 5  | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKER<br>EFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAL<br>YYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWGQGTLVKVSS |

**Tabla A-2: Secuencias para las CDR de acuerdo con la numeración de AbM y regiones flanqueantes (“ID” se refiere a la SEQ ID NO dada)**

| ID | V <sub>HH</sub> | ID | FR1                               | ID | CDR1                        | ID | FR2                | ID | CDR2           | ID | FR3                                             | ID | CDR3                    | ID | FR4             |
|----|-----------------|----|-----------------------------------|----|-----------------------------|----|--------------------|----|----------------|----|-------------------------------------------------|----|-------------------------|----|-----------------|
| 2  | 6C11            | 18 | DVQLVESGGG<br>VVQPGGSLRL<br>SCTAS | 6  | GFTFSTA<br>DMG              | 20 | WFRQAPGK<br>GREFVA | 10 | RISGID<br>GTTY | 24 | YDEPVKGRFTISRDNSK<br>NTVYLQMNSLRPEDTAL<br>YYCRS | 14 | PRYADQWS<br>AYDY        | 28 | WGQGT<br>LVTVSS |
| 3  | 119A03/1        | 19 | EVQLVESGGG<br>VVQPGGSLRL<br>SCAAS | 7  | GRIFSLP<br>ASGNIF<br>NLLTIA | 21 | WYRQAPG<br>KQRELVA | 11 | TIESGS<br>RTN  | 25 | YADSVKGRFTISRDNSK<br>KTVYLQMNSLRPEDTAL<br>YYCQT | 15 | SGSGSPNF                | 28 | WGQGT<br>LVTVSS |
| 4  | ALB23002        | 19 | EVQLVESGGG<br>VVQPGGSLRL<br>SCAAS | 8  | GFTFRSF<br>GMS              | 22 | WVRQAPG<br>KGPEWVS | 12 | SISGSG<br>SDTL | 26 | YADSVKGRFTISRDNSK<br>NTLYLQMNSLRPEDTAL<br>YYCTI | 16 | GGSLSR                  | 29 | SSQGTL<br>VTVSS |
| 5  | 81A12           | 19 | EVQLVESGGG<br>VVQPGGSLRL<br>SCAAS | 9  | GRTLSSY<br>AMG              | 23 | WFRQAPGK<br>EREFVA | 13 | RISQG<br>GTAIY | 27 | YADSVKGRFTISRDNSK<br>NTVYLQMNSLRPEDTAL<br>YYCAK | 17 | DPSPYYRGS<br>AYLLSGSYDS | 30 | WGQGT<br>LVKVSS |

**Tabla A-2.1: Secuencias para las CDR de acuerdo con la numeración de Kabat y regiones flanqueantes (“ID” se refiere a la SEQ ID NO dada)**

| ID | V <sub>HH</sub> | ID  | FR1                                    | ID  | CDR1               | ID  | FR2                | ID  | CDR2                      | ID  | FR3                                   | ID  | CDR3                    | ID  | FR4             |
|----|-----------------|-----|----------------------------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------------------|-----|-------------------------|-----|-----------------|
| 2  | 6C11            | 118 | DVQLVESGGG<br>VVQPGGSLRL<br>SCTASGFTFS | 122 | TADMG              | 126 | WFRQAPGK<br>GREFVA | 130 | RISGIDG<br>TTYDE<br>PVKG  | 134 | RFTISRDNSKNTVYLQ<br>MNSLRPEDTALYYCRS  | 138 | PRYADQWS<br>AYDY        | 142 | WGQGT<br>LVTVSS |
| 3  | 119A03/1        | 119 | EVQLVESGGG<br>VVQPGGSLRL<br>SCAASGRIFS | 123 | LPASGNI<br>FNLLTIA | 127 | WYRQAPG<br>KQRELVA | 131 | TIESGSR<br>TNYADS<br>VKG  | 135 | RFTISRDNSKKTIVYLQ<br>MNSLRPEDTALYYCQT | 139 | SGSGSPNF                | 143 | WGQGT<br>LVTVSS |
| 4  | ALB23002        | 120 | EVQLVESGGG<br>VVQPGGSLRL<br>SCAASGFTFR | 124 | SFGMS              | 128 | WVRQAPG<br>KGPEWVS | 132 | SISGSGS<br>DTLYAD<br>SVKG | 136 | RFTISRDNSKNTLYLQ<br>MNSLRPEDTALYYCTI  | 140 | GGSLSR                  | 144 | SSQGTL<br>VTVSS |
| 5  | 81A12           | 121 | EVQLVESGGG<br>VVQPGGSLRL<br>SCAASGRTLS | 125 | SYAMG              | 129 | WFRQAPGK<br>EREFVA | 133 | RISQGG<br>TAIYYA<br>DSVKG | 137 | RFTISRDNSKNTVYLQ<br>MNSLRPEDTALYYCAK  | 141 | DPSPYYRGS<br>AYLLSGSYDS | 145 | WGQGT<br>LVKVSS |

**Tabla A-3: Secuencias de aminoácidos del polipéptido multivalente seleccionado (“ID” se refiere a la SEQ ID NO dada)**

| Nombre     | ID | Secuencia de aminoácidos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F027500069 | 1  | DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRP<br>EDTALYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWY<br>RQAPGKQRELVATIESGSRTNYADSVKGRFTISRDN SKKTVYLQMNSLRPEDTALYYCQTSGSGSPNFWGQGLTVTVSSGGGGSGGG<br>EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRP<br>EDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKERE FVARIS<br>QGGTAIYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWGQGLTVKVSSA |

**Tabla A-4: Secuencias de ISVD de unión a seroalbúmina (“ID” se refiere a la SEQ ID NO como se usa en la presente memoria)**

| Nombre             | ID | Secuencia de aminoácidos                                                                                                    |
|--------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alb8               | 31 | EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV<br>SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSS  |
| Alb23              | 32 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWV<br>SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSS  |
| Alb129             | 33 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSA |
| Alb132             | 34 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCLASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSA |
| Alb11              | 35 | EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV<br>SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSS  |
| Alb11<br>(S112K)-A | 36 | EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV<br>SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVKVSSA |
| Alb82              | 37 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSS  |
| Alb82-A            | 38 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSA |

|               |    |                                                                                                                              |
|---------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alb82-AA      | 39 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSAA  |
| Alb82-AAA     | 40 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSAAA |
| Alb82-G       | 41 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSG   |
| Alb82-GG      | 42 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSGG  |
| Alb82-<br>GGG | 43 | EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSGGG |
| Alb23002      | 4  | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSS   |
| Alb223        | 45 | EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEW<br>VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIG<br>GSLSRSSQGTLVTVSSA  |

**Tabla A-5: Secuencias conectoras (“ID” se refiere a la SEQ ID NO como se usa en la presente memoria)**

| <b>Nombre</b> | <b>ID</b> | <b>Secuencia de aminoácidos</b> |
|---------------|-----------|---------------------------------|
| conector 3A   | 46        | AAA                             |

|                                                 |    |                                                                    |
|-------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------|
| conector 5GS                                    | 47 | GGGGS                                                              |
| conector 7GS                                    | 48 | SGGSGGS                                                            |
| conector 8GS                                    | 49 | GGGSGGS                                                            |
| conector 9GS                                    | 50 | GGGSGGGS                                                           |
| conector 10GS                                   | 51 | GGGSGGGGS                                                          |
| conector 15GS                                   | 52 | GGGSGGGSGGGGS                                                      |
| conector 18GS                                   | 53 | GGGSGGGSGGGSGGS                                                    |
| conector 20GS                                   | 54 | GGGSGGGSGGGSGGGGS                                                  |
| conector 25GS                                   | 55 | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS                                              |
| conector 30GS                                   | 56 | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS                                          |
| conector 35GS                                   | 57 | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS                                      |
| conector 40GS                                   | 58 | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS                                  |
| bisagra G1                                      | 59 | EPKSCDKTHTCPPCP                                                    |
| bisagra 9GS-G1                                  | 60 | GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP                                            |
| región de bisagra<br>larga superior de<br>llama | 61 | EPKTPKPQAAA                                                        |
| bisagra G3                                      | 62 | ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC<br>PEPKSCDTPPPCPRCP |

## 6 Ejemplos

### 6.1 Ejemplo 1: Generación de construcción de ISVD multiespecífica

La identificación del polipéptido F027500069 (SEQ ID NO: 1) que contiene ISVD que se une a TNF $\alpha$  e IL-23 fue el resultado de una campaña de genomaniplulación multiespecífica

dirigida por los datos y de formateo en que se incluyeron componentes básicos basados en componentes básicos V<sub>HH</sub> anti-TNF $\alpha$  (TNF06C11 (documento WO 2017/081320), TNF01C02 (documento WO 2015/173325, SEQ ID NO: 327) y VHH#3E (documento WO 2004/041862, SEQ ID NO: 4)), componentes básicos V<sub>HH</sub> anti-IL-23p19 (23IL37D05, 23IL119A03 y 23IL81A12 (documento WO 2009/068627)) y componente básico V<sub>HH</sub> anti-HSA ALB23002 (documento WO2017085172, SEQ ID NO: 10). Se aplicaron diferentes posiciones/orientaciones de los componentes básicos y diferentes longitudes de conector (9GS frente a 35GS) y se verificaron como críticas para diferentes parámetros (potencia, reactividad cruzada, expresión, etc.). La potencia en este contexto se refiere a la inhibición de la activación de NF $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  *in vitro*, ensayada en el ejemplo 6 e inhibición de la producción de mIL-22 inducida por IL-23 *ex vivo*, así como inhibición de la activación del promotor de SIE inducida por IL-23 *in vitro*, ensayada en los ejemplos 7 y 8.

Se transformó un panel que comprendía 38 construcciones (tabla 1) en *Pichia pastoris* para producciones a pequeña escala. La inducción de la expresión de la construcción de ISVD se produjo mediante la adición por etapas de metanol. Se usó el medio aclarado 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 usaron para la caracterización funcional y la evaluación de la expresión.

Algunas construcciones mostraron potencias alteradas, dependiendo de la longitud del conector y la posición relativa de los componentes básicos ISVD. Por ejemplo: la potencia de VHH#3E bivalente hacia TNF $\alpha$  de macaco se alteró fuertemente cuando se unía con un conector 9GS corto. Otro ejemplo es que la posición del componente básico ISVD anti-IL-23, 37D05, en la construcción multiespecífica fue crucial para obtener potencia máxima.

**Tabla 1: Listado de los 38 diferentes formatos de ISVD multiespecíficos evaluados. BB = componente básico, ALB = ALB23002.**

| ID de construcción | BB1   | conec-tor 1 | BB2 | conec-tor 2 | BB3   | conec-tor 3 | BB4 | conec-tor 4 | BB5 |
|--------------------|-------|-------------|-----|-------------|-------|-------------|-----|-------------|-----|
| F027500001         | 37D05 | 35GS        | ALB | 35GS        | 6C11  |             |     |             |     |
| F027500002         | 6C11  | 35GS        | ALB | 35GS        | 37D05 |             |     |             |     |

| ID de construcción | BB1          | conec-<br>tor 1 | BB2      | conec-<br>tor 2 | BB3      | conec-<br>tor 3 | BB4    | conec-<br>tor 4 | BB5    |
|--------------------|--------------|-----------------|----------|-----------------|----------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| F027500003         | 37D05        | 35GS            | 6C11     | 35GS            | ALB      |                 |        |                 |        |
| F027500004         | 6C11         | 35GS            | 37D05    | 35GS            | ALB      |                 |        |                 |        |
| F027500005         | 6C11         | 35GS            | 119A03/1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12  |                 |        |
| F027500006         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12    | 35GS            | 6C11   |                 |        |
| F027500007         | 37D05        | 35GS            | 1C02     | 9GS             | ALB      | 9GS             | 1C02   |                 |        |
| F027500008         | 1C02         | 9GS             | ALB      | 9GS             | 1C02     | 35GS            | 37D05  |                 |        |
| F027500009         | 37D05        | 35GS            | VHH#3E   | 9GS             | ALB      | 9GS             | VHH#3E |                 |        |
| F027500010         | VHH#3E       | 9GS             | ALB      | 9GS             | VHH#3E   | 35GS            | 37D05  |                 |        |
| F027500011         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12    | 35GS            | 1C02   | 30GS            | 1C02   |
| F027500012         | 1C02         | 30GS            | 1C02     | 35GS            | 119A03/1 | 9GS             | ALB    | 9GS             | 81A12  |
| F027500013         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12    | 35GS            | VHH#3E | 9GS             | VHH#3E |
| F027500014         | VHH#3E       | 9GS             | VHH#3E   | 35GS            | 119A03/1 | 9GS             | ALB    | 9GS             | 81A12  |
| F027500063         | 6C11         | 35GS            | 119A03/1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12  |                 |        |
| F027500064         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12    | 35GS            | 6C11   |                 |        |
| F027500069         | 6C11         | 9GS             | 119A03/1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12  |                 |        |
| F027500070         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12    | 9GS             | 6C11   |                 |        |
| F027500073         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12    | 35GS            | 1C02   | 35GS            | 1C02   |
| F027500074         | 1C02         | 35GS            | 1C02     | 35GS            | 119A03/1 | 9GS             | ALB    | 9GS             | 81A12  |
| F027500075         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12    | 35GS            | VHH#3E | 9GS             | VHH#3E |
| F027500076         | VHH#3E       | 9GS             | VHH#3E   | 35GS            | 119A03/1 | 9GS             | ALB    | 9GS             | 81A12  |
| F027500077         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB      | 9GS             | 81A12    | 9GS             | 1C02   | 35GS            | 1C02   |
| F027500078         | 1C02         | 35GS            | 1C02     | 9GS             | 119A03/1 | 9GS             | ALB    | 9GS             | 81A12  |

| ID de construcción | BB1          | conec-<br>tor 1 | BB2    | conec-<br>tor 2 | BB3      | conec-<br>tor 3 | BB4          | conec-<br>tor 4 | BB5    |
|--------------------|--------------|-----------------|--------|-----------------|----------|-----------------|--------------|-----------------|--------|
| F027500079         | 119A03/<br>1 | 9GS             | ALB    | 9GS             | 81A12    | 9GS             | VHH#3E       | 9GS             | VHH#3E |
| F027500080         | VHH#3E       | 9GS             | VHH#3E | 9GS             | 119A03/1 | 9GS             | ALB          | 9GS             | 81A12  |
| F027500082         | 119A03/<br>1 | 35GS            | 81A12  | 9GS             | 1C02     | 9GS             | ALB          | 9GS             | 1C02   |
| F027500083         | VHH#3E       | 9GS             | ALB    | 9GS             | VHH#3E   | 9GS             | 119A03/<br>1 | 35GS            | 81A12  |
| F027500084         | 119A03/<br>1 | 35GS            | 81A12  | 9GS             | VHH#3E   | 9GS             | ALB          | 9GS             | VHH#3E |
| F027500085         | 1C02         | 9GS             | ALB    | 9GS             | 1C02     | 35GS            | 119A03/<br>1 | 35GS            | 81A12  |
| F027500086         | 119A03/<br>1 | 35GS            | 81A12  | 35GS            | 1C02     | 9GS             | ALB          | 9GS             | 1C02   |
| F027500087         | VHH#3E       | 9GS             | ALB    | 9GS             | VHH#3E   | 35GS            | 119A03/<br>1 | 35GS            | 81A12  |
| F027500088         | 119A03/<br>1 | 35GS            | 81A12  | 35GS            | VHH#3E   | 9GS             | ALB          | 9GS             | VHH#3E |
| F027500093         | 37D05        | 9GS             | ALB    | 9GS             | 6C11     |                 |              |                 |        |
| F027500094         | 37D05        | 9GS             | 6C11   | 9GS             | ALB      |                 |              |                 |        |
| F027500095         | 37D05        | 9GS             | 1C02   | 9GS             | ALB      | 9GS             | 1C02         |                 |        |
| F027500096         | 37D05        | 9GS             | VHH#3E | 9GS             | ALB      | 9GS             | VHH#3E       |                 |        |

Posteriormente, el gran panel se recortó a un panel de 4 construcciones multiespecíficas, que consisten en las construcciones de ISVD F027500069, F027500093, F027500095 y F027500096, que se verificó que eran potentes sobre ambas dianas (humana y de macaco) y que comprenden la posibilidad de altos niveles de expresión, basándose en las estimaciones de rendimiento preliminares.

Se hicieron producciones de 2 l de mayor escala en *Pichia pastoris* para la determinación del rendimiento de expresión y la evaluación de las propiedades biofísicas y la reactividad de los anticuerpos preexistentes. La tabla 2 muestra que se requería una orientación

específica de los componentes básicos para obtener altos niveles de expresión en *Pichia pastoris*. Los rendimientos de expresión, obtenidos de cultivos de 5 ml, para 4 construcciones de ISVD formateadas con los mismos componentes básicos, pero en diferentes orientaciones y con diferentes longitudes de conector, indican claramente que el ISVD 6C11 necesita una posición aminoterminal para una buena expresión. Esto se confirmó tras fermentación de 2 l de F027500069 y F027500070, donde la construcción de ISVD con 6C11 aminoterminal (F027500069) alcanzó un valor cuantitativo de 6,4 g/l que era 3,2 veces mayor que para F027500070, con 6C11 carboxiterminal.

10 **Tabla 2: Niveles de expresión de 4 construcciones de ISVD con el componente básico 6C11, 119A03/1 y 81A12 en diferentes orientaciones y con diferentes longitudes de conector.**

| ID de construcción | BB1      | conector 1  | BB2      | conector 2 | BB3   | conector 3  | BB4   | Rendimiento a partir de 5 ml de cultivo (µg/ml) | Rendimiento a partir de 2 l de fermentación (g/l) |
|--------------------|----------|-------------|----------|------------|-------|-------------|-------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>F027500063</b>  | 6C11     | <b>35GS</b> | 119A03/1 | 9GS        | ALB   | 9GS         | 81A12 | 129,0                                           |                                                   |
| <b>F027500064</b>  | 119A03/1 | 9GS         | ALB      | 9GS        | 81A12 | <b>35GS</b> | 6C11  | 81,7                                            |                                                   |
| <b>F027500069</b>  | 6C11     | 9GS         | 119A03/1 | 9GS        | ALB   | 9GS         | 81A12 | 165,2                                           | 6,4                                               |
| <b>F027500070</b>  | 119A03/1 | 9GS         | ALB      | 9GS        | 81A12 | 9GS         | 6C11  | 104,6                                           | 2,0                                               |

La tabla 3 y el ejemplo 9 muestran que la reactividad de los anticuerpos preexistentes está dirigida por la composición y la valencia de las construcciones de ISVD respectivas.

**Tabla 3: Unión de los anticuerpos preexistentes presentes en 96 muestras de suero humano a F027500069, F027500093, F027500095 y F027500096 en comparación con las construcciones de ISVD de control F027301099 y F027301186**

| ID de construcción | BB1   | conector 1 | BB2      | conector 2 | BB3    | conector 3 | BB4      | conector 4 | BB5  | Percentil 25 % | Mediana del nivel de UR | Percentil 75% |
|--------------------|-------|------------|----------|------------|--------|------------|----------|------------|------|----------------|-------------------------|---------------|
| F027301099         | 1B11  | 35GS       | ALB      | 35GS       | 1B11   | 35GS       | 6C11     |            |      | 47             | 92                      | 350           |
| F027301186         | 1E07  | 35GS       | 1E07     | 35GS       | 1C02   | 9GS        | ALB      | 9GS        | 1C02 | 61             | 135                     | 622           |
| F027500069         | 6C11  | 9GS        | 119A03/1 | 9GS        | ALB    | 9GS        | 81A12-A  |            |      | -15            | -8                      | 5             |
| F027500093         | 37D05 | 9GS        | ALB      | 9GS        | 6C11-A |            |          |            |      | -12            | -5                      | 22            |
| F027500095         | 37D05 | 9GS        | 1C02     | 9GS        | ALB    | 9GS        | 1C02-A   |            |      | 0              | 7                       | 22            |
| F027500096         | 37D05 | 9GS        | VHH#3E   | 9GS        | ALB    | 9GS        | VHH#3E-A |            |      | 5              | 14                      | 22            |

Finalmente, la construcción F027500069 de ISVD se seleccionó basándose en la potencia, la unión reducida a los anticuerpos preexistentes, los niveles de expresión superiores y las características de CMC, con baja viscosidad de 3,3 cP a una concentración de 100 mg/ml, y 6,4 cP a 146 mg/ml en un tampón definido.

## 5      **6.2      Ejemplo 2: Afinidad de unión de construcción de ISVD multiespecífica a TNF $\alpha$ , IL-23 y seroalbúmina**

La afinidad, expresada como la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ), de F027500069 hacia TNF $\alpha$  humano y de macaco, IL-23 humana y de macaco y seroalbúmina humana y de macaco se cuantificó por medio de mediciones de afinidad en solución en una Gyrolab xP  
10      Workstation (Gyros).

En las mediciones controladas de  $K_D$ , se mezcló una dilución seriada de TNF $\alpha$  o IL-23 (que varía de 1  $\mu$ M – 0,1 pM) o seroalbúmina (que varía de 10  $\mu$ M – 1 pM) y una cantidad fija de F027500069 (50 pM en caso de TNF $\alpha$ , 20 pM o 12,5 pM en caso de IL-23 y 1 nM en caso de seroalbúmina) para permitir la interacción y se incubó durante 24 o 48 horas (en caso de  
15      IL-23 y TNF $\alpha$ ) o 2 horas (en caso de seroalbúmina) para alcanzar el equilibrio.

En las mediciones controladas de receptor, se mezcló una dilución seriada de TNF $\alpha$  o IL-23 (que varía de 1  $\mu$ M – 0,1 pM) o seroalbúmina (que varía de 10  $\mu$ M – 1 pM) y una cantidad fija de F027500069 (5 pM en caso de TNF $\alpha$ , 1,25 nM en caso de IL-23 y 50 nM en caso de seroalbúmina) para permitir la interacción y se incubó durante 24 o 48 horas (en caso de  
20      IL-23 y TNF $\alpha$ ) o 2 horas (en caso de seroalbúmina) para alcanzar el equilibrio.

Se capturó TNF $\alpha$ /IL-23/seroalbúmina humanos biotinilados en las microestructuras de un Gyrolab Bioaffy 1000 CD, que contiene columnas de microesferas y se usa como sonda molecular para capturar F027500069 libre de la solución equilibrada. La mezcla de TNF $\alpha$ /IL-23/seroalbúmina y F027500069 (que contiene TNF $\alpha$ /IL-23/seroalbúmina libre, F027500069  
25      libre y complejos de TNF $\alpha$ /IL-23/seroalbúmina - F027500069) se dejó fluir a través de las microesferas, y se capturó un pequeño porcentaje de F027500069 libre, que es proporcional a la concentración de ISVD libre. Entonces se inyectó un anticuerpo anti-V<sub>HH</sub> marcado de forma fluorescente para marcar cualquier F027500069 capturado y, después de eliminar por aclarado el exceso de sonda fluorescente, se determinó el cambio en la

fluorescencia. El ajuste de la serie de dilución se hizo usando el programa informático Gyrolab Analysis, donde las curvas controladas de  $K_D$  y receptor se analizaron para determinar el valor de  $K_D$ .

Los resultados (tabla 4) demuestran que la construcción de ISVD multiespecífica se une a IL-23 humana/de macaco y  $TNF\alpha$  humano/de macaco con alta afinidad.

**Tabla 4: Afinidades de unión de F027500069 a IL-23,  $TNF\alpha$  y seroalbúmina humanos y de macaco**

|             | humano     |              | macaco     |              |                          |
|-------------|------------|--------------|------------|--------------|--------------------------|
| Antígeno    | $K_D$ (pM) | IC 95 % (pM) | $K_D$ (pM) | IC 95 % (pM) | Tiempo de incubación (h) |
| IL-23       | 14,1       | 3,2 - 26,4   | 33,5       | 4,8 - 62,0   | 24                       |
|             | 28,1       | 17,0 - 39,0  | 51,2       | 22,1 - 80,1  | 48                       |
| $TNF\alpha$ | 3,23       | 2,10 - 4,35  | 27,5       | 17,9 - 31,1  | 24                       |
|             | 3,39       | 1,53 - 5,26  | 18,6       | 12,9 - 24,4  | 48                       |
| SA          | 5900       | 5320 - 6480  | 10800      | 9010 - 12500 | 2                        |

### 6.3 Ejemplo 3: Construcción de ISVD multiespecífica que se une a $TNF\alpha$ unido a membrana

- La unión de F027500069 de  $TNF\alpha$  unido a membrana se demostró usando citometría de flujo en células HEK293H que expresan  $TNF\alpha$  de membrana humana y en células CD4+ activados que se aislaron de PBMC y se estimularon con PMA y ionomicina (datos mostrados para células HEK293H que expresan  $TNF\alpha$ ). En resumen, las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron con una serie de dilución de F027500069 partiendo de 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  $TNF\alpha$  unido a membrana), y se incubaron con una serie de dilución de ISVD 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<sub>HH</sub> durante 30 min a 4 °C, se lavaron de nuevo y se incubaron durante 30 min a 4 °C con un anticuerpo de cabra contra ratón 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 % complementado con TOPRO3). Las suspensiones celulares se analizaron entonces en un iQuescreener. Se calcularon los valores de CE50 usando GraphPad Prism. Los valores de CE50 para F027500069 estaban en el mismo intervalo para células viables y fijadas después de 1 hora de incubación, aunque la fijación de las células produjo mayores niveles de expresión de TNF $\alpha$  en la membrana (tabla 5). Después de 24 horas de incubación, se alcanzó equilibrio de unión, con una mejora simultánea de 6,6 veces de la CE50.

**Tabla 5: Afinidad de unión de F027500069 a TNF $\alpha$  expresado en membrana después de tiempos de incubación de 1 hora o 24 horas**

|            | T = 1 h células viables | T = 1 h células fijadas | T = 24 h células fijadas |
|------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Analito    | CE50 (M)                | CE50 (M)                | CE50 (M)                 |
| F027500069 | 6,93E-10                | 8,11E-10                | 1,22E-10                 |

#### **6.4 Ejemplo 4: La construcción de ISVD multiespecífica se une selectivamente a TNF $\alpha$ e IL-23**

Se evaluó la ausencia de unión a citocinas humanas relacionadas de TNF $\alpha$  e IL-23 mediante SPR. Se ensayó hIL-12, ya que comparte la subunidad p40 con IL-23. Se ensayaron los miembros de la superfamilia de TNF FASL, TNF $\beta$ , LIGHT, TL-1A, RANKL humanos como citocinas relacionadas para TNF $\alpha$ .

Las dianas se inmovilizaron a 10  $\mu$ g/ml durante 600 s usando acoplamiento de amina con inyección de 420 segundos de EDC/NHS para la activación y una inyección de 420 segundos de etanolamina HCl 1 M para la desactivación (Sierra Sensors Amine Coupling Kit II n.º cat. ACK-001-025). El caudal durante la activación, la desactivación y la inyección de ligando se estableció a 10  $\mu$ l/min. El pH del tampón de inmovilización de acetato 10 mM se eligió sustrayendo ~1,5 del pI de cada ligando

Después, se inyectó 1  $\mu$ M de F027500069 durante 2 minutos y se dejó que se disociara durante 900 s a un caudal de 45  $\mu$ l/min. Como tampón de migración se usó HBS-EP+ 1x pH 7,4. Como controles positivos, se inyectaron Ab  $\alpha$ -huIL-12 0,2  $\mu$ M y Ab  $\alpha$ -huFASL 0,5  $\mu$ M, Ab  $\alpha$ -huTNF $\beta$  0,5  $\mu$ M, Ab  $\alpha$ -huLIGHT 0,5  $\mu$ M, Ab  $\alpha$ -huTL-1A 0,5  $\mu$ M y V<sub>HH</sub>  $\alpha$ -huRANKL 0,5  $\mu$ M. Se midió la interacción entre F027500069 y los controles positivos con las dianas inmovilizadas por detección de los aumentos en el índice de refracción que se produce como resultados de los cambios de masa en el chip tras la unión.

Todos los controles positivos se unieron a su diana respectiva. No se detectó unión de F027500069 a IL-12, FASL, TNF $\beta$ , LIGHT, TL-1A, RANKL humanos.

## 10      **6.5      Ejemplo 5: Unión simultánea de construcción de ISVD multiespecífica a hIL-23 y hTNF $\alpha$**

Se usó un equipo ProteOn XPR36 para determinar si F027500069 puede unirse simultáneamente a hTNF $\alpha$  y hIL-23. Para este fin, se inmovilizó HSA en un chip GLC ProteOn Sensor mediante acoplamiento de amina. Se inyectaron 100 nM de F027500069 durante 2 min a 10  $\mu$ l/min sobre la superficie de HSA para capturar el ISVD mediante el componente básico ALB23002. Posteriormente, se inyectaron 100 nM de hIL-23, hTNF $\alpha$  o hOX40L o mezclas de IL-23 100 nM + TNF $\alpha$  100 nM, IL-23 100 nM + OX40L 100 nM o TNF $\alpha$  100 nM + IL-13 100 nM, a un caudal de 10  $\mu$ l/min durante 2 min seguido de una posterior etapa de disociación de 600 segundos. Las superficies de HSA se regeneraron con una inyección de 2 minutos de HCl (100 mM) a 45  $\mu$ l/min. El sensograma (figura 1) demuestra que F027500069 puede unirse a IL-23 humana y TNF $\alpha$  humano simultáneamente como se muestra por el aumento en las unidades de respuesta: aumento de ~500 UR de TNF $\alpha$  solamente, aumento de ~880 UR de IL-23 solamente y aumento de ~1300 UR para la mezcla de IL-23 y TNF $\alpha$ .

## 25      **6.6      Ejemplo 6: Inhibición por la construcción de ISVD multiespecífica de la activación de NFkB inducida por TNF $\alpha$ *in vitro***

Las células HEK293\_NFkB-NLucP son células que expresan el receptor de TNF que se transfectaron de forma estable con una construcción indicadora que codifica luciferasa Nano bajo el control de un promotor dependiente de NFkB. La incubación de las células

con TNF $\alpha$  soluble humano y de macaco provocó la expresión génica de luciferasa Nano mediada por NF $\kappa$ B. La luminiscencia de luciferasa Nano se midió usando el sustrato de luciferasa Nano-Glo mezclado con tampón de lisis a la relación de 1:50 añadido a las células. Las muestras se mezclaron 5 min en un agitador para obtener lisis completa.

- 5 Se sembraron células Glo response™ HEK293\_NF $\kappa$ B-NLucP a 20 000 células/pocillo en medio de cultivo normal en placas blancas de 96 pocillos de histocultivo (TC) tratadas con fondo transparente. Se añadieron series de dilución de F027500069 o compuesto de referencia (mAb de referencia anti-TNF $\alpha$ ) a TNF $\alpha$  humano 25 pM o de macaco 70 pM y se incubaron con las células durante 5 horas a 37 °C en presencia de HSA 30  $\mu$ M.
- 10 F027500069 inhibió la activación de NF $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  humano y de macaco de una manera dependiente de la concentración con una CI50 de 38,8 pM (para TNF $\alpha$  humano) y 128 pM (para TNF $\alpha$  de macaco) comparable a la del mAb de referencia anti-TNF $\alpha$  (tabla 6, figura 2).

15 **Tabla 6: Valores de CI50 de neutralización mediada por F027500069 de TNF $\alpha$  humano y de macaco en el ensayo indicador Glo response™ de HEK293\_NF $\kappa$ B-NLucP frente al compuesto de referencia mAb de referencia anti-hTNF $\alpha$**

|                                     | F02750069           |                        | mAb de referencia anti-hTNF $\alpha$ |                        |
|-------------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| antígeno                            | TNF $\alpha$ humano | TNF $\alpha$ de macaco | TNF $\alpha$ humano                  | TNF $\alpha$ de macaco |
| CI50 de ensayo de NF $\kappa$ B (M) | 3,88E-11            | 1,28E-10               | 5,74E-11                             | 7,00E-11               |

## 6.7 Ejemplo 7: Inhibición por la construcción de ISVD multiespecífica de la producción de mIL-22 inducida por IL-23 *ex vivo*

- 20 IL-23 humana (y de macaco) estimuló la secreción de mIL-17 y mIL-22 de esplenocitos de ratón (Aggarwal *et al.*, 2003, J Biol Chem. 278(3):1910-4). Se demostró que F027500069 bloque la expresión inducida por IL-23 de mIL-22 *ex vivo*. Se retiraron los bazo de 5 ratones C57BL/6, se recogieron los esplenocitos y se preparó una suspensión de células

individuales. Las células se cultivaron en presencia de 20 ng/ml de mL-2 recombinante y se sembraron a 400 000 células/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos. Se preincubaron diluciones seriadas de F027500069 o compuestos de referencia (mAb1 de referencia anti-hIL-23 y mAb2 de referencia anti-hIL-23) con hIL-23 recombinante (36 pM) o IL-23 recombinante de macaco (36 pM) en medio de cultivo durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se incubaron durante otros 3 días con los esplenocitos en presencia de HSA 30  $\mu$ M a 37 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de mL-22 usando ELISA.

Los resultados mostrados en la tabla 7 demuestran que F027500069 inhibía la producción de mL-22 inducida por hIL-23 e IL-23 de macaco de una manera dependiente de la concentración con una CI50 de 43 pM (para IL-23 humana) y 31 pM (para IL-23 de macaco). La inhibición fue más potente que la inhibición por los compuestos de referencia mAb1 de referencia anti-hIL-23 y mAb2 de referencia anti-hIL-23.

#### **6.8 Ejemplo 8: Inhibición por la construcción de ISVD multiespecífica de la activación del promotor de SIE inducida por IL-23 *in vitro***

Se transfectaron de forma estable células Glo response™ HEK293\_humana IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P con una construcción indicadora que contenía el gen de luciferasa bajo el control del promotor sensible a SIE. Además, estas células sobreexpresaban constitutivamente ambas subunidades del receptor de IL-23 humana, es decir, IL-12Rb1 e IL-23R. Tras la activación de estas células por IL-23, se expresó la proteína indicadora luciferasa, que se cuantifica basándose en su actividad enzimática mediante la adición del sustrato, 5'-fluoroluciferina (sistema de ensayo de luciferasa Bio-Glo™).

Las células se cultivaron en medio de cultivo normal y se sembraron a 15 000 células/pocillo en placas blancas de 96 pocillos de histocultivo tratadas con fondo transparente. Se añadieron diluciones seriadas de F027500069 o compuestos de referencia (mAb1 de referencia anti-hIL-23 y mAb2 de referencia anti-hIL-23) a las células, seguido de la adición de hIL-23 recombinante (10 pM) o IL-23 de macaco (40 pM). Las células se incubaron durante 4 horas 15 min a 37 °C en presencia de HSA 30  $\mu$ M. Posteriormente, se añadió Bio-Glo en cada pocillo a las células y se midió la luminiscencia de luciferasa. F027500069

inhibió la señalización dependiente de IL-23 humana y de macaco con una CI50 de 250 pM y 323 pM respectivamente (tabla 7 y figura 3).

**Tabla 7: Valores de CI50 de neutralización mediada por F027500069 de IL-23 humana y de macaco en el ensayo de esplenocitos de ratón y el ensayo indicador Glo response™ de HEK293\_humana IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P, frente a los compuestos de referencia mAb1 de referencia anti-hIL-23 y mAb2 de referencia anti-hIL-23.**

|                                                     | <b>F02750069</b> |                 | <b>mAb1 de referencia anti-hIL-23</b> |                 | <b>mAb2 de referencia anti-hIL-23</b> |                 |
|-----------------------------------------------------|------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|
| <b>antígeno</b>                                     | IL-23 humana     | IL-23 de macaco | IL-23 humana                          | IL-23 de macaco | IL-23 humana                          | IL-23 de macaco |
| <b>CI50 de ensayos de esplenocitos de ratón (M)</b> | 4,34E-11         | 3,07E-11        | 1,55E-10                              | 7,95E-10        | 6,80E-10                              | 4,95E-09        |
| <b>CI50 de ensayo indicador de IL-23 (M)</b>        | 2,50E-10         | 3,23E-10        | 3,23E-10                              | 5,73E-10        | 5,41E-10                              | 7,21E-10        |

### 6.9 Ejemplo 9: Unión de la construcción de ISVD multiespecífica a los anticuerpos preexistentes

Se evaluó la reactividad a los anticuerpos preexistentes de la construcción F027500069 de ISVD en suero humano normal (n = 96) usando 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 migración y los experimentos se realizaron a 25 °C.

Los ISVD se capturaron en el chip mediante unión del componente básico ALB23002 a HSA, que se inmovilizó en el chip. Para inmovilizar HSA, los carriles de ligando de un chip ProteOn GLC Sensor se activaron con EDC/NHS (caudal 30 µl/min) y se inyectó HSA a 100 µl/ml en tampón acetado ProteOn pH 4,5 para hacer que los niveles de inmovilización fueran de aproximadamente 3200 UR. Después de la inmovilización, se desactivaron las superficies con etanolamina HCl (caudal 30 µl/min).

Posteriormente, se inyectaron las construcciones de ISVD durante 2 min a 45 µl/min sobre la superficie de HSA para hacer que el nivel de captura de ISVD fuera de aproximadamente 800 UR. Las muestras que contenían los 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 inyectarlos durante 2 minutos a 45 µl/min seguido de una etapa de disociación posterior de 400 segundos. Después de cada ciclo (es decir, antes de una nueva etapa de captura de ISVD e inyección de muestra de sangre) se regeneraron las superficies de HSA con una inyección de 2 minutos de HCl (100 mM) a 45 µl/min. Se obtuvieron sensogramas que muestran la unión de los anticuerpos preexistentes después de una doble referencia sustrayendo 1) la disociación de ISVD-HSA y 2) la unión no específica al carril de ligando de referencia. Los niveles de unión de los anticuerpos preexistentes se determinaron estableciendo puntos de informe a 125 segundos (5 segundos después del final de la asociación). El porcentaje de reducción en la unión de los anticuerpos preexistentes se calculó con respecto a los niveles de unión a 125 segundos de un ISVD de referencia.

La construcción F027500069 de ISVD tetravalente, optimizada para reducir la unión de los anticuerpos preexistentes mediante la introducción de las mutaciones L11V y V89L en cada componente básico y una alanina carboxiterminal, mostró sustancialmente menos unión a los anticuerpos preexistentes en comparación con una construcción de control F027301099 de ISVD tetravalente no optimizada (tabla 8 y figura 4).

**Tabla 8: Unión de los anticuerpos preexistentes presentes en 96 muestras de suero humano a F027500069 en comparación con la construcción de ISVD de control F027301099**

| ID         | Breve descripción                          | Percentil 25 % | Mediana del nivel de UR | Percentil 75% |
|------------|--------------------------------------------|----------------|-------------------------|---------------|
| F027301099 | 1B11-35GS-ALB23000-35GS-1B11-35GS-6C11     | 47             | 92                      | 350           |
| F027500069 | 6C11-9GS-119A03/1-9GS-ALB23002-9GS-81A12-A | -15            | -8                      | 5             |

La unión de los anticuerpos preexistentes dependía de la valencia y composición de las construcciones multiespecíficas. La tabla 3 y la figura 5 demuestran que la construcción F027500069 mostraba menor reactividad con los anticuerpos preexistentes que las construcciones F027500095 y F027500096.

#### 5    **6.10    Ejemplo 10: Evaluación de F027500069 en el modelo Tg197 de poliartritis transgénico para TNF $\alpha$ humano.**

Se perfiló F027500069 en el modelo de ratón Tg197 de poliartritis progresiva dirigida por TNF (Keffer *at al.*, 1991, EMBO J., 10:4025-4031). En estos ratones, se insertó un gen modificado de TNF $\alpha$  humano como un transgén en ratones. El gen humano se modificó de una manera que hiciera el ARNm transcrito más estable y, por tanto, dio lugar a sobreexpresión de TNF $\alpha$  y una artritis progresiva espontánea en las cuatro patas a una penetración del 100 %. Los signos y síntomas se hacen visibles a aproximadamente las 6 semanas de edad y están en constante aumento hasta que dan lugar a una importante agonía y mortalidad desde aproximadamente 10 semanas de edad en adelante si se dejaban sin tratar. La gravedad de la artritis se evaluó clínicamente mediante un sistema de puntuación como se detalla a continuación:

| PUNTUACIÓN DE ARTRITIS <sup>1</sup> | CARACTERÍSTICAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 / sin enfermedad                  | sin artritis (aspecto normal, el ratón puede sostener su peso ciñéndose a una superficie invertida o inclinada tal como una rejilla de alambre o una tapa de jaula durante un periodo de tiempo, flexibilidad corporal completa/capacidad de evasión normal, fuerza de agarre máxima)                                   |
| 0,5 / enfermedad leve               | aparición de artritis (hinchazón leve de articulaciones, todos los demás parámetros como anteriormente)                                                                                                                                                                                                                 |
| 1 / enfermedad de leve a moderada   | leve a moderada (distorsión de las articulaciones por hinchazón, garras inflamadas, todos los demás parámetros como anteriormente)                                                                                                                                                                                      |
| 1,5 / enfermedad moderada           | artritis moderada (hinchazón de las articulaciones-garras, distorsión + deformación hacia el interior del último dedo, se sostiene brevemente ciñéndose a una superficie invertida o inclinada tal como una rejilla de alambre o una tapa de jaula, flexibilidad corporal completa reducida, fuerza de agarre reducida) |

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 / enfermedad de moderada a grave | artritis de moderada a grave (hinchazón importante de las articulaciones, garras y dedos, deformación de las articulaciones-patas, no se sostiene ciñéndose a una superficie invertida o inclinada tal como una rejilla de alambre o una tapa de jaula, sin flexibilidad corporal completa, sin fuerza de agarre, capacidad de escalada/alimentación afectada, empieza a agitarse cuando intenta moverse, pero logra avanzar) |
| 2,5 / enfermedad grave             | artritis grave (como 2 anterior + deformación de los dedos en las garras delanteras, movimiento alterado del ratón, se agita, aunque no desee moverse)                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 3 / enfermedad muy grave           | artritis muy grave (anquilosis detectada a la flexión y movimiento muy alterado, ratón moribundo, ya no se agita, no puede girar/levantarse fácilmente cuando está inclinado sobre el costado).                                                                                                                                                                                                                               |

<sup>1</sup>Puntuación de artritis como se indica en el eje de ordenadas en la figura 6.

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

Con el propósito de establecer la eficacia dependiente de la dosis, se administraron diferentes dosis de F027500069 mediante inyección intraperitoneal dos veces a la semana de una manera terapéutica a animales de 6 semanas de edad 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 mAb de referencia anti-hTNF $\alpha$  como control positivo para suprimir la artritis. Se administró F027500069 a las tres potencias de dosis diferentes de 1,3 mg/kg de peso corporal, 4 mg/kg y 13,5 mg/kg, respectivamente. El tratamiento se continuó hasta las 11 semanas de edad. Las puntuaciones de artritis clínica se determinaron una vez a la semana. Como se muestra en la figura 6, el tratamiento con F027500069 provocó una supresión dependiente de la dosis de las puntuaciones de artritis clínica a lo largo del tiempo.

Los animales tratados con el anticuerpo de control negativo IgG1 humana desarrollaron una puntuación media de artritis de  $1,099 \pm 0,1071$  en la semana 11. El mAb de referencia anti-hTNF $\alpha$  suprimió totalmente la progresión de la artritis, con una puntuación media de  $0,4844 \pm 0,0594$  en la semana 11. F027500069 redujo la progresión de la artritis hasta la semana 11 con puntuaciones medias de  $0,8047 \pm 0,0929$  (1,3 mg/kg),  $0,7969 \pm 0,0585$  (4 mg/kg) y  $0,6016 \pm 0,0349$  (13,5 mg/kg). La supresión global de la artritis se analizó mediante el área bajo la curva (ABC, figura 7). Todas las dosis de F027500069 suprimieron

significativamente la progresión de la artritis, comparable con el mAb de referencia anti-hTNF $\alpha$  en el modelo de artritis Tg197.

Tras completarse el tratamiento, se procesaron las articulaciones de tobillo de las extremidades posteriores para la histología y las secciones se evaluaron para los signos estructurales de artritis con el siguiente sistema de puntuación:

| CRITERIOS HISTOPATOLÓGICOS ACUMULATIVOS PARA LA PUNTUACIÓN DEL FENOTIPO ARTRÍTICO EN LAS ARTICULACIONES DE TOBILLO |                |                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PUNTUACIÓN <sup>1</sup>                                                                                            | ENFERMEDAD     | CRITERIOS                                                                                                                   |
| 0                                                                                                                  | Normal         | sin patología detectable                                                                                                    |
| 1                                                                                                                  | Leve           | hiperplasia de la membrana sinovial y presencia de infiltrados de polimorfonucleares. Puede estar presente tendinitis leve. |
| 2                                                                                                                  | Moderada       | formación de paño sinovial y tejido fibroso y erosión focal del hueso subcondral                                            |
| 3                                                                                                                  | Moderada-grave | destrucción del cartílago y erosión del hueso                                                                               |
| 4                                                                                                                  | Grave          | amplia destrucción del cartílago y erosión del hueso. Se pierde la estructura general del hueso                             |

<sup>1</sup>Puntuación de artritis como se indica en el eje de ordenadas en la figura 8.

Los resultados de la puntuación histológica se representan en la figura 8. La artritis estructural y la destrucción de articulaciones se suprimieron significativamente por F027500069 a mayores dosis.

En conclusión, los resultados demuestran la supresión dependiente de la dosis de los signos y síntomas de artritis, así como la inhibición de la progresión estructural por F027500069 hasta un grado comparable con el mAb de referencia anti-TNF $\alpha$ .

#### 6.11 Ejemplo 11: Evaluación de F027500069 en el modelo de inflamación cutánea inducida por IL-23 humana.

La inyección intradérmica de IL-23 recombinante en ratones dio lugar a una inflamación cutánea aguda con enrojecimiento es hinchazón alrededor del sitio de la inyección.

Histológicamente, eran visibles las marcas distintivas de inflamación psoriásica de la piel, tales como engrosamiento epidérmico por hiperplasia de queratinocitos, queratosis e infiltración de inmunocitos como linfocitos T y macrófagos. A nivel molecular, los cambios en el transcriptoma en el modelo solapaban en gran medida con los observados en piel humana con lesiones psoriásicas frente a piel normal (Gauld *et al.*, 2018, Journal of Dermatological Science 92:45–53). Por tanto, el modelo de inflamación cutánea por IL-23 se parece a un modelo del mecanismo de psoriasis.

Para investigar la inhibición de la inflamación mediada por IL-23, se ensayó F027500069 en el modelo de inflamación cutánea adaptado de Rizzo *et al.*, 2011, J Immunol; 186:1495-1502. Se inyectó por vía intradérmica 1 µg de IL-23 humana recombinante en un volumen total de 20 en el día 1, 2, 3 y 4 en la oreja derecha de ratones C57BL/6 hembra. Se inyectó PBS como control en las orejas de un grupo de ratones. Se midió el engrosamiento de la piel de la oreja diariamente con calibres. F027500069 y los compuestos de control se administraron en el día 1 y 3 por inyección intraperitoneal. En el día 5, se sacrificó a los ratones, y se tomó una biopsia de perforación de piel. La biopsia se homogeneizó en PBS complementado con mezcla de inhibidores de proteasa, y se determinaron los niveles de citocina efectora IL-22 anterógrada.

Con el propósito de establecer la eficacia dependiente de la dosis, se administraron diferentes dosis de la construcción de ISVD por inyección intraperitoneal dos veces a la semana: de una manera terapéutica a animales de 6 semanas de edad con signos y síntomas visibles de artritis (n = 10 animales por grupo). Se usó IgG1 humana purificada de suero de mieloma humano (BioXcell #BE0297) como control negativo, y se usó mAb1 de referencia anti-hIL-23 como control positivo para suprimir la inflamación cutánea. Se administró F027500069 a las cuatro potencias de dosis diferentes de 0,13 mg/kg de peso corporal, 0,4 mg/kg, 1 mg/kg y 4 mg/kg, respectivamente. Como se muestra en la figura 9, el tratamiento con F027500069 provocó una supresión dependiente de la dosis de la hinchazón de la piel, representada como el cambio en el grosor de la oreja desde la medida inicial en el día 5.

Se tomaron biopsias de piel en el día 5 y se prepararon homogeneizados de tejido. Se midieron los niveles de IL-22 murina utilizando el kit de ensayo de IL-22 de ratón Mesoscale Discovery V-plex (#K152WVD, figura 10). La administración de IL-23 dio lugar a niveles medibles de IL-22, ya que todas las muestras de la piel a la que se inyectó PBS estaban por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) del ensayo empleado. Todas las dosis de F027500069, así como mAb1 de referencia anti-hIL-23 suprimieron significativamente el nivel de IL-22 en el tejido (para el grupo de dosis de 1 mg/kg, no se determinaron niveles de IL-22).

Además, se evaluó la viabilidad de la administración subcutánea en otro experimento en el modelo de inflamación cutánea inducida por IL-23. Se administraron dos dosis de F027500069 (0,1 mg/kg y 1 mg/kg) en el día 1 y el día 3 como inyección intraperitoneal o subcutánea, y se obtuvo el cambio en el grosor de la oreja (figura 11). En este experimento, se usó una dosis de 1 mg/kg de un  $V_{HH}$  no relacionado como control negativo (Nab ctrl), y se usó una dosis de 3 mg/kg de mAb1 de referencia anti-hIL-23 (IP) como control positivo.

Además, se midió el nivel de IL-22 en el tejido de homogeneizados de biopsia de piel del día 5 (figura 12).

En conclusión, los resultados demuestran la supresión de la inflamación cutánea inducida por IL-23 tanto en el engrosamiento de la piel, como también en el nivel de citocina efectora en el tejido. Son factibles tanto la vía de administración intraperitoneal, como también la subcutánea.

#### **6.12 Ejemplo 12: Evaluación de F027500069 en el modelo de artritis inducida por anticuerpos contra colágeno en ratones de inserción de $TNF\alpha$ /TNFR1 humano.**

Se perfiló F027500069 en el modelo de artritis inducido por anticuerpos contra colágeno (CAIA) en ratones patentados donde los locus génicos tanto de  $TNF\alpha$  como también del receptor 1 de TNF (TNFR1) se remplazaron por los locus génicos humanos respectivos.

A 8 animales por grupo se les inyectó en día 0 8 mg de una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos contra colágeno 2 de cartílago (ArthritoMab, MDbioscience, CIA-MAB-2C). En el día 1, se activó el desarrollo de artritis por inyección de 25  $\mu$ g de

lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Los compuestos de ensayo se administraron como una sola inyección una vez a las 6 horas después de la inyección de LPS. Se evaluó el desarrollo de signos y síntomas de artritis diariamente hasta el día 7, basándose en una puntuación de artritis como se detalla a continuación:

| PUNTUACIÓN DE ARTRITIS <sup>1</sup>                                                                                                                                            | CARACTERÍSTICAS                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                                                                                                                                                                              | Sin signos o síntomas clínicos                                                                      |
| 1                                                                                                                                                                              | Hinchazón leve de la articulación del tobillo y el carpo.                                           |
| 2                                                                                                                                                                              | Hinchazón moderada de la articulación del tobillo y el carpo; afectación de los dedos. Eritema leve |
| 3                                                                                                                                                                              | Hinchazón grave de la garra completa, incluyendo los dedos. Eritema grave.                          |
| Cada extremidad se puntúa por separado de 0 a 3, siendo la puntuación de artritis total la suma de puntuaciones de las 4 extremidades con una puntuación de suma máxima de 12. |                                                                                                     |

5 <sup>1</sup>Puntuación de artritis como se indica en el eje de ordenadas en la figura 13.

Se administró F027500069 a 1,3 mg/kg de peso corporal, se administró control positivo mAb de referencia anti-hTNF $\alpha$  a 0,5 mg/kg. La figura 13 muestra el desarrollo de signos y síntomas de artritis a lo largo del tiempo. Una sola administración preventiva de F027500069 o mAb de referencia anti-hTNF $\alpha$  provocó la supresión completa de desarrollo de artritis.

10

### 6.13 Ejemplo 13: Evaluación de F027500069 en el modelo de inflamación cutánea inducida por IL-23 humana en ratones de inserción de TNF $\alpha$ humano.

Como F027500069 solamente se une e inhibe dianas humanas o de primate (tanto IL-23 como TNF $\alpha$ ), se repitió la inflamación cutánea inducida por IL-23 humana en ratones humanizados para TNF $\alpha$ . En esta cepa patentada, el locus genómico completo de TNF $\alpha$  en ratones se reemplazó por el locus génico humano. La estructura de exones-intrones y los elementos reguladores están conservados entre ratón y ser humano. Se ha evaluado de antemano la expresión fiel, así como la competencia funcional de TNF $\alpha$  humano para provocar respuestas en los ratones.

15

La inyección intradérmica de hIL-23 dio lugar a un aumento moderado en la expresión de TNF $\alpha$  (datos propios y Gauld *et al.* 2018, Journal of Dermatological Science 92:45–53). Se administraron dosis equimolares de F027500069 y los componentes básicos ISVD monoespecíficos correspondientes F027500101 (anti-TNF $\alpha$ ) y F027500017 (anti-IL-23) en este modelo para abordar los posibles efectos aditivos de la doble dirección. La potencia de dosis administrada fue 3,6 nmol/kg, correspondiente a aproximadamente 0,1 mg/kg. Esta baja dosis se eligió para permitir que quedara algo de IL-23 libre y, por tanto, la secreción anterógrada de TNF $\alpha$ . Además, se administraron dosis altas de F027500069, así como mAb1 de referencia anti-hIL-23 como controles positivos. El cambio en el grosor de la oreja se normalizó a los controles alto (control negativo Nab) y bajo (sin inyección de IL-23) (muestra menos control bajo dividido por control alto menos control bajo). La figura 14 ilustra los resultados. La inhibición de TNF $\alpha$  monoespecífica con 3,6 nmol/kg de F027500101 no inhibió la hinchazón de la piel, mientras que la inhibición de IL-23 monoespecífica con 3,6 nmol/kg de F027500017 tuvo un efecto moderado, pero significativo. La dirección doble tanto de TNF $\alpha$  como de IL-23 con 3,6 nmol/kg de F027500069 dio lugar a una supresión numéricamente superior de la hinchazón de la piel.

Se tomaron biopsias de piel en el día 5 y se preparó el ARNm usando métodos convencionales. El ARNm se sometió a secuenciación de todo el transcriptoma en masa, con extremos emparejados en una plataforma Illumina NovaSeq™ 6000. Se analizaron genes expresados de forma diferencial frente a NAb ctrl (DEG, factor de cambio > 2 a  $p < 0,001$ ) para el solapamiento entre los grupos de tratamiento. Como se muestra en la figura 15, a pesar del gran solapamiento de los grupos de tratamiento monoespecífico con el grupo de tratamiento multiespecífico, aún 199 de los 769 DEG eran específicos para el tratamiento con F027500069. Esto indica que la dirección doble tanto de TNF $\alpha$  como de IL-23 en este modelo dio lugar a una respuesta molecular única y mejora posiblemente sinérgica de la enfermedad humana.

En conclusión, los resultados demuestran que la inhibición multiespecífica tanto de IL-23 como de TNF $\alpha$  en la inflamación cutánea inducida por IL-23 dio lugar a efectos

numéricamente aditivos sobre el engrosamiento de la piel y provocó un perfil transcriptómico único.

## **7 Aplicabilidad industrial**

5 Los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico que codifican los mismos, vectores que comprenden los ácidos nucleicos y composiciones descritas en la presente memoria pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento, tal como tratamiento de sujetos que padecen enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, artritis psoriásica o hidradenitis supurativa.