

ANTICUERPO MULTIESPECIFICO
CON ESPECIFICIDAD DE UNIÓN PARA IL-13 E IL-17 HUMANAS

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que tiene especificidad por IL-13 humana, IL-17A y/o IL-17F humana. La invención se refiere además a métodos para producir el anticuerpo multiespecífico y a su uso terapéutico para el tratamiento de la dermatitis atópica y otras enfermedades.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La dermatitis atópica (DA), también conocida como eczema atópico, es una enfermedad inflamatoria que resulta en una piel intensamente pruriginosa, enrojecida, hinchada, supurante y agrietada que a menudo se engrosa con el tiempo.

15

Desde principios del siglo XX, muchos trastornos inflamatorios de las mucosas se han vuelto más comunes; la dermatitis atópica es un ejemplo clásico de tal enfermedad. En la actualidad afecta al 15-30 % de los niños y al 2-10 % de los adultos en los países desarrollados y en los Estados Unidos casi se ha triplicado en los últimos treinta a cuarenta años. Más de 15 millones de adultos y niños estadounidenses tienen dermatitis atópica.

20

Los tratamientos utilizados para la dermatitis atópica incluyen inmunosupresores sistémicos tales como ciclosporina, metotrexato, interferón gamma, micofenolato, mofetilo y azatioprina. Se pueden usar antidepresivos y naltrexona para controlar el prurito (picazón). En 2016, se aprobó el fármaco crisaborol, un inhibidor de la fosfodiesterasa-4, para el eccema leve a moderado, y en 2017, se aprobó el fármaco dupilumab, un antagonista de anticuerpos monoclonales de IL-4R α , para tratar el eccema moderado a severo.

25

Debido a las limitaciones de los medicamentos existentes, existe una gran necesidad de mejorar el tratamiento de la dermatitis atópica.

30

WO2013/102042A2 (Abbvie) describe las proteínas de unión específicas duales dirigidas contra IL-13 e IL-17 y su uso potencial en el tratamiento de una lista extensa de enfermedades. Las proteínas de unión no avanzaron hacia el desarrollo clínico.

35

WO2015/127405A2 (Genentech) describe los anticuerpos biespecíficos anti-IL-13/IL-17 y los métodos para su uso en el tratamiento del asma de moderada a grave y/o el asma eosinofílica. En un ensayo clínico de fase I, BITS7201A se asoció con una alta incidencia de anticuerpos anti-fármacos (ADA) y se retiró del desarrollo clínico.

5

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un anticuerpo multiespecífico mejorado capaz de unirse a IL-13 humana, IL-17A humana y/o IL-17F humana.

10

Los anticuerpos de la presente invención tienen propiedades mejoradas en comparación con los anticuerpos actualmente disponibles, por ejemplo, menor inmunogenicidad y/o mejores perfiles farmacocinéticos. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden diseñarse de manera que se puedan purificar de manera más eficiente utilizando un método de purificación mejorado que comprende menos pasos que los métodos

15 actualmente disponibles, el cual es costo y tiempo efectivo a escala industrial. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden tener una capacidad de fabricación mejorada.

20 La invención proporciona además:

- ❖ Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo multiespecífico.
- ❖ Un vector de expresión que porta el polinucleótido.
- ❖ Una célula huésped que comprende el vector.
- ❖ Un método para producir el anticuerpo multiespecífico que comprende cultivar la
- 25 célula huésped y recuperar el anticuerpo producido.
- ❖ Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico.
- ❖ Un anticuerpo multiespecífico o una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- ❖ Un método para tratar o prevenir la dermatitis atópica, eccema crónico de manos,
- 30 micropoliposis o poliposis nasal, alergia alimentaria o esofagitis eosinofílica, comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo multiespecífico o la composición farmacéutica a un paciente que lo necesite.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

35

Figura 1.

Alineaciones de humanización Ab650.

Alineaciones de las secuencias de la región V del anticuerpo de rata (donante) con las secuencias de la región V de la línea germinal humana (aceptor), junto con las secuencias humanizadas diseñadas.

(A) Injerto de la cadena ligera 650:

5 650 = secuencia de cadena ligera variable de rata.

650gL8 = injerto humanizado de cadena ligera variable 650 utilizando la línea germinal humana IGKV1-39 como el marco aceptor.

Las CDR se muestran en negrita/subrayadas.

Los residuos de donantes se muestran en negrita/cursiva y están resaltados: I58 y Y71.

10 (B) Injerto de cadena pesada 650:

650 = secuencia de cadena pesada variable de rata.

650gH9 = injerto humanizado de cadena pesada variable 650 utilizando la línea germinal humana IGHV1-69 como el marco aceptor.

Las CDR se muestran en negrita/subrayadas.

15 Los residuos de donantes se muestran en negrita/cursiva y están resaltados: A67, F69 y V71.

Figura 2.

Aminoácidos y secuencias de ADN.

20

Figura 3.

Purificación de un anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.

(A) Análisis BEH200 SEC-UPLC de anticuerpo multiespecífico purificado, detección por FLR.

25 (B) Muestras de proteínas separadas por Tris-glicina SDS-PAGE en condiciones no reductoras (carril 1) o reductoras (carril 2). El gel se tiñó con tinción rápida de Coomassie y se destiñó en dH₂O. Se usaron marcadores de proteínas Mark 12 (Life Technologies) como estándares (M). Los pesos moleculares (MW) se midieron en kilodaltons (kDa).

Figura 4.

Inhibición de la señalización de STAT6 por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.

Figura 5.

35 (A) Inhibición de la producción de IL-6 por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF, en respuesta a IL-17A humana o de *Cynomolgus* en combinación con TNF- α . (i) IL-17A humana. (ii) IL-17A de *Cynomolgus*.

(B) Inhibición de la producción de IL-6 por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF, en respuesta a IL-17F humana o de *Cynomolgus* en combinación con TNF- α . (i) IL-17F humana. (ii) IL-17F de *Cynomolgus*.

5 Figura 6.

Neutralización simultánea de IL-13, IL-17A e IL-17F por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF en un bioensayo de liberación NHEK CXCL1.

Clave:

círculo = anti-IL-13/IL-17AF

10 cuadrado = anti-IL-17A

triángulo que apunta hacia arriba = anti-IL-17F

triángulo que apunta hacia abajo = anti-IL-13

Figura 7.

15 Ilustración esquemática de un anticuerpo IL-13/IL-17AF multiespecífico según la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20

IL-13

IL-13 es una citocina de cadena corta que comparte un 25 % de identidad de secuencia con IL-4. Esta comprende aproximadamente 132 aminoácidos, formando una estructura

25 secundaria de cuatro hélices que abarcan los residuos 10-21 (hélice A), 43-52 (hélice B), 61-69 (hélice C) y 92-110 (hélice D), junto con dos cadenas β que abarcan los residuos 33-36 y 87-90. La estructura de la solución de IL-13 ha sido resuelta, revelando la conformación predicha de haz de cuatro hélices arriba-arriba-abajo-abajo que también se observa con IL-4. (Eisenmesser 2001).

30

La IL-13 humana es una glicoproteína de 17 kDa y es producida por células T activadas del linaje Th2, aunque las células T CD4⁺ Th0 y Th1, las células T CD8⁺ y varias poblaciones de células no T, tales como mastocitos, también producen IL-13. Las funciones de IL-13 incluyen el cambio de isotipo de inmunoglobulina a IgE en células B humanas y la supresión

35 de la producción de citoquinas inflamatorias tanto en humanos como en ratones.

IL-13 se une a sus receptores de superficie celular, IL-13R-alfa1 e IL-13R-alfa2. IL-13R-alfa1 interactúa con IL-13 con una baja afinidad ($K_D \sim 10$ nM), seguido del reclutamiento de IL-4R-alfa para formar un complejo receptor heterodimérico de señalización de alta afinidad ($K_D \sim 0,4$ nM).

5

El complejo IL-4R/IL-13R-alfa1 se expresa en muchos tipos de células, tales como células B, monocitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales de las vías respiratorias y células musculares lisas de las vías respiratorias. La unión del complejo del receptor IL-13R-alfa/IL-4R resulta en la

10 activación de una variedad de vías de transducción de señales, incluidas las vías del transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) y del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2).

La cadena IL-13R-alfa2 sola tiene una alta afinidad por IL-13 ($K_D \sim 0,25-0,4$ nM). Esta

15 funciona tanto como un receptor señuelo que regula negativamente la unión de IL-13 y como un receptor de señalización que induce la síntesis de TGF- β y la fibrosis a través de la vía AP-1 en macrófagos y posiblemente en otros tipos de células.

La IL-13 está implicada en la patogénesis de muchos trastornos humanos y se han

20 diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de IL-13. En particular, se han buscado anticuerpos que se unan a IL-13 y la neutralicen como un medio para inhibir la actividad de IL-13. Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de anticuerpos adecuados y/o mejorados capaces de unirse a IL-13, especialmente a la IL-13 humana y, en particular, anticuerpos que sean capaces de neutralizar la IL-13 humana.

25

La presente invención proporciona una nueva familia de proteínas de unión, anticuerpos CDR injertados, anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos, capaces de unirse a IL-13 humana, unirse con alta afinidad y unirse y neutralizar la IL-13 humana.

30 Los anticuerpos que inhiben la actividad de IL-13 pueden operar a través de varios mecanismos de acción posibles. Bin 1 representa un anticuerpo que se une a la IL-13 humana y previene la unión de IL-13R α 1 y, como resultado, también bloquea la unión de IL-4R. Los anticuerpos bin 1 también pueden evitar la unión de IL-13 a IL-13R α 2. Bin 2 representa un anticuerpo que se une a hIL-13 de tal manera que permite la unión a IL-

35 13R α 1 pero evita el reclutamiento de IL-4R en el complejo. Se seleccionaron anticuerpos que operaban a través de bin 1.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-13 humana y evita la unión de IL-13R α 1.

- 5 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-13 humana y evita la unión de IL-13R α 2.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-13 humana y evita la unión de IL-13R α 1 y IL-13R α 2.

10

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-13 humana con una K_D <100 pM.

IL-17

15

La familia de citoquinas IL-17 consta de 6 miembros basados en similitudes estructurales, con una masa molecular de 23-36 kDa y una estructura de dímero. El miembro fundador IL-17A (a menudo denominado en la literatura simplemente como IL-17) comparte entre un 16 % y un 50 % de identidad de secuencia de aminoácidos con otros miembros: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también conocida como IL-25) e IL-17F. IL-17A e IL-17F comparten la mayor homología (50%) y se unen al mismo complejo receptor, por lo que se han observado actividades biológicas compartidas entre estas 2 citoquinas. Además, IL-17A e IL-17F existen no solo como homodímeros, sino también como heterodímeros de IL-17A/F. IL-17E (IL-25) tiene la menor similitud con IL-17A. De importancia y relevancia para la actividad biológica de IL-17A e IL-17F es el hallazgo de que comparten el mismo complejo receptor IL-17RA/IL-17RC, donde IL-17A tiene la mayor afinidad por IL-17RA, mientras que IL-17F se une más fuertemente a IL-17RC. El otro miembro de la familia que utiliza IL-17RA es IL-17E, que emite señales a través del complejo receptor IL-17RA/IL-17RB.

20

25

30

IL-17A e IL-17F son producidas por el subconjunto Th17 de células T CD4+. Además, otros subconjuntos de células T producen IL-17A e IL-17F, incluidas las células T CD8+ citotóxicas (Tc17), las células gdT y las células T NK. Otras poblaciones de células que se ha informado que secretan IL-17A incluyen neutrófilos, monocitos, células NK, células tipo inductoras de tejido linfoide (tipo LTi), células de Paneth intestinales e incluso células B y mastocitos. Además, se ha informado que las células epiteliales secretan IL-17F.

35

Los tipos de células que responden a las citoquinas IL-17 se reflejan en la expresión de los diferentes receptores. IL-17RA se expresa de manera ubicua, con niveles particularmente altos en tejidos hematopoyéticos, mientras que IL-17RC se expresa más en células no inmunes de articulaciones, hígado, riñón, tiroides y próstata. Esta expresión diferencial

5 podría explicar las diferencias en la actividad biológica de IL-17A e IL-17F, ya que las células que expresan altos niveles de IL-17RC podrían responder más a IL-17F, mientras que las células con mayor expresión de IL-17RA que IL-17RC pueden responder más fácilmente a IL-17A. Los tipos de células específicas que responden a IL-17A y F incluyen fibroblastos, células epiteliales, queratinocitos, sinoviocitos y células endoteliales; también

10 se ha informado que IL-17A actúa sobre las células T y B y macrófagos.

El anticuerpo multiespecífico de la presente invención es capaz de unirse a IL-17A y/o IL-17F humana. Por tanto, el anticuerpo puede unirse al homodímero IL-17A, al homodímero IL-17F y/o al heterodímero IL-17AF.

15 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-17A humana. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-17F humana. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-17A e IL-17F humanas.

20 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-17A humana con una K_D de <50 pM. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-17A humana con una K_D de <25 pM. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-17A humana con una K_D de <10 pM.

25 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-17F humana con una K_D de <200 pM. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a IL-17F humana con una K_D de <100 pM.

Albúmina

30 La alta especificidad y afinidad de los anticuerpos los convierte en agentes de diagnósticos y terapéuticos ideales, particularmente para modular las interacciones proteína:proteína. Sin embargo, los anticuerpos pueden sufrir una mayor tasa de aclaramiento del suero, especialmente cuando carecen del dominio Fc que imparte una larga vida in vivo (Medasan

35 *et al.*, 1997, J. Immunol. 158:2211-2217).

Se conocen medios para mejorar la vida media de los anticuerpos. Un enfoque ha sido conjugar el fragmento con moléculas de polímero. Por lo tanto, la vida media corta en circulación de los fragmentos Fab', F(ab')₂ en animales se ha mejorado por conjugación con polietilenglicol (PEG; ver, por ejemplo, WO98/25791, WO99/64460 y WO98/37200). Otro enfoque ha sido modificar el fragmento de anticuerpo por conjugación con un agente que interactúa con el receptor FcRn (ver, por ejemplo, WO97/34631). Otro enfoque más para extender la vida media ha sido usar polipéptidos que se unen a la albúmina sérica (ver, por ejemplo, Smith *et al.*, 2001, Bioconjugate Chem. 12:750-756; EP0486525; US6267964; WO04/001064; WO02/076489; y WO01/45746).

La albúmina sérica es una proteína abundante tanto en los compartimentos vasculares como extravasculares con una vida media en seres humanos de aproximadamente 19 días (Peters, 1985, Adv Protein Chem. 37:161-245). Esto es similar a la vida media de IgG1, que es de 21 días aproximadamente (Waldeman & Strober, 1969, Progr. Allergy, 13:1-110).

Se han descrito dominios variables únicos de unión a antialbúmina sérica junto con su uso como conjugados para aumentar la vida media de fármacos, incluidos fármacos, proteínas y péptidos NCE (entidad química), ver, por ejemplo, Holt *et al.*, Protein Engineering, Design & Selection, vol 21, 5, pp283-288, WO04003019, WO2008/096158, WO05118642, WO2006/0591056 y WO2011/006915. Otros anticuerpos de antialbúmina sérica y su uso en formatos de anticuerpos multiespecíficos se han descrito en los documentos WO2009/040562, WO2010/035012 y WO2011/086091. En particular, se ha descrito previamente un anticuerpo antialbúmina con humanización mejorada en el documento WO2013/068571.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención pueden diseñarse para unirse a la albúmina sérica humana, con el fin de prolongar su vida media sérica in vivo, dando como resultado perfiles farmacocinéticos mejorados.

Anticuerpos

Los anticuerpos para su uso en el contexto de la presente descripción incluyen anticuerpos completos y fragmentos funcionalmente activos de los mismos, es decir, moléculas que se unen específicamente a IL-13, IL-17A y/o IL-17F, también denominadas fragmentos de unión a antígeno. Las características descritas en este documento con respecto a los anticuerpos también se aplican a los fragmentos de anticuerpos a menos que el contexto indique lo contrario.

Los anticuerpos completos, también conocidos como "inmunoglobulinas (Ig)", generalmente se relacionan con anticuerpos intactos o de longitud completa, es decir, que comprende los elementos de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, interconectadas por enlaces de disulfuro, que se ensamblan para definir una estructura tridimensional característica en forma de Y. Los anticuerpos completos naturales clásicos son monoespecíficos debido a que se unen a un tipo de antígeno y bivalentes debido a que tienen dos dominios de unión a antígeno independientes. Los términos "anticuerpo intacto", "anticuerpo de longitud completa" y "anticuerpo completo" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo bivalente monoespecífico que tiene una estructura similar a la estructura de un anticuerpo nativo, incluida una región Fc como se define aquí.

Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H) constituida por tres dominios constantes CH_1 , CH_2 y CH_3 , o cuatro dominios constantes CH_1 , CH_2 , CH_3 y CH_4 , dependiendo en la clase Ig. La "clase" de una Ig o anticuerpo se refiere al tipo de región constante e incluye IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas se pueden dividir en subclases, p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Las regiones V_H y V_L del anticuerpo según la presente invención se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad (o "regiones hipervariables") que determinan el reconocimiento del antígeno, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más estructuralmente conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las CDR y la FR juntas forman una región variable. Por convención, las CDR en la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se denominan CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y en las regiones variables de cadena ligera se denominan CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Están numeradas secuencialmente en la dirección del extremo N al extremo C de cada cadena.

Las CDR se numeran convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1991, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., NIH, EE. UU. (En lo sucesivo "Kabat *et al.*, (supra)"). Este sistema de numeración se usa en la presente especificación excepto donde se indique lo contrario.

Las designaciones de residuos de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia lineal y real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat, correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, ya sea una región marco o región determinante de complementariedad, de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

Las CDR del dominio variable de la cadena pesada están ubicadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 hasta el residuo 32. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, 'CDR-H1' como se emplea en el presente documento se refiere a los residuos 26 a 35, como se describe mediante una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucle topológico de Chothia.

Las CDR del dominio variable de cadena ligera se ubican en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración de Kabat.

Además de los bucles de CDR, existe un cuarto bucle entre CDR-2 (CDR-L2 o CDR-H2) y CDR-3 (CDR-L3 o CDR-H3) que está formado por el marco 3 (FR3). El sistema de numeración de Kabat define el marco 3 como las posiciones 66-94 en una cadena pesada y las posiciones 57-88 en una cadena ligera.

Con base en la alineación de secuencias de diferentes miembros de la familia de las inmunoglobulinas, se han propuesto esquemas de numeración y se describen, por ejemplo, en Kabat *et al.*, 1991 y Dondelinger *et al.*, 2018, *Frontiers in Immunology*, Vol 9, artículo 2278.

Los términos "dominio(s) constante(s)", "región constante", tal como se usan en el presente documento, se usan indistintamente para referirse al dominio o dominios de un anticuerpo que está fuera de las regiones variables. Los dominios constantes son idénticos en todos los anticuerpos del mismo isotipo pero son diferentes de un isotipo a otro. Normalmente, la región constante de una cadena pesada está formada, de N a C terminal, por CH₁-bisagra-CH₂-CH₃- opcionalmente CH₄, que comprende tres o cuatro dominios constantes.

Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo de la presente invención, de existir, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que pueden ser necesarias. Por ejemplo, los dominios constantes pueden ser dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, pueden usarse dominios constantes de IgG humana, especialmente de isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Como alternativa, se pueden usar los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Se apreciará que también pueden usarse variantes de secuencia de estos dominios constantes. Por ejemplo, las moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 (numerada según el sistema de numeración de Kabat) se ha cambiado por prolina como se describe en Angal *et al.* (Angal *et al.*, 1993. Una única sustitución de aminoácido anula la heterogeneidad del anticuerpo (IgG4) ratón/humano quimérico observada

durante el análisis de SDS-PAGE Mol Immunol 30, 105-108) y denominado aquí IgG4P, pueden usarse.

"Fc", "fragmento Fc", "dominio Fc" y "región Fc" se usan indistintamente para referirse a la región de extremo C de un anticuerpo que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios constantes, CH₂ y CH₃, de IgA, IgD e IgG, o los últimos tres dominios constantes de IgE e IgM, y la bisagra flexible de extremo N de estos dominios. La región Fc de la cadena pesada de IgG1 humana se define aquí para comprender los residuos C226 hasta su extremo carboxilo, aunque la numeración es según el índice EU como en Kabat. En el contexto de IgG1 humana, la bisagra inferior se refiere a las posiciones 226-236, el dominio CH₂ se refiere a las posiciones 237-340 y el dominio CH₃ se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat. La región Fc

correspondiente de otras inmunoglobulinas puede identificarse mediante alineaciones de secuencias.

En el contexto de la presente descripción, cuando está presente, la región constante o la región Fc pueden ser naturales, como se define anteriormente, o bien pueden estar modificadas de varias maneras, siempre que comprenda un dominio de unión a FcR funcional, y preferiblemente un dominio de unión a FcRn funcional. Preferiblemente, la región constante modificada o la región Fc conducen a mejorar las funcionalidades y/o la farmacocinética. Las modificaciones pueden incluir la eliminación de ciertas partes del fragmento Fc. Las modificaciones pueden incluir además varias sustituciones de aminoácidos capaces de afectar las propiedades biológicas del anticuerpo. También pueden estar presentes las mutaciones para aumentar la unión de FcRn y, por lo tanto, la vida media *in vivo*. Las modificaciones pueden incluir además modificaciones en el perfil de glicosilación del anticuerpo. El fragmento Fc natural está glicosilado en el dominio CH₂ con la presencia, en cada una de las dos cadenas pesadas, de un N-glucano unido al residuo de asparagina en la posición 297 (Asn297). En el contexto de la presente divulgación, el anticuerpo puede ser glicomodificado, es decir, modificado para tener un perfil de glicosilación particular, que, por ejemplo, conduce a propiedades mejoradas, p. ej., función efectora mejorada, o vida media sérica mejorada.

Los anticuerpos descritos en este documento están aislados. Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado (p. ej., mediante medios de purificación) de un componente de su entorno natural.

El término "anticuerpo" abarca anticuerpos monovalentes, es decir, anticuerpos que comprenden solo un dominio de unión a antígeno (p. ej., anticuerpos de un solo brazo que comprenden una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa interconectadas, también denominadas "semianticuerpo"), y anticuerpos multivalentes, es decir, anticuerpos que comprenden más de un dominio de unión a antígeno.

El término "anticuerpo" según la invención también abarca fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos. Los fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos incluyen anticuerpos de cadena sencilla (p. ej., scFv y dsscFv), Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único o nanocuerpos (p. ej., V_H o V_L, o V_{HH} o V_{NAR}). Otros fragmentos de anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab'

descritos en las solicitudes de patente internacional WO2011/117648, WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171.

Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

El término "fragmento Fab" tal como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio V_L (ligero variable) y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio V_H (pesado variable) y un primer dominio constante (CH_1) de una cadena pesada.

Un "fragmento Fab" típico comprende un par de cadenas pesada y ligera en el que la cadena pesada comprende una región variable V_H , un dominio constante CH_1 y una región bisagra natural o modificada y la cadena ligera comprende una región variable V_L y un dominio constante CL. Los dímeros de un Fab' según la presente divulgación crean un $F(ab')_2$ donde, por ejemplo, la dimerización puede ser a través de la bisagra.

El término "anticuerpo de dominio único", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo monomérico variable. Los ejemplos de anticuerpos de un solo dominio incluyen V_H o V_L o V_HH o V-NAR.

El término "Fv" se refiere a dos dominios variables, por ejemplo, dominios variables cooperativos, como un par afín o dominios variables madurados por afinidad, es decir, un par V_H y V_L .

"Fragmento variable de cadena única" o "scFv", como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento variable de cadena única, que comprende o consiste en un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que está estabilizado por un conector peptídico entre los dominios variables V_H y V_L . Los dominios variables V_H y V_L pueden estar en cualquier orientación adecuada, por ejemplo, el extremo C de V_H puede estar unido al extremo N de V_L o el extremo C de V_L puede estar unido al extremo N de V_H .

"Fragmento variable monocatenario estabilizado con disulfuro" o "dsscFv", como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento variable monocatenario que está estabilizado por un conector peptídico entre los dominios variables V_H y V_L y que también

incluye un enlace disulfuro inter-dominio entre V_H y V_L . (ver por ejemplo, Weatherill *et al.*, Protein Engineering, Design & Selection, 25 (321-329), 2012, WO2007109254.

"Fragmento variable estabilizado con disulfuro" o "dsFv", como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento variable de cadena única que no incluye un enlazador peptídico entre los dominios variables V_H y V_L y, en cambio, está estabilizado por un enlace disulfuro inter-dominio entre V_H y V_L .

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico de la presente invención es un anticuerpo antagonista. Como se usa aquí, el término "anticuerpo antagonista" describe un anticuerpo que es capaz de inhibir o neutralizar la actividad de señalización biológica de uno o más antígenos, por ejemplo, bloqueando la unión o reduciendo la unión de IL-13, IL-17A y/o IL-17F a sus receptores.

Los anticuerpos para uso en la presente invención pueden ser, entre otros, anticuerpos monoclonales, humanizados, totalmente humanos o quiméricos.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, como la técnica de la hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica de la hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de hibridoma EBV (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, págs. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos también se pueden generar utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos únicos clonando y expresando ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos únicos seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93(15):7843-7848; WO92/02551; WO2004/051268 y Número de Solicitud de Patente Internacional WO2004/106377.

El cribado de anticuerpos se puede realizar utilizando ensayos para medir la unión a un antígeno y/o ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión de un antígeno a uno o más de sus receptores. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, por ejemplo, utilizando una proteína de fusión de IL-13, que se inmoviliza en placas, y empleando un anticuerpo secundario conjugado para detectar el anticuerpo anti-IL-13 unido a la IL-13. Un ejemplo de un ensayo de bloqueo es un ensayo basado en citometría de flujo que mide el bloqueo de la unión de la proteína del ligando de IL-13 a un IL-13R. Se utiliza un anticuerpo

secundario marcado con fluorescencia para detectar la cantidad de unión de la proteína del ligando de IL-13 al IL-13R.

Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos injertados con CDR) son moléculas de anticuerpo que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (ver, p. ej., US 5,585,089; WO91/09967). Se apreciará que solo pueda ser necesario transferir los residuos determinantes de especificidad de las CDR en lugar de la CDR completa (ver, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden comprender de manera adicional opcionalmente uno o más residuos marco derivados de la especie no humana de la que se derivaron las CDR.

Los anticuerpos quiméricos están compuestos por elementos derivados de dos especies diferentes, de modo que el elemento conserva las características de la especie de la que se deriva. Generalmente, un anticuerpo quimérico comprenderá una región variable de una especie, por ejemplo, un ratón, rata, conejo o una región similar y constante de otra especie, como un ser humano.

Los anticuerpos también se pueden generar usando varios métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman *et al.* (en J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames *et al.* (J. Immunol. Métodos, 1995, 184:177-186), Kettleborough *et al.* (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic *et al.* (Gene, 1997 187 9-18), Burton *et al.* (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) y WO 90/02809; documento WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; documento WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (si están presentes) de las cadenas pesada y ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, pero no necesariamente del mismo anticuerpo. Ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante los métodos de fagos mostrados descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que la variable de inmunoglobulina murina y, opcionalmente, los genes de la región constante han sido reemplazados por sus equivalentes humanos, p. ej., como se describe en términos generales en EP 0546073 US 5,545,806 US 5,569,825 US 5,625,126 US 5,633,425 US 5,661,016

EP 0438474 y EP 0463151.

Anticuerpos multi-específicos

5 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo multiespecífico. "Anticuerpo multiespecífico o multi-específico" como se emplea en el presente documento se refiere a un anticuerpo como se describe en el presente documento que tiene al menos dos dominios de unión, es decir, dos o más dominios de unión, por ejemplo, dos o tres dominios de unión, en donde los al menos dos dominios de unión se unen independientemente a dos antígenos
10 diferentes o dos epítomos diferentes en el mismo antígeno. Los anticuerpos multi-específicos son generalmente monovalentes para cada especificidad (antígeno). Los anticuerpos multi-específicos descritos en el presente documento abarcan anticuerpos monovalentes y multivalentes, p. ej. anticuerpos multiespecíficos bivalentes, trivalentes, tetravalentes.

15

Un parátomo es una región de un anticuerpo que reconoce y se une a un antígeno. Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo multiparatómico. "Anticuerpo multiparatómico", como se emplea en el presente documento, se refiere a un anticuerpo como se describe en el presente documento que comprende dos o más parátomos distintos, que
20 interactúan con diferentes epítomos del mismo antígeno o de dos antígenos diferentes. Los anticuerpos multiparatómicos descritos en el presente documento pueden ser biparatómicos, triparatómicos, tetraparatómicos.

"Dominio de unión a antígeno", como se emplea en el presente documento, se refiere a una
25 porción del anticuerpo, que comprende una parte o la totalidad de uno o más dominios variables, por ejemplo, una parte o la totalidad de un par de dominios variables V_H y V_L , que interactúan específicamente con el antígeno diana. Un dominio de unión puede comprender un anticuerpo de dominio único. En una modalidad, cada dominio de unión es monovalente. Preferiblemente, cada dominio de unión comprende no más de un V_H y un
30 V_L .

"Específicamente", como se emplea en el presente documento, se refiere a un dominio de unión que solo reconoce el antígeno para el que es específico, o un dominio de unión que tiene una afinidad de unión significativamente mayor por el antígeno para el que es
35 específico en comparación con la afinidad por los antígenos para los cuales es no específico. La afinidad de unión se puede medir mediante ensayos estándar, por ejemplo, resonancia de plasmones superficiales, como BIAcore.

Se han generado una variedad de formatos de anticuerpos multiespecíficos. Se han propuesto diferentes clasificaciones, pero los formatos de anticuerpos IgG multiespecíficos generalmente incluyen IgG biespecífica, IgG adjunta, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos), proteínas de fusión multiespecíficas (p. ej., biespecíficas) y conjugados de anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos), como se describe, por ejemplo, en Spiess *et al.*, Formatos moleculares alternativos y aplicaciones terapéuticas para anticuerpos biespecíficos. Mol Immunol. 67(2015):95-106.

- 5 multiespecíficos (p. ej., biespecíficos), proteínas de fusión multiespecíficas (p. ej., biespecíficas) y conjugados de anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos), como se describe, por ejemplo, en Spiess *et al.*, Formatos moleculares alternativos y aplicaciones terapéuticas para anticuerpos biespecíficos. Mol Immunol. 67(2015):95-106.
- 10 Las técnicas para producir anticuerpos biespecíficos incluyen, entre otras, la tecnología CrossMab (Klein *et al.* Ingeniería de anticuerpos biespecíficos terapéuticos utilizando la tecnología CrossMab, métodos 154 (2019) 21-31), ingeniería de perillas en agujeros (p. ej., WO1996027011, WO1998050431), tecnología DuoBody (p. ej., WO2011131746), tecnología azimétrica (p. ej., WO2012058768). Se han descrito otras tecnologías para
- 15 fabricar anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, en Godar *et al.*, 2018, Therapeutic bispecific antibody formats: a patent applications review (1994-2017), Expert Opinion on Therapeutic Patents, 28:3, 251-276. Los anticuerpos biespecíficos incluyen en particular anticuerpos CrossMab, DAF (dos en uno), DAF (cuatro en uno), DutaMab, DT-IgG, botón en ojal LC común, botón en ojal ensamblado, par de carga, Intercambio de brazos Fab, SEEDbody,
- 20 Triomab, LUZ-Y, Fcab, cuerpo $\kappa\lambda$ y Fab ortogonal.

La IgG añadida clásicamente comprende IgG de longitud completa diseñada mediante la adición de un dominio de unión a antígeno adicional o un fragmento de unión a antígeno al extremo N y/o C de la cadena pesada y/o ligera de la IgG. Los ejemplos de dichos

- 25 fragmentos de unión a antígeno adicionales incluyen anticuerpos sdAb (por ejemplo, V_H o V_L), Fv, scFv, dsscFv, Fab, scFav. Los formatos de anticuerpos IgG adjuntos incluyen, en particular, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgC(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody y DVI-IgG (cuatro -en-uno), por ejemplo, como se describe en Spiess *et al.*, Alternative
- 30 molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 67(2015):95-106.

Los fragmentos de anticuerpos multiespecíficos incluyen nanocuerpo, nanocuerpo-HAS, BiTEs, diacuerpo, DART, TandAb, scDiacuerpo, sc-Diacuerpo-CH3, Diacuerpo-CH3, Triple

- 35 cuerpo, Minianticuerpo; Minicuerpo, minicuerpo Tri Bi, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂, F(ab')₂-scFv3, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, tetravalente HCAb, scDiacuerpo-Fc, Diacuerpo-Fc, Tandem scFv-Fc; e intracuerpo, como se describe, por ejemplo, Spiess *et*

a/. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 67(2015):95-106.

Las proteínas de fusión multiespecíficas incluyen Dock y Lock, ImmTAC, HSAbody, scDiabody-HAS y scFv-Toxina en Tandem.

- 5 Los conjugados de anticuerpos multiespecíficos incluyen IgG-IgG; Cov-X-Cuerpo; y scFv1-PEG-scFv2.

Se han descrito formatos de anticuerpos multiespecíficos adicionales, por ejemplo, en Brinkmann y Kontermann. La preparación de anticuerpos biespecíficos, mAbs, 9:2, 182-212 (2017), en particular en la Figura 2, por ejemplo scFv en tándem, triplebody, Fab-VHH, taFv-Fc, scFv₄-Ig, scFv₂-Fcab, scFv₄-IgG. Los bicuerpos, tricuerpos y métodos para producir los mismos se describen, por ejemplo, en el documento WO99/37791.

10

La invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une a IL-13 humana, IL-17A humana y/o IL-17F humana.

15

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un sitio de unión a antígeno que se une a IL-13 humana, en donde el sitio de unión a IL-13 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 15 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:16 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:17 para CDR-L3.

20

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un sitio de unión a antígeno que se une a IL-13 humana, en donde el sitio de unión a IL-13 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 18 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:19 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:20 para CDR-H3.

25

En una modalidad, el sitio de unión de IL-13 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:27.

30

En una modalidad, el sitio de unión de IL-13 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:28.

En una modalidad, el sitio de unión de IL-13 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:31.

35

En una modalidad, el sitio de unión de IL-13 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:32.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un sitio de unión a antígeno que se une a IL-17A humana e IL-17F humana que comprende:

- 5 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:1 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:2 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:3 para CDR-L3.

- 10 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un sitio de unión a antígeno que se une a IL-17A humana e IL-17F humana que comprende:
una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:4 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:5 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:6 para CDR-H3.

15

En una modalidad, el sitio de unión al antígeno que se une a IL-17A humana e IL-17F humana comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:7.

- 20 En una modalidad, el sitio de unión al antígeno que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:9.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico carece de un dominio Fc y la vida media la proporciona un sitio de unión al antígeno que se une a la albúmina sérica.

25

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 59.

- 30 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 63.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 59 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 63.

35

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende o consiste en:
una cadena polipeptídica de la fórmula (I):

VH-CH₁-(CH₂)^s-(CH₃)^t-X-(V₁)^p; y

una cadena polipeptídica de la fórmula (II):

VL-CL-Y-V₂;

en donde:

- 5 VH representa un dominio variable de cadena pesada;
 CH₁ representa el dominio 1 de una región constante de cadena pesada;
 CH₂ representa el dominio 2 de una región constante de cadena pesada;
 CH₃ representa el dominio 3 de una región constante de cadena pesada;
 X representa un enlace o enlazador;
- 10 V₁ representa un dsscFv, un dsFv o un scFv;
 V_L representa un dominio variable de cadena ligera;
 C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;
 Y representa un enlace o enlazador;
 V₂ representa un dsscFv, un dsFv o un scFv;
- 15 p representa 0 o 1;
 s representa 0 o 1;
 t representa 0 o 1;

mientras que cuando p es 0, X está ausente y cuando q es 0, Y está ausente; y

en donde la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende un dominio de unión a la

- 20 proteína A; y

en donde la cadena polipeptídica de la fórmula (II) no se une a la proteína A.

En una modalidad, cuando s es 0 y t es 0, el anticuerpo multiespecífico según la presente divulgación se proporciona como un dímero de una cadena pesada y ligera de:

- 25 la Fórmula (I) y (II) respectivamente, en donde la porción V_H-CH₁ junto con la V_L-C_L forman un fragmento funcional Fab o Fab'.

En una modalidad, cuando s es 1 y t es 1, el anticuerpo multiespecífico según la presente descripción se proporciona como un dímero de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de:

- 30 Fórmula (I) y (II) respectivamente, en donde las dos cadenas pesadas están conectadas por interacciones entre cadenas,
 especialmente a nivel de CH₂-CH₃, y en donde la porción V_H-CH₁ de cada cadena pesada junto con la porción V_L-C_L de cada cadena ligera, forman un fragmento funcional Fab o Fab'.
- 35 En dicha modalidad, las dos porciones de V_H-CH₁-CH₂-CH₃ junto con las dos porciones V_L-C_L forman un anticuerpo funcional de longitud completa. En tal modalidad, el anticuerpo de longitud completa puede comprender una región Fc funcional.

V_H representa un dominio variable de cadena pesada. En una modalidad, V_H es humanizada. En una modalidad, la V_H es completamente humana.

- 5 V_L representa un dominio variable de cadena ligera. En una modalidad, V_L es humanizada. En una modalidad, la V_L es completamente humana.

Generalmente, V_H y V_L juntas forman un dominio de unión a antígeno. En una modalidad, V_H y V_L forman un par afín.

10

"Par afín", como se emplea en el presente documento, se refiere a un par de dominios variables de un único anticuerpo, que se generó in vivo, es decir, el emparejamiento natural de los dominios variables aislados de un huésped. Por lo tanto, un par afín es un par V_H y V_L . En un ejemplo, el par afín se une al antígeno de forma cooperativa.

15

"Región variable" o "dominio variable" como se emplea en el presente documento se refiere a la región en una cadena de anticuerpo que comprende las CDRs y un marco, en particular un marco adecuado.

- 20 Las regiones variables para su uso en la presente descripción se derivarán generalmente de un anticuerpo, que puede generarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

"Derivado de" como se emplea aquí se refiere al hecho de que la secuencia empleada o una secuencia muy similar a la secuencia empleada se obtuvo del material genético original, como la cadena ligera o pesada de un anticuerpo.

25

"Muy similar", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos que en toda su longitud es similar en un 95% o más, tal como un 96, 97, 98 o 99% similar.

30

Las regiones variables para usar en la presente invención, como se describe aquí anteriormente para V_H y V_L , pueden ser de cualquier fuente adecuada y pueden ser, por ejemplo, completamente humanas o humanizadas.

- 35 En una modalidad, el dominio de unión formado por V_H y V_L es específico a un primer antígeno.

En una modalidad, el dominio de unión de V_1 es específico a un segundo antígeno.

En una modalidad, el dominio de unión de V_2 es específico a un tercer antígeno.

En una modalidad, cada uno de V_H - V_L , V_1 y V_2 , tal como están presentes, se une por separado a su respectivo antígeno.

- 5 En una modalidad, el dominio CH_1 es un dominio 1 de origen natural de una cadena pesada de anticuerpo o un derivado del mismo. En una modalidad, el dominio CH_2 es un dominio 2 de origen natural de una cadena pesada de anticuerpo o un derivado del mismo. En una modalidad, el dominio CH_3 es un dominio 3 de origen natural de una cadena pesada de anticuerpo o un derivado del mismo.

10

En una modalidad, el fragmento C_L , en la cadena ligera, es una secuencia kappa constante o un derivado de la misma. En una modalidad, el fragmento C_L , en la cadena ligera, es una secuencia lambda constante o un derivado de la misma.

- 15 Un derivado de un dominio de origen natural, como se emplea en el presente documento, se refiere a cuando al menos un aminoácido en una secuencia de origen natural ha sido reemplazado o eliminado, por ejemplo, para optimizar las propiedades del dominio, tal como mediante la eliminación de propiedades indeseables, pero en donde se conserva(n) lo(s) rasgo(s) caracterizante(s) del dominio. En una modalidad, un derivado de un dominio de
20 origen natural comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, diez, once o doce sustituciones o deleciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de origen natural.

- En una modalidad, uno o más enlaces disulfuro naturales o modificados entre cadenas (es
25 decir, entre cadenas ligeras y pesadas) están presentes en el fragmento funcional Fab o Fab'.

En una modalidad, está presente un enlace disulfuro "natural" entre CH_1 y C_L en las cadenas polipeptídicas de la Fórmula (I) y (II).

30

Cuando el dominio C_L se deriva de Kappa o Lambda, la posición natural para una cisteína formadora de enlaces es 214 en cKappa y cLambda humanas (numeración de Kabat 4^a edición 1987).

- 35 La ubicación exacta de la cisteína formadora de enlaces disulfuro en CH_1 depende del dominio particular realmente empleado. Así, por ejemplo, en gamma-1 humana la posición natural del enlace disulfuro está situada en la posición 233 (numeración Kabat 4^a edición

1987). Se conoce la posición de la cisteína formadora de enlaces para otros isotipos humanos tal como gamma 2, 3, 4, IgM e IgD, por ejemplo la posición 127 para IgM humana, IgE, IgG2, IgG3, IgG4 y 128 de la cadena pesada de IgD humana e IgA2B.

- 5 Opcionalmente, puede haber un enlace disulfuro entre V_H y V_L de los polipéptidos de la fórmula I y II.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico según la divulgación tiene un enlace disulfuro en una posición equivalente o correspondiente al que se produce naturalmente
10 entre CH_1 y C_L .

En una modalidad, una región constante que comprende CH_1 y una región constante tal como C_L tiene un enlace disulfuro que se encuentra en una posición no natural. Esto se puede diseñar en la molécula introduciendo cisteína(s) en la cadena de aminoácidos en la
15 posición o posiciones requeridas. Este enlace disulfuro no natural se suma o es una alternativa al enlace disulfuro natural presente entre CH_1 y C_L . La(s) cisteína(s) en posiciones naturales pueden ser reemplazadas por un aminoácido como la serina que es incapaz de formar un puente disulfuro.

20 La introducción de cisteínas manipuladas puede realizarse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis de superposición de extensión de PCR, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de casete (ver, en general, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausbel *et al.*, Current Protocols in
25 Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Los kits de mutagénesis dirigida al sitio están disponibles comercialmente, p. ej., Kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA). La mutagénesis de casete se puede realizar en base a Wells *et al.*, 1985, Gene, 34:315-323. Alternativamente, los mutantes se pueden hacer mediante la síntesis total de genes mediante hibridación,
30 ligadura y amplificación por PCR y clonación de oligonucleótidos superpuestos.

En una modalidad, un enlace disulfuro entre CH_1 y C_L está completamente ausente, por ejemplo, las cisteínas intercatenarias pueden reemplazarse por otro aminoácido, como la serina. Por lo tanto, en una modalidad no hay enlaces disulfuro entre cadenas en el
35 fragmento Fab funcional de la molécula. Las descripciones tales como WO2005/003170, incorporada aquí como referencia, describen cómo proporcionar fragmentos Fab sin un enlace disulfuro entre cadenas.

- Los ejemplos de formatos de anticuerpos para usar en la presente invención incluyen IgG adjunta y Fab adjunto, mientras que una IgG completa o un fragmento Fab, respectivamente, se modifica mediante la adición de al menos un dominio de unión a
- 5 antígeno adicional (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro dominios de unión a antígeno), por ejemplo, un anticuerpo de dominio único (tal como V_H o V_L , o VHH), un scFv, un dsscFv, un dsFv al extremo N y/o C de la cadena ligera de dicho IgG o Fab, y opcionalmente a la cadena pesada de dicha IgG o Fab, por ejemplo como se describe en los documentos WO2009/040562, WO2010035012, WO2011/030107, WO2011/061492, WO2011/061246 y
- 10 WO2011/086091, todos incorporados aquí como referencia. Una IgG añadida que comprende una IgG de longitud completa diseñada añadiendo un dsFv al extremo C de la cadena ligera (y opcionalmente a la cadena pesada) de la IgG, se describió por primera vez en el documento WO2015/197789, incorporado aquí como referencia.
- 15 Un formato de anticuerpo preferido para usar en la presente invención comprende un Fab unido a dos scFv o dsscFv, cada scFv o dsscFv se une al mismo objetivo o a uno diferente (por ejemplo, un scFv o dsscFv se une a un objetivo terapéutico y un scFv o dsscFv que aumenta la vida media al unirse, por ejemplo, a la albúmina). Tales fragmentos de anticuerpos se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional No.
- 20 WO2015/197772, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad y particularmente con respecto a la discusión de fragmentos de anticuerpos.

V_1 representa un dsscFv, un dsFv o un scFv.

- 25 V_2 representa un dsscFv, un dsFv o un scFv.

En una modalidad, cuando V_1 y/o V_2 son un dsFv o un dsscFv, el enlace disulfuro entre los dominios variables V_H y V_L de V_1 y/o V_2 está entre dos de los residuos enumerados a continuación (a menos que el contexto indique lo contrario, la numeración de Kabat se

30 emplea en la lista a continuación). Dondequiera que se haga referencia a la numeración de Kabat, la referencia relevante es Kabat *et al.*, 1991 (5ª edición, Bethesda, Md.), en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., NIH, EE. UU.

- 35 En una modalidad, el enlace disulfuro está en una posición seleccionada del grupo que comprende:
- $V_H37 + V_L95C$ véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997);

- V_H44 + V_L100 ver por ejemplo; por ejemplo, Weatherill *et al.*, Protein Engineering, Design & Selection, 25 (321-329), 2012);
- V_H44 + V_L105 véase, por ejemplo, J Biochem. 118, 825-831 Luo *et al* (1995);
- V_H45 + V_L87 véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997);
- 5 • V_H55 + V_L101 véase, por ejemplo, FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995);
- V_H100 + V_L50 véase, por ejemplo, Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber *et al* (1990);
- V_H100b + V_L49; véase, por ejemplo, Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber *et al* (1990);
- 10 • V_H98 + V_L 46; véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997);
- V_H101 + V_L46; véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al.* (1997);
- V_H105 + V_L43; véase por ejemplo; Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. vol. 90 págs. 7538-7542 Brinkmann *et al* (1993); o Proteínas 19, 35-47 Jung *et al.* (1994),
- V_H106 + V_L57; véase por ejemplo FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995)
- 15 y una posición que le corresponde en un par de regiones variables situadas en la molécula.

En una modalidad, el enlace disulfuro se forma entre las posiciones V_H44 y V_L100.

20 Los pares de aminoácidos enumerados anteriormente están en las posiciones que conducen al reemplazo por cisteínas de manera que se pueden formar enlaces disulfuro. Las cisteínas pueden diseñarse en estas posiciones deseadas mediante técnicas conocidas. En una modalidad, por lo tanto, una cisteína diseñada de acuerdo con la presente descripción se refiere a que los residuos naturales en una posición de aminoácido dada se han reemplazado con un residuo de cisteína.

25 La introducción de cisteínas manipuladas puede realizarse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis de superposición de extensión de PCR, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de casete (ver, en general, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausbel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Los kits de mutagénesis dirigida al sitio están disponibles comercialmente, p. ej., Kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA). La mutagénesis de casete se puede realizar en base a Wells *et al.*, 1985, Gene, 34:315-323. Alternativamente, los

30

35 mutantes se pueden hacer mediante la síntesis total de genes mediante hibridación, ligadura y amplificación por PCR y clonación de oligonucleótidos superpuestos.

En consecuencia, en una modalidad cuando V_1 y/o V_2 son un dsFv o un dsscFv, los dominios variables V_H y V_L de V_1 y/o los dominios variables V_H y V_L de V_2 , pueden estar unidos por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas, en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo formado por: VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

En una modalidad cuando V_1 y/o V_2 son un dsFv o un dsscFv, los dominios variables V_H y V_L de V_1 y/o los dominios variables V_H y V_L de V_2 pueden estar unidos por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína, uno en V_H y uno en V_L , que están fuera de las CDR en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consta de VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

En una modalidad cuando V_1 es un dsFv o un dsscFv, los dominios variables V_H y V_L de V_1 están unidos por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína diseñados, uno en la posición VH44 y el otro en VL100. En una modalidad cuando V_2 es un dsFv o un dsscFv, los dominios variables V_H y V_L de V_2 están unidos por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína diseñados, uno en la posición VH44 y el otro en VL100.

En una modalidad, cuando V_1 es un dsscFv, un dsFv o un scFv, el dominio V_H de V_1 está unido a X.

En una modalidad, cuando V_1 es un dsscFv, un dsFv o un scFv, el dominio V_L de V_1 está unido a X.

En una modalidad, cuando V_2 es un dsscFv, un dsFv o un scFv, el dominio V_H de V_2 está unido a Y.

En una modalidad, cuando V_2 es un dsscFv, un dsFv o un scFv, el dominio V_L de V_2 está unido a Y.

El experto en la materia apreciará que cuando V_1 y/o V_2 representan un dsFv, el anticuerpo multiespecífico comprenderá un tercer polipéptido que codifica el dominio V_H o V_L libre correspondiente que no está unido a X o Y. Cuando V_1 y V_2 son un dsFv entonces el "dominio variable libre" (es decir, el dominio unido mediante un enlace disulfuro al resto del

polipéptido) será común a ambas cadenas. Por lo tanto, mientras que el dominio variable real fusionado o unido mediante X o Y al polipéptido puede ser diferente en cada cadena polipeptídica, los dominios variables libres emparejados con el mismo serán generalmente idénticos entre sí.

5

En algunas modalidades, p es 1. En algunas modalidades, p es 0.

En algunas modalidades, s es 1. En algunas modalidades, s es 0.

En algunas modalidades, t es 1. En algunas modalidades, t es 0.

En algunas modalidades, s es 1 y t es 1. En algunas modalidades, s es 0 y t es 0.

10

En una modalidad, p es 1, q es 1, r es 0, s es 0 y t es 0, y tanto V_1 como V_2 representan un dsscFv. Así, en un aspecto, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une a IL-13 humana, IL-17A humana y/o IL-17F humana que comprende o consiste en:

a) una cadena polipeptídica de la fórmula (Ia):

15

$V_H-CH_1-X-V_1$; y

b) una cadena polipeptídica de la fórmula (IIa):

$V_L-C_L-Y-V_2$;

en donde:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada;

20

CH_1 representa el dominio 1 de una región constante de cadena pesada;

X representa un enlace o enlazador;

Y representa un enlace o enlazador;

V_1 representa un scFv, un dsscFv o un dsFv;

V_L representa un dominio variable de cadena ligera;

25

C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como

C_{κ} ;

V_2 representa un scFv, un dsscFv o un dsFv;

en donde al menos uno de V_1 o V_2 es un dsscFv o un dsFv;

en donde la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende un dominio de unión a la proteína A; y

30

en donde la cadena polipeptídica de la fórmula (IIa) no se une a la proteína A.

En tal modalidad, V_2 no se une a la proteína A, es decir, el scFv, dsscFv o dsFv de V_2 no comprende un dominio de unión a la proteína A. En una modalidad, V_2 , es decir, el scFv,

35

dsscFv o dsFv de V_2 comprende un dominio $VH1$. En otra modalidad, V_2 , es decir, el scFv, dsscFv o dsFv de V_2 comprende un dominio $VH3$ que no se une a la proteína A. En una modalidad, V_2 , es decir, el scFv, dsscFv o dsFv de V_2 comprende un dominio $VH2$. En una

modalidad, V_2 , es decir, el scFv, dsscFv o dsFv de V_2 comprende un dominio VH4. En una modalidad, V_2 , es decir, el scFv, dsscFv o dsFv de V_2 comprende un dominio VH5. En una modalidad, V_2 , es decir, el scFv, dsscFv o dsFv de V_2 comprende un dominio VH6. En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende solo un dominio de unión a la proteína A presente en V_H o V_1 . En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende solo un dominio de unión a la proteína A presente en V_1 . En otra modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende dos dominios de unión a proteína A presentes en VH y V_1 respectivamente.

En otra modalidad, p es 0, q es 1, r es 0, s es 1, t es 1 y V2 es un dsscFv. Por tanto, en un aspecto, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une a IL-13 humana, IL-17A humana y/o IL-17F humana, y que comprende o consiste en:

a) una cadena polipeptídica de la fórmula (Ib):

$V_H\text{-CH}_1\text{-CH}_2\text{-CH}_3$; y

b) una cadena polipeptídica de la fórmula (IIb):

$V_L\text{-C}_L\text{-Y-V}_2$;

en donde:

VH representa un dominio variable de cadena pesada;

CH1 representa el dominio 1 de una región constante de cadena pesada;

CH2 representa el dominio 2 de una región constante de cadena pesada;

CH3 representa el dominio 3 de una región constante de cadena pesada;

Y representa un enlace o enlazador;

VL representa un dominio variable de cadena ligera;

CL representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como

Ckappa;

V2 representa un dsscFv;

donde la cadena polipeptídica de la fórmula (Ib) comprende un dominio de unión a la proteína A; y

en donde la cadena polipeptídica de la fórmula (IIIb) no se une a la proteína A.

En tal modalidad, V_2 no se une a la proteína A, es decir, el dsscFv de V_2 no comprende un dominio de unión a la proteína A. En una modalidad, V_2 , es decir, el dsscFv de V_2 comprende un dominio VH1. En otra modalidad, V_2 , es decir, el dsscFv de V_2 comprende un dominio VH3 que no se une a la proteína A. En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ib) comprende solo un dominio de unión a la proteína A presente en V_H o $\text{CH}_2\text{-CH}_3$. En otra modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ib) comprende dos dominios de unión a proteína A presentes en VH y $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ respectivamente.

En otra modalidad, p es 0, q es 1, r es 0, s es 1, t es 1 y V₂ es un dsFv. Así, en un aspecto, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une a IL-13 humana, IL-17A humana y/o IL-17F humana que comprende o consiste en:

- 5 a) una cadena polipeptídica de la fórmula (Ic):



- b) una cadena polipeptídica de la fórmula (IIc):



en donde:

- 10 V_H representa un dominio variable de cadena pesada;
 CH₁ representa el dominio 1 de una región constante de cadena pesada;
 CH₂ representa el dominio 2 de una región constante de cadena pesada;
 CH₃ representa el dominio 3 de una región constante de cadena pesada;
 Y representa un enlace o enlazador;
 15 V_L representa un dominio variable de cadena ligera;
 C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;
 V₂ representa un dsFv;

donde la cadena polipeptídica de la fórmula (Ic) comprende un dominio de unión a la proteína A; y

- 20 en donde la cadena polipeptídica de la fórmula (IIc) no se une a la proteína A.

En tal modalidad, V₂, es decir, el dsFv de V₂ no se une a la proteína A. En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ic) comprende solo un dominio de unión a la proteína A presente en V_H o CH₂-CH₃. En otra modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ic) comprende dos dominios de unión a proteína A presentes en V_H y CH₂-CH₃ respectivamente.

En una modalidad del anticuerpo multiespecífico de la invención,

- 30 V_L y V_H comprenden un sitio de unión a antígeno que se une a IL-17A humana y/o IL-17F humana,
 V₁ comprende un sitio de unión a antígeno que se une a la albúmina sérica humana y
 V₂ comprende un sitio de unión a antígeno que se une a la IL-13 humana.

- 35 En una modalidad, V_L comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3; V_H comprende la secuencia dada en SEQ ID

NO:4 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:5 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-H3.

En una modalidad, V_1 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 39 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 40 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 41 para CDR-L3; y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:42 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:43 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:44 para CDR-H3.

En una modalidad, V_2 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 15 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 16 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 17 para CDR-L3; y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:18 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:19 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:20 para CDR-H3;

En una modalidad, V_L comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:7 y V_H comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:9.

En una modalidad, V_1 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:45 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:46.

En una modalidad, V_1 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:49 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:50.

En una modalidad, la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de V_1 están conectadas por un enlazador, dicho enlazador que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:68.

En una modalidad, V_1 es un scFv que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:53 o un dsscFv que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:55.

En una modalidad, V_2 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:27 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:28.

- 5 En una modalidad, V_2 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:31 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:32.

- 10 En una modalidad, la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de V_2 están conectadas por un enlazador, dicho enlazador que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:66.

- 15 En una modalidad, V_2 es un scFv que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:35 o un dsscFv que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:37.

En una modalidad, X es un enlazador que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:67.

- 20 En una modalidad, Y es un enlazador que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:65.

En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 59.

- 25 En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (IIa) comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 63.

- 30 En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 59 y la cadena polipeptídica de fórmula (IIa) comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 63.

- 35 Se apreciará que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos en las secuencias proporcionadas por la presente invención sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno y neutralizar su actividad biológica. El efecto de cualquier sustitución, adición y/o deleción de aminoácidos puede probarse fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, utilizando los métodos

descritos en este documento, en particular los ilustrados en los Ejemplos, para determinar la unión al antígeno y la inhibición de la actividad biológica.

En consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que

5 comprende CDRs como se define por las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 39, 40, 41, 42, 43 y 44, en las que uno o más aminoácidos en una o más de las CDRs se han sustituido con otro aminoácido, por ejemplo, un aminoácido similar como se define aquí a continuación.

10 "Identidad", tal como se usa en el presente documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, los residuos de aminoácidos son idénticos entre las secuencias. "Similitud", como se usa en el presente documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácidos es de tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por isoleucina o valina.

15 Otros aminoácidos que a menudo se pueden sustituir entre sí incluyen, entre otros:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos con cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y

20 - cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing.

Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana

25 Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, el software BLAST™ disponible de NCBI (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. *et al.*, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. *et al.*, 1997, Nucleic
30 Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656.).

En una modalidad, las CDR del anticuerpo multiespecífico comprenden secuencias que tienen al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con las secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 39, 40, 41, 42, 43 y

35 44.

En una modalidad, V_L comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 7 y V_H comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO:9.

5

En una modalidad, V_1 comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 45 y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:46.

10

En una modalidad, V_1 comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 49 y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:50.

15

En una modalidad, la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de V_1 están conectadas por un enlazador, comprendiendo dicho enlazador una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO:68.

20

En una modalidad, V_1 es un scFv que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 53 o un dsscFv que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO:55.

25

En una modalidad, V_2 comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 27 y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:28.

30

En una modalidad, V_2 comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 31 y/o una región variable de cadena pesada que

35

comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:32.

5 En una modalidad, la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de V₂ están conectadas por un enlazador, comprendiendo dicho enlazador una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO:66.

10 En una modalidad, V₂ es un scFv que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 35 o un dsscFv que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO:37.

15 En una modalidad, X es un enlazador que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:67.

20 En una modalidad, Y es un enlazador que comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:65.

25 En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 59.

En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (IIa) comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 63.

30 En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 59 y la cadena polipeptídica de la fórmula (IIa) comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 63.

35

Epítipo

Un epítopo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Los epítomos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítomos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítomos estructurales y tienen aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítomos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos de aminoácidos no lineales. En ciertas modalidades, los epítomos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características específicas de carga.

Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo de referencia, o si compite por unirse a él, usando métodos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítopo que un anticuerpo de referencia de la invención, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína o péptido en condiciones de saturación. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la proteína o el péptido. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a la proteína o péptido luego de la unión por saturación con el anticuerpo de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítopo diferente que el anticuerpo de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no puede unirse a la proteína o al péptido después de la unión por saturación con el anticuerpo de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítopo que el epítopo unido por el anticuerpo de referencia de la invención.

Para determinar si un anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones. En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína/péptido en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula de proteína/péptido. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a la proteína/péptido en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la proteína/péptido. Si, en ambas orientaciones, solo el primer anticuerpo (saturante) es capaz de unirse a la proteína/péptido, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten por unirse a la proteína/péptido. Como apreciará el experto en la materia, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia puede no unirse necesariamente al epítopo idéntico al anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia al unirse a un epítopo superpuesto o adyacente.

Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o al superpuesto si cada uno inhibe (bloquea) de forma competitiva la unión del otro al antígeno. Es decir, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos 50%, 75%, 90% o incluso 99%, según se mide en un ensayo de unión competitiva (ver, por ejemplo, Junghans *et al.*, y col., Cancer Res, 1990:50:1495-1502). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítipos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

Luego se puede llevar a cabo una experimentación de rutina adicional (por ejemplo, mutación peptídica y análisis de unión) para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de prueba se debe de hecho a la unión al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo se pueden realizar usando ELISA, RIA, resonancia de plasmones superficiales, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión a anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica.

Los anticuerpos pueden competir por unirse a IL-17A o IL-17F o unirse al mismo epítipo que un anticuerpo multiespecífico que comprende una combinación de secuencia CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2 /CDR-H3 de SEQ ID NO: 1/2/3/4/5/6.

Los anticuerpos pueden competir por unirse a la IL-13 o unirse al mismo epítipo que un anticuerpo multiespecífico que comprende una combinación de secuencias CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3 de SEQ ID NO: 15/16/17/18/19/20.

Los anticuerpos pueden competir por unirse a la albúmina sérica o unirse al mismo epítipo que un anticuerpo multiespecífico que comprende una combinación de secuencias CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3 de SEQ ID NO: 39/40/41/42/43/44.

Moléculas efectoras

Si se desea, un anticuerpo multiespecífico para usar en la presente invención se puede conjugar con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas unidas de manera que formen un único resto que pueda unirse a los anticuerpos de la presente invención.

Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, éste puede prepararse mediante procedimientos químicos estándar o de ADN recombinante en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la técnica (ver, Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson *et al.*, eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe *et al.* 1982 Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, el enlace se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP 0392745.

El término molécula efectora tal como se utiliza aquí incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente yoduro radiactivo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, que elimine) las células. Ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrina, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, doxorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej.,

dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y agentes antimitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto²¹³, Californio 252, Iridio 192 y Tungsteno 188/Renio 188; o fármacos tales como, entre otros, alquilfosfocolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, entre otros, inmunoglobulinas, toxinas como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador tisular del plasminógeno, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía por emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Ver en general la patente de EE. UU. n.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aecuatorina; y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas

efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en WO 05/117984.

5 Cuando la molécula efectora es un polímero, puede ser, en general, un polímero sintético o de origen natural, por ejemplo, un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej., un homo- o heteropolisacárido.

10 Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente
15 sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de los mismos.

Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

20 “Derivados”, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidias y similares. El grupo reactivo puede enlazarse directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el residuo de tal grupo en algunos casos formará parte del producto como grupo de enlace entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

25 El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente estará en un rango de peso molecular promedio de 500Da a 50000Da, por ejemplo de 5000 a 40000Da tal como de 20000 a 40000Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular sobre la base del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizarse en
30 ciertos tejidos, tales como tumores, o extender la vida media circulante (para una revisión, consulte Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando se pretende que el producto abandone la circulación y penetre en el tejido, puede ser ventajoso utilizar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular de alrededor de 5000Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en
35 circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, que tenga un peso molecular en el rango de 20000Da a 40000Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el rango de aproximadamente 15000Da a aproximadamente 40000Da.

5

En un ejemplo, los anticuerpos para usar en la presente invención se unen a fracciones de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas PEG pueden unirse a través de cualquier cadena lateral de aminoácidos disponible o grupo funcional aminoácido terminal ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libres.

10

Dichos aminoácidos pueden aparecer de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, US 5,219,996; US 5,667,425; WO 98/25971). En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en donde la

15

modificación es la adición al extremo C de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Convenientemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que se puede unir la molécula efectora. Pueden usarse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

20

Adecuadamente, las moléculas de PEG pueden unirse covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo, derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Se puede usar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros como se describe anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, p. ej., yodoacetamida, una imida, p. ej., maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE. UU.) o se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles comercialmente utilizando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible de Nektar,

25

30

35

anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una modalidad, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado o diFab que está

- 5 PEGilado, es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, p. ej., de acuerdo con el método descrito en EP 0948544 o EP 1090037 [ver también "Poly(ethyleneglyphol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglyphol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, PEG se une a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada.
- 15 Un residuo de lisina se puede unir covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amino del residuo de lisina se le puede unir un polímero de metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000Da. Por tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser de aproximadamente 40.000Da.

- 20 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico no está unido a una molécula efectora.

Polinucleótidos / vectores/ células huésped

- La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica una
- 25 cadena polipeptídica de una molécula de anticuerpo multiespecífica IL-13/IL-17AF.

- Un polinucleótido variante puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40, hasta 50, hasta 75 o más sustituciones y/o deleciones de ácido nucleico de las secuencias dadas en la lista de secuencias. Generalmente, una variante tiene 1-20, 1-50,
- 30 1-75 o 1-100 sustituciones y/o deleciones.

- Las variantes adecuadas pueden ser al menos aproximadamente 70% homólogas a un polinucleótido de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento, normalmente al menos aproximadamente 80 o 90% y más adecuadamente al
- 35 menos aproximadamente 95%, 97% o 99% homólogas a las mismas. Las variantes pueden conservar al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad. Las variantes conservan típicamente alrededor del 60% -

alrededor del 99% de identidad, alrededor del 80% - alrededor del 99% de identidad, alrededor del 90% - alrededor del 99% de identidad o alrededor del 95% - alrededor del 99% de identidad. La homología y la identidad a estos niveles generalmente están presentes al menos con respecto a las regiones codificantes de los polinucleótidos. Los métodos para medir la homología son bien conocidos en la técnica y los expertos en la técnica entenderán que en el presente contexto, la homología se calcula sobre la base de la identidad del ácido nucleico. Dicha homología puede existir en una región de al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 30, por ejemplo, al menos aproximadamente 40, 60, 100, 200 o más nucleótidos contiguos (dependiendo de la longitud). Tal homología puede existir en toda la longitud de la secuencia de polinucleótidos sin modificar.

El homólogo puede diferir de una secuencia en el polinucleótido relevante en menos de aproximadamente 3, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (cada una de las cuales puede ser una sustitución, eliminación o inserción). Por ejemplo, el homólogo puede diferir entre 3 y 50 mutaciones, a menudo entre 3 y 20 mutaciones. Estas mutaciones pueden medirse en una región de al menos 30, por ejemplo, al menos aproximadamente 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos del homólogo.

La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York y Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo multiespecífico de IL-13/IL-17AF. Puede usarse cualquier sistema de célula huésped/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF. Pueden usarse bacterias, por ejemplo E. coli, y otros sistemas microbianos o también pueden usarse por ejemplo sistemas de expresión de células huésped eucariotas mamíferas. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de un anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF, que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene un vector en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína del ADN que codifica el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF y aislamiento del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.

Producción de anticuerpos multiespecíficos

Hay una serie de enfoques para generar anticuerpos multiespecíficos, en particular biespecíficos. Morrison *et al.*, (Coloma y Morrison 1997, Nat Biotechnol. 15, 159-163) describe la fusión de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) con anticuerpos completos, p. ej., IgG. Schoonjans *et al.*, 2000, Journal of Immunology, 165, 7050-7057, describe la fusión de scFv con fragmentos Fab de anticuerpo. WO2015/197772 describe la fusión de scFv estabilizado con disulfuro (dsscFv) con fragmentos Fab.

Los enfoques estándar descritos en la técnica anterior comprenden la expresión en una célula huésped de al menos dos polipéptidos, cada uno de los cuales codifica una cadena pesada (HC) o una cadena ligera (LC) de un anticuerpo completo o fragmento de unión a antígeno del mismo, p. ej., un Fab, al que se puede fusionar un fragmento de unión a antígeno adicional de un anticuerpo a la posición N- y/o C-terminal de la cadena pesada y/o la cadena ligera. Cuando se intenta producir de forma recombinante dichos anticuerpos multiespecíficos mediante la expresión de dos (una cadena ligera y una cadena pesada para formar un Fab adjunto) o cuatro polipéptidos (dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas para formar una IgG adjunta), generalmente se requiere expresar la cadena ligera en exceso sobre la cadena pesada, con el fin de asegurar el correcto plegado de la cadena pesada al ensamblarla con su correspondiente cadena ligera. En particular, el CH1 (dominio 1 de la región constante de la cadena pesada) no se pliega sobre sí mismo por las proteínas BIP, que pueden ser desplazadas por una LC correspondiente; por lo tanto, el plegamiento correcto de CH₁/HC depende de la disponibilidad de su LC correspondiente (Lee *et al.*, 1999, Molecular Biology of the Cell, Vol. 10, 2209-2219).

Hemos observado que esos métodos de expresión de anticuerpos multiespecíficos pueden resultar en la producción de una cadena ligera en exceso sobre la cadena pesada, que permanece en la cosecha de células huésped, y que el exceso de cadena ligera tiende a formar complejos diméricos (o “dímeros LC”) que están presentes como subproducto del

proceso de producción con el anticuerpo multiespecífico deseado, especialmente monomérico, y por lo tanto necesita ser purificado.

Es importante destacar que, hasta el momento, no se ha identificado el problema técnico asociado con la formación de dímeros de cadenas ligeras, cuando se fusionan en el extremo N y/o C con fragmentos adicionales de unión a antígeno, y los métodos analíticos comúnmente utilizados no han permitido la detección y cuantificación de los dímeros LC añadidos entre los productos heterogéneos del proceso de producción. Esto puede resultar en un sesgo significativo al estimar la cantidad de los productos utilizando métodos analíticos estándar.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar los anticuerpos multiespecíficos y los métodos de producción de los mismos, que permitan el aislamiento y la eliminación de los dímeros LC adjuntos de manera fácil y eficiente en los primeros pasos del proceso de producción y, por lo tanto, mejoren el rendimiento de la proteína de interés para su uso en terapia, que es el anticuerpo multiespecífico, en particular en su forma monomérica.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención se han diseñado para proporcionar anticuerpos multiespecíficos mejorados con funcionalidad y estabilidad equivalentes, al tiempo que aumentan el rendimiento del material de "anticuerpos multiespecíficos", en particular monomérico, obtenido después de la purificación, en particular después de purificación de una etapa que comprende una cromatografía de afinidad de proteína A.

Ventajosamente, los anticuerpos multiespecíficos de la presente divulgación se pueden purificar más eficientemente con un método de purificación que se mejora con respecto a los métodos comúnmente utilizados en la técnica anterior, en particular porque el método mejorado comprende menos pasos, lo que es rentable y efectivo en términos de tiempo a escala industrial. En particular, los anticuerpos multiespecíficos de la presente descripción maximizan la cantidad de proteínas de interés (es decir, el formato de anticuerpo multiespecífico correcto) obtenidas después de un método de purificación de un solo paso que comprende una cromatografía de afinidad de proteína A, mediante el cual la purificación de anticuerpos multiespecíficos de interés y la eliminación de los dímeros LC adjuntos se producen simultáneamente. Ventajosamente, los métodos de producción y purificación de los anticuerpos multiespecíficos de la presente descripción no requieren un paso de purificación adicional para capturar el exceso de cadenas ligeras libres no unidas, en particular los dímeros LC adjuntos.

Proteína A

La proteína A es una proteína de superficie de 42 kDa que se encuentra originalmente en la pared celular de la bacteria *Staphylococcus aureus*. La proteína A se ha utilizado ampliamente para detectar, cuantificar y purificar inmunoglobulinas. Se ha informado que la proteína A se une a la porción Fab derivada de los anticuerpos de la familia VH3 y la región Fc gamma en la porción de la región constante de IgG (entre los dominios CH₂ y CH₃). La estructura cristalina del complejo formado por la proteína A y el Fab ha sido descrita por ejemplo en Graille *et al.*, 2000, PNAS, 97(10): 5399–5404. En el contexto de la presente divulgación, la proteína A abarca la proteína A natural y cualquier variante o derivado de la misma, en la medida en que la variante o derivado de la proteína A mantenga su capacidad para unirse a los dominios VH3 y/o dominios Fc gamma.

La cadena polipeptídica de la fórmula (I) de la presente invención comprende un dominio de unión a la proteína A. En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende uno, dos o tres dominios de unión a la proteína A.

"Dominio de unión a la proteína A", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un dominio de unión que se une específicamente a la proteína A. Un dominio de unión a la proteína A puede referirse a un dominio VH3 o una porción de un dominio VH3 que se une a la proteína A, es decir, que comprende una interfaz de unión a la proteína A. La porción de un dominio VH3 que se une a la proteína A no comprende las CDR del dominio VH3, es decir, la interfaz de unión a la proteína A de la VH3 no involucra a las CDR; en consecuencia, se entenderá que un dominio de unión a proteína A no compite con un dominio de unión a antígeno como se describe en la presente solicitud.

En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende un dominio de unión a proteína A que está presente en V_H y/o CH₂-CH₃ y/o V₁. En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende uno, dos o tres dominios de unión a proteína A, que están presentes en V_H y/o CH₂-CH₃ y/o V₁. En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende solo un dominio de unión a la proteína A que está presente en V_H o V₁. En una modalidad, s es 0, t es 0 y la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende solo un dominio de unión a la proteína A que está presente en V_H o V₁. En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende solo un dominio de unión a proteína A que está presente en V_H. En una modalidad, s es 0, t es 0, p es 0, y la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende solo un dominio de unión a proteína A que está

presente en V_H . En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende solo un dominio de unión a la proteína A que está presente en V_1 . En una modalidad, s es 0, t es 0, p es 1, y la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende solo un dominio de unión a la proteína A que está presente en V_1 .

5

En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende dos dominios de unión a la proteína A. En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende dos dominios de unión a proteína A que están presentes en V_H y CH_2-CH_3 respectivamente. En otra modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende dos dominios de unión a proteína A que están presentes en V_H y V_1 respectivamente. En otra modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende dos dominios de unión a proteína A que están presentes en CH_2-CH_3 y V_1 respectivamente.

10

15

En una modalidad, la cadena polipeptídica de la fórmula (I) comprende tres dominios de unión a la proteína A, estando cada uno presente en V_H , CH_2-CH_3 y V_1 .

La proteína A natural puede interaccionar en particular con la región Fc gamma, en la porción de región constante de IgG. Más particularmente, la proteína A puede interaccionar con un dominio de unión entre CH_2 y CH_3 . En una modalidad, cuando s es 1, t es 1, tanto CH_2 como CH_3 son dominios naturales de la clase IgG.

20

En algunas modalidades, los dominios de unión a la proteína A comprenden o consisten en un dominio VH_3 o variante del mismo que se une a la proteína A. En algunas modalidades, los dominios de unión a la proteína A comprenden o consiste(n) en un dominio VH_3 de origen natural. En algunas modalidades, una variante de un dominio VH_3 que se une a la proteína A es una variante de un dominio VH_3 natural, siendo incapaz dicho dominio VH_3 natural de unirse a la proteína A.

25

30

La cadena polipeptídica de la fórmula (II) de la presente divulgación no se une a la proteína A. En una modalidad, el dominio de unión de V_2 no se une a la proteína A.

En algunas modalidades, V_2 comprende o consta de un VH_1 y/o un VH_2 y/o un VH_4 y/o un VH_5 y/o un VH_6 y no comprende un dominio VH_3 . En algunas modalidades, V_2 comprende o consiste en un dominio VH_3 o una variante del mismo que no se une a la proteína A. En algunas modalidades, V_2 comprende o consiste en un dominio VH_3 de origen natural que no puede unirse a la proteína A. En algunas modalidades, una variante de un dominio VH_3 que

35

no se une a la proteína A es una variante de un VH3 natural, pudiendo dicho dominio VH3 natural unirse a la proteína A.

Los genes de la línea germinal humana VH3 y los dominios VH3 (o marcos) se han
 5 caracterizado bien. Muchos de los dominios VH3 naturales tienen la capacidad de unirse a la proteína A, pero ciertos dominios VH3 naturales no tienen la capacidad de unirse a la proteína A (ver Roben *et al.*, 1995, J Immunol.;154(12):6437-6445).

Un dominio VH3 para uso en la presente descripción se puede obtener mediante varios
 10 métodos. En una modalidad, un dominio VH3 para usar en la presente divulgación es un dominio VH3 de origen natural, seleccionado por su capacidad o incapacidad para unirse a la proteína A, según su posición dentro del polipéptido (I) y/o (II) de la divulgación. Por ejemplo, puede generarse un panel de anticuerpos contra un antígeno de interés mediante la inmunización de un animal no humano, luego humanizarse, y los anticuerpos
 15 humanizados pueden examinarse y seleccionarse en función de su capacidad o incapacidad para unirse a la proteína A a través del dominio VH3 humanizado, por ejemplo contra una columna de afinidad de proteína A. Alternativamente, las tecnologías de presentación (p. ej., presentación en fagos, presentación en levadura, presentación en ribosomas, presentación en bacterias, presentación en la superficie de células de
 20 mamíferos, presentación en ARNm, presentación en ADN) pueden utilizarse para explorar bibliotecas de anticuerpos y seleccionar anticuerpos que comprendan un dominio VH3 que se une, en particular a través de una interfaz de unión a la proteína A que no involucra las CDR o no se une a la proteína A.

Alternativamente, un dominio VH3 para usar en la presente divulgación es una variante de
 25 un VH3 natural. En una modalidad, una variante VH3 comprende una secuencia de un VH3 de origen natural capaz de unirse a la proteína A y que además comprende al menos una mutación de aminoácido, que suprime su capacidad para unirse a la proteína A. En una modalidad, una variante de VH3 que se une a la proteína A comprende una secuencia de
 30 un VH3 de origen natural incapaz de unirse a la proteína A, y además comprende al menos una mutación de aminoácido. En tal modalidad, la(s) mutación(es) es(n) responsable(s) de que el dominio VH3 adquiera la capacidad de unirse a la proteína A, es decir la(s) mutación(es) contribuye(n) a la generación de un dominio de unión a la proteína A que no estaba presente de forma natural.

En una modalidad, una variante de VH3 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12
 35 mutaciones de aminoácidos. En una modalidad, una variante de VH3 comprende una

mutación en la posición 15, 17, 19, 57, 59, 64, 65, 66, 68, 70, 81 u 82 en la VH3, numerados según Kabat y como se describe, por ejemplo, en Graille *et al.*, 2000, PNAS, 97(10): 5399–5404). La mutación puede ser una sustitución, una delección o una inserción. En una modalidad, la variante VH3 comprende una sustitución en la posición 15, 17, 19, 57, 59, 64, 65, 66, 68, 70, 81 u 82 en la VH3, numerados según Kabat.

VH1, VH2, VH4, VH5 y VH6 de origen natural no se unen a la proteína A. En una modalidad, un dominio V_H que no se une a la proteína A es un VH1. En una modalidad, un dominio V_H que no se une a la proteína A es un VH2. En una modalidad, un dominio V_H que no se une a la proteína A es un VH4. En una modalidad, un dominio V_H que no se une a la proteína A es un VH5. En una modalidad, un dominio V_H que no se une a la proteína A es un VH6.

Composiciones farmacéuticas, dosis y regímenes de dosificación

Un anticuerpo multiespecífico de la invención se puede proporcionar en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica normalmente será estéril y normalmente incluirá un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utiliza en la presente, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El vehículo puede ser adecuado para uso parenteral, p. ej., vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. Alternativamente, el vehículo puede ser adecuado para la administración no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal. El vehículo puede ser adecuado para la administración oral. Según la vía de administración, el modulador se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto

toxicológico no deseado. Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables comprenden vehículos o diluyentes acuosos.

- 5 Los ejemplos de vehículos acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, agua tamponada y solución salina. Los ejemplos de otros vehículos incluyen etanol, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. En
- 10 muchos casos, será deseado incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

- Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una
- 15 solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender ingredientes activos adicionales.
- 20

- También están dentro del alcance de la presente invención los kits que contienen anticuerpos o agentes moduladores de la invención y las instrucciones de uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un agente terapéutico o profiláctico adicional como se discutió anteriormente.

- 25 Los moduladores y/o anticuerpos de la invención o formulaciones o composiciones de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

- En aplicaciones terapéuticas, los compuestos se administran a un sujeto que ya padece un
- 30 trastorno o condición como los descritos anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la condición o uno o más de sus síntomas. Tal tratamiento terapéutico puede dar como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad o un aumento en la frecuencia o duración de los períodos sin síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "cantidad
- 35 terapéuticamente eficaz".

En aplicaciones profilácticas, las formulaciones se administran a un sujeto en riesgo de sufrir un trastorno o condición como se describe anteriormente, en una cantidad suficiente para prevenir o reducir los efectos posteriores de la condición o uno o más de sus síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "cantidad profilácticamente eficaz". Las cantidades efectivas para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión así como del peso y estado general del sujeto.

Un sujeto para la administración puede ser un ser humano o un animal no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. La administración a seres humanos es típica.

Un anticuerpo/modulador o composición farmacéutica de la invención puede administrarse a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los ejemplos de vías de administración para compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección. Alternativamente, un anticuerpo/agente modulador o composición farmacéutica de la invención puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal. El anticuerpo/agente modulador o composición farmacéutica de la invención puede ser para administración oral.

Un médico experto puede determinar una dosificación adecuada de un anticuerpo/agente modulador o composición farmacéutica de la invención. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración de la tratamiento, otras drogas, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso,

condición, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Una dosis adecuada puede estar, por ejemplo, en el rango de alrededor de 0,01 µg/kg a
 5 alrededor de 1000 mg/kg de peso corporal, típicamente de alrededor de 0,1 µg/kg a
 alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, del paciente a tratar. Por ejemplo, una
 dosificación adecuada puede ser de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 10
 mg/kg de peso corporal por día o de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5
 mg/kg de peso corporal por día.

10

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima
 deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una
 sola dosis, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se
 puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la
 15 situación terapéutica. La forma de unidad de dosificación como se usa aquí se refiere a
 unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar;
 cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para
 producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico
 requerido.

20

La administración puede ser en dosis únicas o múltiples. Se pueden administrar múltiples
 dosis a través de la misma vía o de vías diferentes y en el mismo lugar o en lugares
 diferentes. Alternativamente, las dosis pueden ser a través de una formulación de liberación
 sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y
 25 la frecuencia pueden variar según la vida media del antagonista en el paciente y la duración
 del tratamiento deseado.

Como se mencionó anteriormente, los moduladores/anticuerpos o las composiciones
 farmacéuticas de la invención se pueden coadministrar con uno u otros agentes
 30 terapéuticos.

La administración combinada de dos o más agentes se puede lograr de varias formas
 diferentes. Ambos pueden administrarse juntos en una sola composición o pueden
 administrarse en composiciones separadas como parte de una terapia combinada. Por
 35 ejemplo, uno puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que el otro.

Indicaciones terapéuticas

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para tratar, prevenir o mejorar cualquier enfermedad que esté asociada con la actividad de IL-13 y/o IL-17A y/o IL-17F; por ejemplo, cualquier condición que resulte total o parcialmente de la señalización a través de un receptor de IL-13, IL-17A y/o IL-17F.

Tales enfermedades incluyen cánceres primarios y metastásicos, incluyendo carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estomago, páncreas, hígado, vesícula y conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), aparato genital femenino (incluyendo cérvix, útero, y ovarios así como también coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), aparato genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de células germinales), glándulas endócrinas (incluyendo las glándulas tiroides, suprarrenales y pituitaria), y piel, así como también hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo los derivados del hueso y tejidos blandos así como también sarcoma de Kaposi), tumores del cerebro, nervios, ojos, y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas, y meningiomas), tumores sólidos derivados de neoplasias malignas hematopoyéticas tales como leucemias, y linfomas (tanto linfomas de Hodgkin como de no Hodgkin), artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus insulín dependiente, tiroiditis, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis esclerodermia, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo del trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria aguda o crónica asociada con el trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Schoenlein-Henoch, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis crónica activa, uveítis, shock séptico, síndrome de shock tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, enfermedades malignas, insuficiencia cardíaca, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II esporádica, Síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria (agudo) del adulto, alopecia, alopecia areata, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía por colitis ulcerosa, sinovitis enteropática, clamidia, artropatía asociada a yersinia y salmonella, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollosa autoinmune, pénfigo

vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica,

5 enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis B, hepatitis C, inmunodeficiencia común variable (hipogammaglobulinemia común variable), miocardiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial posinflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad del tejido conectivo asociada

10 a la enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad mixta del tejido conjuntivo asociada a la enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica asociada a la enfermedad pulmonar intersticial, reumatoideartritis asociada a la enfermedad pulmonar intersticial, lupus eritematoso sistémico asociado a la enfermedad pulmonar, dermatomiositis/polimiositis asociada a la enfermedad pulmonar, enfermedad de Sjogren asociada a la enfermedad pulmonar,

15 espondilitis anquilosante asociada a la enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, hemosiderosis asociada a la enfermedad pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrativa linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial posinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis

20 autoinmune tipo 1 (hepatitis autoinmune o lupoide clásica), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis autoinmune tipo 2), hipoglucemia mediada por autoinmunidad, resistencia a la insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunológica aguda asociada a trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica asociada al trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2,

25 leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conectivo, Síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa,

30 fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, enfermedad/arteritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune bocio (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, vitíligo enfermedad hepática

35 aguda, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por alcohol, colestática, enfermedad hepática idiosincrásica, hepatitis inducida por fármacos, esteatohepatitis no alcohólica, alergia, infección por estreptococos del grupo B (GBS),

trastornos mentales, depresión, esquizofrenia, enfermedades mediadas por Tipo Th2 y Tipo Th1, dolor agudo y crónico, diferentes formas de dolor, cánceres, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de recto, neoplasias hematopoyéticas,

5 leucemia, linfoma, abetalipoproteinemia, acrocianosis, procesos infecciosos o parasitarios agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia por SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica de contacto, rinitis

10 alérgica (incluyendo rinitis alérgica estacional), rinitis no alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de alfa-I-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de las células del asta anterior, terapia anti-cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad a los antirreceptores, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arterioesclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia,

15 fibrilación auricular (sostenida o paroxística), aleteo auricular, bloqueo auriculoventricular, linfoma de células B, rechazo de injerto óseo, rechazo del trasplante de médula ósea (TMO), bloqueo de rama, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta inflamatoria por bypass cardiopulmonar, rechazo del trasplante de cartílago, degeneraciones corticales del

20 cerebelo, trastornos del cerebelo, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados a la quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (LMC), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (LLC), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), intoxicación crónica por salicilatos, carcinoma colorrectal, insuficiencia cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale,

25 enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de CreutzfeldtJakob, cultivo negativo sepsis, fibrosis quística, trastornos asociados a la terapia con citocinas, demencia pugilística, enfermedades desmielinizantes, dengue hemorrágico, dermatitis, afecciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerótica diabética, enfermedad difusa con cuerpos de Lewy, miocardiopatía congestiva dilatada, trastornos de

30 los ganglios basales, síndrome de Down en la mediana edad, trastornos del movimiento inducidos por fármacos inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a medicamentos, eccema, encefalomielitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por el virus de Epstein-Barr, eritromelalgia, extrapiramidal y trastornos cerebelosos, linfohistiocitosis hemofagocítica familiar, rechazo

35 del implante de timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, glomerulonefritis, rechazo del injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis por gramnegativos, sepsis por grampositivos, granulomas

debidos a organismos intracelulares, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hallervorden-Spatz, tiroiditis de Hashimoto, fiebre del heno, rechazo de trasplante de corazón, hemocromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, hemorragia, hepatitis A, arritmias del haz de His, infección

5 por VIH/neuropatía por VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos del movimiento hipercinético, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, hipertensión, trastornos del movimiento hipocinético, evaluación del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpos, astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación

10 de la aorta, influenza A, exposición a radiaciones ionizantes, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión por isquemia-reperfusión, accidente cerebrovascular isquémico, reumatoideartritis juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, Sarcoma de Kaposi, rechazo de trasplante de riñón, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo del trasplante hepático, linfedema, paludismo, linfoma maligno,

15 histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, metabólica/idiopática, migraña, trastorno multisistémico mitocondrial, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, gammapatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones multisistémicas (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), mycobacterium avium intracelulare, mycobacterium tuberculosis, síndrome mielodisplásico, infarto de

20 miocardio, trastornos isquémicos miocárdicos, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofas musculares neurogénicas, fiebre neutropénica, linfoma no hodgkin, oclusión de la aorta abdominal y sus ramas, trastornos arteriales oclusivos, terapia okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo

25 de trasplante de páncreas, carcinoma de páncreas, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, rechazo del trasplante de paratiroides, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericárdica, enfermedad aterosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía por Pneumocystis carinii, pneumonia, Síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía,

30 gammapatía monoclonal, y síndrome de cambios cutáneos), síndrome post perfusión, síndrome post bomba, síndrome post cardiectomía MI, preeclampsia, parálisis supranuclear progresiva, hipertensión pulmonar primaria, radioterapia, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia regular de QRS estrecho, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, miocardiopatía restrictiva,

35 sarcomas, corea senil, demencia senil tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, shock, anemia de células falciformes, rechazo del aloinjerto de piel, síndrome de cambios cutáneos, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas,

ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelosas, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafalaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, reumatoideartritis juvenil de inicio sistémico, telangiectasia ALL de células T o FAB,

5 tromboangeítis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, valvulopatías, varices, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemofagocítico asociado a signos vitales, síndrome de Wernicke-Korsakoff,

10 enfermedad de Wilson, rechazo del xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, síndromes coronarios agudos, polineuritis idiopática aguda, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, isquemia aguda, enfermedad de Still del adulto, anafilaxia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia aplásica, eccema atópico, dermatitis atópica, dermatitis autoinmune, trastorno autoinmune asociado con la infección por estreptococos, enteropatía

15 autoinmune, pérdida auditiva autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), miocarditis autoinmune, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, blefaritis, bronquiectasias, penfigoide ampolloso, enfermedad cardiovascular, síndrome antifosfolípido catastrófico, enfermedad celíaca, espondilosis cervical, isquemia crónica, penfigoide cicatricial, síndrome clínicamente aislado (cis) con riesgo de esclerosis múltiple, trastorno

20 psiquiátrico de aparición en la infancia, dacriocistitis, dermatomiositis, retinopatía diabética, hernia de disco, prolapso de disco, anemia hemolítica inmune inducida por fármacos, endometriosis, endoftalmitis, epiescleritis, eritema multiforme, eritema multiforme mayor, penfigoide gestacional, síndrome de Guillain-Barré (GBS), síndrome de Hughes, enfermedad de Parkinson idiopática, neumonía intersticial idiopática, alergia mediada por

25 IgE, anemia hemolítica inmune, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad inflamatoria ocular infecciosa, enfermedad inflamatoria desmielinizante, enfermedad inflamatoria del corazón, enfermedad inflamatoria del riñón, IPF/UIP, iritis, queratitis, queratoconjuntivitis sicca, enfermedad de Kussmaul o enfermedad de Kussmaul-Meier, parálisis de Landry, histiocitosis de células de Langerhans, livedo reticularis, degeneración macular, poliangeitis

30 microscópica, morbus bechterev, trastornos de la neurona motora, penfigoide de las mucosas, insuficiencia orgánica múltiple, miastenia grave, síndrome mielodisplásico, miocarditis, trastornos de las raíces nerviosas, neuropatía, hepatitis no A no B, neuritis óptica, osteólisis, ARJ pauciarticular, enfermedad oclusiva arterial periférica (PAOD), enfermedad vascular periférica (PVD), enfermedad arterial periférica, enfermedad (PAD),

35 flebitis, poliarteritis nodosa (o periarteritis nodosa), policondritis, poliosis, ARJ poliarticular, síndrome de deficiencia poliendocrina, polimiositis, polimialgia reumática (PMR), primarias parkinsonismo, prostatitis, aplasia pura de glóbulos rojos, insuficiencia suprarrenal primaria,

neuromielitis óptica recurrente, reestenosis, cardiopatía reumática, sapho (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis, y osteítis), amiloidosis secundaria, shock pulmonar, escleritis, ciática, insuficiencia suprarrenal secundaria, enfermedad del tejido conectivo asociada a silicona, dermatosis de sneddon-wilkinson, espondilitis anquilosante, síndrome de Stevens-Johnson (SJS), arteritis temporal, retinitis toxoplásmica, necrólisis epidérmica tóxica, mielitis transversa, TRAPS (receptor del factor de necrosis tumoral, reacción alérgica tipo 1, diabetes tipo II, urticaria, neumonía intersticial habitual (NIU), vasculitis, conjuntivitis vernal, retinitis viral, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (síndrome VKH), degeneración macular húmeda, o cicatrización de heridas, asma sensible a la aspirina, asma atópica, eccema crónico de manos, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedad celíaca, Síndrome de Churg-Strauss (periarteritis nodosa más atopia), síndrome de mialgia eosinofílica, síndrome hipereosinofílico, reacciones edematosas incluyendo angioedema episódico, infecciones por helmintos, dermatitis oncocercal, trastornos gastrointestinales asociados a eosinófilos, esofagitis eosinofílica, gastritis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, enteritis eosinofílica, colitis eosinofílica, micropoliposis nasal y poliposis, alergia alimentaria, intolerancia a la aspirina, y apnea obstructiva del sueño, asma crónica, enfermedad de Crohn y fibrosis endomiocárdica, cáncer (por ejemplo, glioblastoma (como el glioblastoma multiforme), linfoma no Hodgkin (LNH)), fibrosis, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis pulmonar (incluyendo idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) y fibrosis pulmonar secundaria a esclerosis), EPOC, y fibrosis hepática.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención pueden ser especialmente útiles para tratar o prevenir la dermatitis atópica, el eccema crónico de las manos, la micropoliposis o poliposis nasal, la alergia alimentaria o la esofagitis eosinofílica. Por lo tanto, en una modalidad, se proporciona un anticuerpo multiespecífico o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico o la composición farmacéutica se proporcionan para su uso en un método para tratar la dermatitis atópica, el eccema crónico de las manos, la micropoliposis o poliposis nasal, la alergia alimentaria o la esofagitis eosinofílica. En una modalidad, la invención proporciona un método para tratar o prevenir la dermatitis atópica, el eccema crónico de las manos, la micropoliposis o poliposis nasal, la alergia alimentaria o la esofagitis eosinofílica, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo multiespecífico o una composición farmacéutica en necesidad de ello.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1. Generación y selección del anticuerpo terapéutico anti-IL-13 CA650**

5 Las ratas se inmunizaron con IL-13 humana purificada (Peprotech) o fibroblastos de rata que expresaban IL-13 humana (que expresaban aproximadamente 1 ug/mL en el sobrenadante del cultivo), o en algunos casos, una combinación de los dos. Después de 3 a 6 inyecciones, los animales se sacrificaron y se recolectó PBMC, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. Se controló la unión de sueros a IL-13 humana en ELISA y también la
 10 capacidad de neutralizar hIL-13 en el ensayo de células reporteras HEK-293 IL-13R-STAT-6 (ensayo HEK-Blue, Invivogen).

Se prepararon cultivos de células B y primero se examinaron los sobrenadantes en cuanto a su capacidad para unirse a hIL-13 en un ensayo basado en perlas en un ensayo FMAT de
 15 Applied Biosystems. Este fue un ensayo homogéneo que utilizó IL-13 humana biotinilada recubierta con perlas de estreptavidina y un conjugado de Fc-Cy5 anti-rata de cabra como agente revelador. A continuación, los positivos de este ensayo pasaron a un ensayo de células reporteras HEK-293 IL-13R-STAT-6 (ensayo HEK-Blue, Invivogen) para identificar los neutralizadores. A continuación, se perfilaron los sobrenadantes neutralizantes en el
 20 Biacore para estimar la tasa de desactivación y también para caracterizar el modo de acción de la neutralización. La neutralización se clasificó como bin1 o bin 2. Bin 1 representa un anticuerpo que se une a la IL-13 humana y previene la unión de IL-13R α 1 y, como resultado, también bloquea la unión de IL-4R. Los anticuerpos bin 1 también pueden evitar la unión de IL-13 a IL-13R α 2. Bin 2 representa un anticuerpo que se une a hIL-13 de tal
 25 manera que permite la unión a IL-13R α 1 pero evita el reclutamiento de IL-4R en el complejo. Se seleccionaron anticuerpos que operaban a través de bin 1.

Se identificaron aproximadamente 7500 positivos específicos de IL-13 en el cribado FMAT primario de un total de 27 x 100 placas de experimentos SLAM. 800 pozos demostraron
 30 neutralización en el ensayo HEK-blue. 170 pozos tuvieron perfiles Biacore deseables, es decir anticuerpos bin 1 con tasas de rechazo $< 5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Se intentó la clonación de la región variable a partir de estos 170 pozos y 160 produjeron con éxito focos fluorescentes. 100 pozos generaron pares de genes de región variable de cadena pesada y ligera después de la transcripción inversa (RT)-PCR. Estos genes de la región V se clonaron como
 35 anticuerpos IgG1 de ratón de longitud completa y se volvieron a expresar en un sistema de expresión transitoria HEK-293. El análisis de secuencias reveló que hubo 27 familias únicas

de anticuerpos IL-13 anti-humano. Luego, estos anticuerpos recombinantes se volvieron a analizar para determinar su capacidad para bloquear la hIL-13 recombinante (derivada de *E. coli* y de mamífero), la variante recombinante hIL-13 (R130Q) (derivada de *E. coli*), hIL- 13 tipo salvaje natural y variante (derivada de donante humano) e IL-13 de *Cynomolgus* (derivada de mamífero) en el ensayo basado en células. También se analizó la capacidad de los anticuerpos recombinantes para unirse a la IL-13 humana variante (R130Q) y a IL-13 de *Cynomolgus* en el Biacore. Siguiendo esta caracterización, se seleccionaron familias de anticuerpos para cumplir con nuestros criterios, es decir, anticuerpo sub-100 pM con disminución mínima de potencia y afinidad para todas las preparaciones de IL-13 humana y de *Cynomolgus*.

En función de la potencia de neutralización, afinidad y contenido de donantes en injertos humanizados (ver a continuación), se seleccionó CA650 humanizado para una mayor progresión.

EJEMPLO 2. Humanización de anticuerpo CA650

El anticuerpo 650 se humanizó injertando las CDR de la región V de rata en los marcos de la región V de anticuerpos de línea germinal humana. Con el fin de recuperar la actividad del anticuerpo, también se retuvieron en la secuencia humanizada una serie de residuos marco de la región V de rata. Estos residuos se seleccionaron utilizando el protocolo descrito por Adair *et al.* (1991) (Humanised antibodies. WO91/09967). Las alineaciones de las secuencias de la región V del anticuerpo de rata (donante) con las secuencias de la región V de la línea germinal humana (aceptor) se muestran en la Figura 1, junto con las secuencias humanizadas diseñadas. (Figura 1(A) injerto de cadena ligera 650 y Figura 1(B) injerto de cadena pesada 650). Las CDR injertadas de la secuencia donante a la aceptora están definidas por Kabat (Kabat *et al.*, 1987), con la excepción de CDR-H1, donde se usa la definición combinada de Chothia/Kabat (ver Adair *et al.*, 1991 Humanised antibodies. WO91/09967).

Los genes que codifican las secuencias iniciales de la región V se diseñaron y construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizado de Entelechon GmbH, y se modificaron para generar las versiones injertadas gL8 y gH9 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. La secuencia gL8 se subclonó en el vector de expresión de cadena ligera humana pVhCK de UCB Celltech, que contiene ADN que codifica la región constante C-

Kappa humana (alotipo Km3). La secuencia de gH9 se subclonó en pVhg1Fab, que contiene ADN que codifica la región constante CH₁ gamma-1 de cadena pesada humana.

La región V humana IGKV1-39 más la región J de JK2 (International Immunogenetics

Information System® IMGT, <http://www.imgt.org>) se eligió como el aceptor de las CDR de cadena ligera del anticuerpo 650. Los residuos del marco de la cadena ligera en el injerto gL8 son todos del gen de la línea germinal humana, con la excepción de los residuos 58 y 71 (numeración según Kabat), donde se conservaron los residuos del donante Isoleucina (I58) y Tirosina (Y71), respectivamente. La retención de los residuos I58 e Y71 fue esencial para la potencia total del anticuerpo humanizado.

Se eligió la región V humana IGHV1-69 más la región J de JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org>) como aceptor de las CDR de cadena pesada del anticuerpo 650. Los residuos del marco de la cadena pesada en los injertos gH9 son todos del gen de la línea germinal humana, con la excepción de los residuos 67, 69 y 71 (numeración según Kabat), donde los residuos donantes Alanina (A67), Fenilalanina (F69) y Valina (V71) se mantuvieron, respectivamente. La retención de los residuos A67, F69 y V71 fue esencial para la potencia total del anticuerpo humanizado. El residuo de glutamina en la posición 1 del marco humano se reemplazó con ácido glutámico (E1) para proporcionar la expresión y purificación de un producto homogéneo: la conversión de glutamina en piroglutamato en el extremo N-terminal de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos está ampliamente documentada. Las secuencias de injerto variables seleccionadas finales gL8 y gH9 se muestran en la Figura 1(A) y la Figura 1(B) respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos y de ADN que codifican las CDR, las regiones variables pesadas y ligeras, los formatos scFv y dsscFV del anticuerpo 650 se muestran en la Figura 2.

EJEMPLO 3. Generación de anticuerpo anti-IL-17AF 496.g3

La producción del anticuerpo CA028_00496.g3 (también denominado en el presente documento anticuerpo 496.g3) contra la IL-17A humana y la IL-17F humana se ha descrito previamente en el documento WO2012/095662. El anticuerpo se une al heterodímero humano IL-17A, IL-17F e IL-17A/F con afinidad pM. Las secuencias de aminoácidos y ADN que codifican las CDR, las regiones variables pesadas y ligeras y la cadena ligera y la cadena pesada del formato Fab del anticuerpo 496.g3 se muestran en la Figura 2. Las

regiones constantes Fab 496.g3 (unión a IL-17A/F) comprendían la región constante C-kappa humana (alotipo K1m3) y la región constante y bisagra gamma-1 CH₁ humana (alotipo G1m17).

5

EJEMPLO 4. Generación de anticuerpo anti-albúmina humana 645

La producción de anticuerpo anti-albúmina humana 645 se ha descrito previamente en el documento WO2013/068571. Las secuencias de aminoácidos y de ADN que codifican las CDR, las regiones variables pesadas y ligeras, los formatos scFv y dsscFV del anticuerpo 645 se muestran en la Figura 2.

10

EJEMPLO 5. Anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF - construcción de plásmidos transitorios y expresión en células.

15

Se diseñaron anticuerpos multiespecíficos con la región V anti-IL-17AF (496.g3) fijada en la posición Fab; la región V de antialbúmina (645gL4gH5) y la IL-13 (1539gL8gH9) se reformatearon en scFv unido por disulfuro en la orientación HL (dsHL) y se unieron a los extremos C de las respectivas regiones constantes de cadena ligera y pesada del Fab a través de enlazadores ricos en glicina-serina de 11 aminoácidos. (Figura 7). Los aminoácidos y las secuencias de ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo multiespecífico se muestran en la Figura 2.

20

Los genes de la cadena ligera y de la cadena pesada se clonaron de forma independiente en vectores de expresión de mamíferos para una expresión transitoria bajo el control de un promotor de hCMV. Se transfectaron proporciones iguales de ambos plásmidos en la línea celular CHO-S XE (UCB) utilizando el kit comercial de expresión transitoria ExpiCHO expifectamina (Thermo Scientific). Los cultivos se incubaron en botellas giratorias Corning con tapas ventiladas a 37 °C, 8,0 % de CO₂, 190 rpm. Después de 18-22 h, los cultivos se alimentaron con los volúmenes apropiados de potenciador de CHO e insumos para el método HiTiter según lo proporcionado por el fabricante. Los cultivos se reincubaron a 32 °C, CO₂ al 8%, 190 rpm durante 10 a 12 días más. El sobrenadante se recogió mediante centrifugación a 4000 rpm durante 1 hora a 4 °C antes de la esterilización por filtración a través de un filtro de 0,45 µm seguido de un filtro de 0,2 µm. Los títulos de expresión se cuantificaron mediante HPLC de proteína G usando una columna de proteína G GE HiTrap

25

30

35

de 1 ml (GE Healthcare) y estándares Fab producidos internamente. El título de la expresión se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Títulos de expresión de la expresión transitoria en la línea celular CHO S-XE

Anticuerpo	concentración (mg/L)
Anticuerpo multi-específico IL-17AF-IL-13	160

5

EJEMPLO 6. Anticuerpo multi-específico IL-13/IL-17AF - desarrollo de líneas celulares mamíferas.

- 10 Para demostrar la expresión estable del anticuerpo multiespecífico de IL-13/IL-17AF, se creó una línea celular mamífera de expresión estable. Se transfectó una línea celular CHO con un vector que contenía 496.g3 Fab, 1539gH9gL8 dsscFv HL (LC, INS0025609), 645gH5gL4 dsscFv HL (HC, INS0025306) y un marcador seleccionable. Las líneas celulares se clonaron y evaluaron para ajustarse a un proceso de fabricación adecuado.
- 15 Para evaluar la calidad y cantidad de la proteína y garantizar que se seleccionó la línea celular óptima, la línea celular se evaluó en un modelo a pequeña escala de un biorreactor de lote alimentado de fabricación. Se seleccionó una línea celular CHO que expresaba el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF a más de 1,8 g/L y más del 75% de monómero.

20

EJEMPLO 7. Proceso de purificación para el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.

- 25 La proteína de anticuerpo multiespecífico se purificó mediante un paso de captura de proteína A nativa seguido de un paso de pulido por exclusión de tamaño preparativo. Los sobrenadantes clarificados de la expresión de CHO transitoria estándar se cargaron en una columna MabSelect (GE Healthcare) dando un tiempo de contacto de 5 min y se lavaron con amortiguador de unión (20 mM de Hepes pH 7,4 + 150 mM de NaCl). El material unido se eluyó con una etapa de elución de citrato de sodio 0,1 M pH 3,1 y se neutralizó con 2M
- 30 de Tris/HCl pH 8,5 y se cuantificó por absorbancia a 280 nm.

Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño (SE-UPLC) para determinar el estado de pureza del producto eluido. El anticuerpo (~2 µg) se cargó en una columna BEH200, 200 Å, 1,7 µm, 4,6 mm DI x 300 mm (Waters ACQUITY) y se reveló con un gradiente isocrático de 0,2 M de fosfato pH 7 a 0,35 ml/min. La detección continua fue por absorbancia a 280 nm y detector de fluorescencia multicanal (FLR) (Waters). Se encontró que el anticuerpo multiespecífico eluido era 72 % de monómero.

Las muestras neutralizadas se concentraron usando un concentrador Amicon Ultra-15 (membrana de corte de peso molecular de 10 kDa) y se centrifugaron a 4000xg en un rotor basculante. Las muestras concentradas se aplicaron a una columna XK16/60 Superdex200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS, pH 7,4 y se relevaron con un gradiente isocrático de PBS, pH 7,4 a 1 ml/min. Las fracciones se recopilaron y analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna BEH200, 200 Å, 1,7 µm, 4,6 mm DI x 300 mm (Aquity) y se desarrollaron con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M pH 7 a 0,35 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm y detector de fluorescencia multicanal (FLR) (Waters). Las fracciones de monómero seleccionadas se agruparon, se filtraron en condiciones estériles de 0,22 µm y las muestras finales fueron analizadas para determinar la concentración mediante escaneo A280 en DropSense96 (Trinean). El nivel de endotoxina fue inferior a 1,0 EU/mg según lo evaluado por el sistema de prueba portátil EndoSafe® de Charles River con cartuchos de prueba de lisado de amebocitos de Limulus (LAL).

El estado del monómero del anticuerpo multiespecífico final se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna BEH200, 200 Å, 1,7 µm, 4,6 mm DI x 300 mm (Aquity) y se reveló con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M pH 7 a 0,35 ml/min, con detección por absorbancia a 280nm y detector de fluorescencia multicanal (FLR) (Waters). Se encontró que el anticuerpo multiespecífico final era >99% monomérico, como se muestra en la Figura 3(A).

Para el análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), las muestras se prepararon agregando 4 tampones de muestra de x Novex NuPAGE LDS (Life Technologies) y bien sea agente reductor de muestra de 10X NuPAGE (Life Technologies) o N-etilmaleimida 100 mM (Sigma -Aldrich) a ~ 5 µg de proteína purificada y se calentaron a 100 °C durante 3 min. Las muestras se cargaron con un gel de SDS-poliacrilamida en Novex 4-20% Tris-glicina 1,0 mm en 10 pocillos (Life Technologies) y se separaron a un voltaje constante de 225 V durante 40 min en tampón de funcionamiento Tris-glicina SDS (Life Technologies). Se utilizaron como estándares los estándares de

proteína de rango amplio Novex Mark12 (Life Technologies). El gel se tiñó con Coomassie Quick Stain (Generon) y se destiñó en agua destilada.

En SDS-PAGE no reductora, el anticuerpo multiespecífico, de peso molecular teórico (MW) de ~100 kDa, migró a ~120 kDa. Cuando se redujo la proteína del anticuerpo multiespecífico, ambas cadenas migraron a una velocidad de movilidad cercana a sus respectivos PM teóricos, cadena pesada (HC) ~52 kDa y cadena ligera (LC) ~51 kDa. Las bandas adicionales en el gel no reducido a ~45 - 50 kDa son LC y HC "libres" sin el enlace disulfuro en la porción Fab de la molécula, estas no migran a la misma posición que LC y HC en el carril 2 debido a que no se reducen por completo. (Figura 3(B)).

EJEMPLO 8. Unión al antígeno de la molécula de anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.

(i) Afinidad de unión al antígeno

La cinética de unión de IL-13, IL-17A, AF, F y albúmina humana y de *Cynomolgus* se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore T200).

Se inmovilizó un anticuerpo específico de fragmento F(ab')₂ de IgG antihumano de cabra (Jackson ImmunoResearch) en un chip sensor CM5 mediante química de acoplamiento de amina a un nivel de aproximadamente 5000 RU. Cada ciclo de análisis consistió en la captura de la molécula de anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF/albúmina en la superficie anti-F(ab')₂, inyección de analito (a 25 °C a un caudal de 30 µl por minuto) seguido por la regeneración de la superficie. Se inyectaron analitos humanos y de *Cynomolgus* en diluciones en serie de 2 veces en tampón de ejecución HBS-EP+ (GE Healthcare) a concentraciones de 10 nM a 0,3125 nM para IL-13, 5 nM a 0,156 nM para IL-17A, AF, F y 100 nM a 3,125 nM para albúmina. Los antígenos se prepararon internamente, con la excepción de IL-13 humana (R&D Systems), IL-13 *Cynomolgus* (Sinobiologicals) y albúmina sérica humana (Jackson ImmunoResearch). Se incluyeron inyecciones de amortiguador en blanco para restar el ruido y la deriva del instrumento.

Los parámetros cinéticos se determinaron usando un modelo de unión 1:1 usando el software de evaluación Biacore T200 (versión 3.0) y se resumen en las Tablas 2(1) y 2(2). Cuando las tasas de disociación (k_d) se midieron como inferiores a $1,0 \times 10^{-5}$, estas se

fijaron en $1,0 \times 10^{-5}$ (el límite de detección del instrumento Biacore T200 definido por el fabricante GE Healthcare) para calcular la afinidad (K_D).

Los resultados demostraron que el anticuerpo multiespecífico se unía de forma eficaz a IL-17A, IL-17AF, IL-17F, IL-13 y albúmina humana y de *Cynomolgus*.

Tabla 2(1): Constantes cinéticas de la unión del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF a antígenos humanos.

Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	n=
IL-17A humana	2.26E+06	1.57E-05	9	7
IL-17AF humana	3.70E+06	4.54E-05	15	4
IL-17F humana	1.67E+06	1.98E-04	128	7
IL-13 Humana	1.46E+06	3.84E-05	26	3
Albúmina humana	6.65E+04	1.54E-04	2508	3

Los resultados representan la media del número indicado de determinaciones.

Tabla 2(2): Constantes cinéticas de la unión del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF a antígenos *Cynomolgus*.

Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	n=
IL-17A Cyno	1.65E+06	1.24E-05	7	4
IL-17AF Cyno	2.25E+06	2.87E-05	14	4
IL-17F Cyno	1.14E+06	2.82E-04	283	4
IL-13 Cyno	9.48E+05	1.48E-04	156	3
Albúmina Cyno	8.18E+04	2.04E-04	2473	3

Los resultados representan la media del número indicado de determinaciones.

(ii) Unión simultánea a antígeno

Se usó resonancia de plasmones superficiales para demostrar que IL-17A, IL-13 y la albúmina pueden unirse simultáneamente al anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF usando formas de proteínas humanas o de *Cynomolgus*.

El formato del método para evaluar la unión simultánea de analitos al anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF fue capturar la muestra de anticuerpo en un anticuerpo específico del fragmento F(ab')₂ de IgG antihumana inmovilizada. A continuación, se inyectaron IL-13, IL-17A y la albúmina humana o de *Cynomolgus*, individualmente o en una solución mixta de los tres analitos (a 30 µl/min durante 300s) sobre el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF capturado (concentraciones finales de IL-13 30 nM, IL-17A 15 nM, albúmina 150 nM).

Al final de cada ciclo, la superficie se regeneró a un caudal de 10 µl/min usando una inyección de 60s de HCl 50mM seguida de una inyección de 30s de NaOH 5mM y una inyección final de 60s de HCl 50mM.

Se determinó la respuesta de unión de cada antígeno cuando se inyectó individualmente, y la suma de las respuestas individuales se comparó con la respuesta de unión cuando se inyectó una mezcla de los tres antígenos.

La respuesta de unión media de una mezcla de IL-17A, IL-13 y albúmina humana al anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF fue del 100% de la suma de la respuesta de unión individual (resumida en la Tabla 3), lo que indica que el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF pudo unirse de forma simultánea e independiente a cada antígeno.

Tabla 3: Unión simultánea del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF a IL-17A, IL-13 y albúmina humana

Analito	Unión, n=1 (RU)	Unión, n=2 (RU)	Unión, n=3 (RU)	Media
IL-13	12	19	19	
IL-17A	33	53	51	
Albúmina	36	60	59	
IL-13 + IL-17A + Albúmina	81	131	129	
Suma de respuestas de unión individuales	81	131	129	
Unión de la mezcla como porcentaje de las respuestas de unión individuales (%)	100	100	100	100

La respuesta de unión media de una mezcla de IL-17A, IL-13 y albúmina *Cynomolgus* al anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF fue del 97% de la suma de la respuesta de unión individual (resumida en la Tabla 4), lo que indica que el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF pudo unirse de forma simultánea e independiente a cada antígeno.

5

Tabla 4: Unión simultánea del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF a IL-17A, IL-13 y albúmina *Cynomolgus*

Analito	Unión, n=1 (RU)	Unión, n=2 (RU)	Unión, n=3 (RU)	Media
IL-13	31	30	30	
IL-17A	57	56	60	
Albúmina	63	61	60	
IL-13 + IL-17A + Albúmina	146	141	145	
Suma de respuestas de unión individuales	151	146	150	
Unión de la mezcla como porcentaje de las respuestas de unión individuales (%)	97	96	97	97

10 **EJEMPLO 9. Neutralización de IL-13 por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.**

La actividad del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF para neutralizar IL-13 se evaluó utilizando el ensayo de línea celular informadora HEK 293 Humana IL4/IL-13 SEAP. La secreción de SEAP se midió tras la activación de la vía STAT6 para evaluar las respuestas de IL-13.

15

Se obtuvieron células indicadoras HEK 293 Humana IL4/IL-13 SEAP (# hkb-il413) de Invivogen, San Diego. El cultivo, la congelación y el mantenimiento de la línea celular siguieron el protocolo del fabricante.

20

La IL-13 humana recombinante se obtuvo de R&D Systems, Minneapolis, MN. (# 213-ILB)

Las células se sembraron en placas de manera que las células tuvieran una confluencia de aproximadamente el 80% tras la estimulación en 96 pocillos de fondo plano.

25

Las células se trataron por duplicado con anticuerpos preincubados con 250 pg/ml de IL-13 durante 30 minutos a 37 °C, 5% de CO₂, 100% de humedad, antes de añadirlos a las células durante 24 horas.

- 5 Después de 24 horas, se pipetearon 20 µl de sobrenadante de la estimulación celular y se añadieron a 180 µl de Quanti-blue #rep-qbs (Invivogen, San Diego), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 10 El ensayo se desarrolló hasta que hubo un gradiente de cambio de color visible y se leyó la absorbancia utilizando un espectrofotómetro a 620 nm. Los IC₅₀ se calcularon mediante regresión no lineal utilizando el prisma Graphpad (San Diego, CA). La Figura 4 muestra un gráfico representativo del % de inhibición de la señalización de STAT6 por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.

- 15 **Tabla 5: Valor IC₅₀ para la inhibición de la señalización de STAT6 por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.**

pM	+/- SEM	ng/ml	+/- SEM	n=
4,118	1,319	0,4118	0,1319	3

- 20 **EJEMPLO 10. Efecto neutralizante del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF en las respuestas de IL-6 de los fibroblastos dérmicos humanos a IL-17A e IL-17F humana y de *Cynomolgus***

- 25 El propósito de este estudio es determinar la capacidad de neutralización del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF contra IL-17A e IL-17F humana y de *Cynomolgus* en un sistema de células primarias humanas. Se induce una respuesta proinflamatoria cuando la IL-17 está presente en combinación con otras citocinas como el TNF-α. Por lo tanto, este efecto sinérgico se aprovechó para producir un ensayo de liberación de IL-6 a partir de fibroblastos dérmicos humanos de recién nacidos normales primarios (nHDF) estimulados con IL-17 y TNF-α.

- 30 En este ensayo se midió la capacidad del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF para inhibir la liberación de IL-17 inducida por IL-6 a partir de nHDF. Específicamente, las nHDF se estimularon con IL-17A humana o de *Cynomolgus* (50 pM) o IL-17F (25 000 pM) en combinación con TNF-α (25 pM) en presencia de una titulación de anticuerpo

multiespecífico IL-13/IL-17AF (rango de concentración de 5000 pM a 0,25 pM para el estudio de IL-17A; de 500 000 pM a 25 pM para el estudio de IL-17F). Luego, se midió la respuesta de IL-6 resultante utilizando FRET homogéneo resuelto en el tiempo (HTRF).

- 5 Las células nHDF (Sigma #106-05n) se cultivaron en medios completos (DMEM + FCS al 10% + L-glutamina 2 mM) y se mantuvieron en un matraz de cultivo de tejidos usando técnicas estándar. Las células se recogieron del matraz de cultivo de tejidos usando TrypLE (Invitrogen #12605036). El TrypLE se neutralizó utilizando medio completo (45 ml) y las células se centrifugaron a 300 x g durante 3 minutos. Las células se resuspendieron en
- 10 medio completo (3-5 ml), se contaron y ajustaron a una concentración de $3,125 \times 10^4$ células/ml antes de agregarlas a la placa de ensayo de 384 pocillos (Corning #3701) a 40 µl/pocillo. Las células se incubaron durante tres horas a 37 °C/5 % CO₂, para adherirse a la placa. El anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF se diluyó en serie en medios completos en una placa de dilución de 384 pocillos (Greiner n.º 781281) hasta un rango de
- 15 concentración final de 5000 pM a 0,25 pM para la evaluación frente a IL-17A, y de 500000 pM a 25 pM para evaluación frente a IL-17F. Se prepararon mezclas de citoquinas TNF-α e IL-17 en medios completos hasta concentraciones finales de TNF-α 25 pM con bien sea IL-17A de 50 pM o IL-17F de 25.000 pM humana o de *Cynomolgus*. Luego, se añadieron 30 µl/pocillo de estas soluciones a una placa de reactivos de 384 pocillos (Greiner #781281).
- 20 Luego, se transfirieron 10 µl de la placa de dilución en serie de anticuerpos multiespecíficos IL-13/IL-17AF a la placa de reactivos que contenía 30 µl de las citocinas diluidas. Luego, se incubó el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF con la mezcla de citocinas durante una hora a 37 °C/5 % de CO₂. Después de la incubación, se transfirieron 10 µl de la placa de reactivos a la placa de ensayo que contenía células. Luego, la placa de ensayo se incubó
- 25 durante 18 horas ± 2 horas a 37 °C/5 % de CO₂. Una vez completada la incubación, el criptato de europio y los anticuerpos Alexa 665 del kit Cisbio IL-6 HTRF (Cisbio #62IL6PEB) se diluyeron en tampón de reconstitución y se mezclaron 1:1; según el prospecto del kit. Posteriormente, se añadieron 10 µl/pocillo de esta mezcla de anticuerpos a una placa blanca HTRF de 384 pocillos de bajo volumen (Greiner #784075). Luego, se transfirió el
- 30 sobrenadante de la placa de ensayo a la placa HTRF a razón de 10 µl/pocillo. Luego, la placa HTRF se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Luego, las placas HTRF se leyeron en un lector de placas Synergy Neo 2 según las instrucciones del fabricante, midiendo la fluorescencia en lecturas de 330/620 nm y 330/665 nm. Luego, los valores de la relación se calcularon usando la siguiente ecuación
- 35 $(330/665\text{nm dividido por } 330/620\text{nm}) \times 10,000$ y se usaron para determinar el porcentaje relativo de inhibición en comparación con los pocillos de control, usando Microsoft Excel. El

ajuste de la curva 4PL y el cálculo de los valores de IC₅₀ se realizaron con GraphPad Prism 7.0.

Los resultados que se muestran son la media (+/- SEM) de tres experimentos

- 5 independientes. El valor IC₅₀ del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF se calculó como 42 pM para IL-17A humana y 49 pM para IL-17A de *Cynomolgus*. El valor IC₅₀ del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF se calculó como 28,030 pM para IL-17F humana y 34,320 pM para IL-17F de *Cynomolgus*. (Figura 5).

10 **Tabla 6: Resumen de los valores de potencia, eficacia y pendiente para el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.**

Los valores se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

Ensayo	IC50 (pM)	E _{max} (%)	Pendiente
IL-17A humana	42	100	2
IL-17A <i>Cynomolgus</i>	49	100	2,4
IL-17F humana	28030	100	3,2
IL-17F <i>Cynomolgus</i>	34320	100	2,6

15 **EJEMPLO 11. Neutralización simultánea de IL-13, IL-17A e IL-17F por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF en un bioensayo de liberación NHEK CXCL1**

El propósito de este ensayo fue evaluar la capacidad del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF para neutralizar simultáneamente IL-13, IL-17A e IL-17F en un sistema celular

- 20 primario. Cuando las NHEK se tratan individualmente con IL-13 o IL-17A o IL-17F, inducen la secreción de CXCL1, una quimiocina que es responsable de reclutar células en los sitios de inflamación. En el contexto de la dermatitis atópica, existe evidencia de que CXCL1 tiene un papel en la sensibilización de las neuronas de modo que tienen un umbral de excitación más bajo. Esta observación puede ser pertinente a la picazón que experimentan
- 25 los pacientes (Yang T.B. y Kim B.S. 2019; "Pruritus in allergy and immunology" J Allergy Clin Immunol 144(2): 353–360).

Las NHEK (PromoCell, Heidelberg), se almacenaron, cultivaron y usaron según el protocolo del fabricante. Las células se sembraron en placas de manera que fueran 100%

- 30 confluentes tras la estimulación en 48 placas de pocillos de fondo plano. Las células se

preincubaron con concentraciones crecientes de anticuerpos multiespecíficos anti-IL-13, anti-IL-17A, anti-IL-17F o IL-13/IL-17AF, respectivamente, durante 30 minutos antes del tratamiento con 100 ng/mL IL-13 y 100 ng/mL IL-17A, 1 µg/mL IL-17F durante 72 horas. Después del período de tiempo transcurrido, se recogieron 50 µl de sobrenadante libre de células para la cuantificación de la concentración de CXCL1 mediante ELISA según el protocolo del fabricante (R&D Systems). El IC₅₀ de cada grupo experimental se calculó mediante regresión no lineal utilizando el prisma Graphpad (San Diego, CA).

Los resultados demostraron que el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF neutralizó simultáneamente la actividad de IL-13, IL-17A e IL-17F. (Figura 6). Cuando se normalizó el número de sitios de unión disponibles en el ensayo, el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF (81,3%) fue más eficaz que el anti-IL-17A (52,7%), el anti-IL-17F (0,7%) o anti-IL-13 (48,8%) para inhibir la liberación de CXCL1. El aumento de la concentración de anti-IL-17A, anti-IL-17F o anti-IL-13 solo no mejoró la inhibición máxima alcanzada. Los resultados destacan el beneficio de la inhibición simultánea de IL-13, IL-17A e IL-17F en comparación con la neutralización de una sola citocina.

EJEMPLO 12. Comparación de anticuerpos IL-13/IL-17 multiespecíficos con anticuerpos IL-13/IL-17 de la técnica anterior.

Introducción

En la Figura 7 se muestra un ejemplo de un anticuerpo multiespecífico de IL-13/IL-17AF según la presente invención. Consta de un dominio Fab con doble especificidad para IL-17A e IL-17F, unido a 2 dominios scFv, uno específico para IL-13 y otro para albúmina. El dominio anti-albúmina confiere al anticuerpo multiespecífico una vida media prolongada.

Abbvie (WO2013/102042A2) y Genentech (WO2015/127405A2) han descrito previamente anticuerpos biespecíficos que se unen a IL-13 e IL-17. Sin embargo, se revela poco sobre cómo se unen y en qué grado se unen a IL-13, IL-17A e IL-17F. Para comparar estas propiedades, fabricamos los anticuerpos descritos en el estado de la técnica e investigamos sus comportamientos de unión para las siguientes características:

- Afinidad por IL-13
- Interacción de la molécula con IL-13 e IL-13Rα1
- Afinidad por IL-17A

- Afinidad por IL-17F

Generación de anticuerpos comparadores

- 5 BITS7201A (Genentech) se construyó usando las secuencias descritas en el Ejemplo 6 de WO2015/127405A2.

- 10 DVD2166 y DVD2174 (Abbvie) se construyeron usando las secuencias descritas en WO2013/102042A2, Tabla 6 y Tabla 7. Estas moléculas se seleccionaron en función de la actividad notificada de los brazos individuales de los biespecíficos contra IL-13 e IL-17 que son casi equivalentes o equivalentes a sus respectivos anticuerpos originales (documento WO2013/102042A2, ejemplo 4, página 83, párrafo 0195).

- 15 Las construcciones de ADN se transfectaron en células CHO-SXE usando el protocolo de título alto del sistema de transfección ExpiCHO (ThermoFisher Scientific). Tras la recolección, los cultivos celulares se centrifugaron durante al menos una hora a 4000 RPM y los sobrenadantes se aclararon mediante filtración utilizando unidades de filtro Stericup de 0,22 µm.

20 Purificación de DVD2166 + DVD2174

- Las proteínas DVD-IgG se purificaron aplicando sobrenadantes clarificados sobre una columna MabSelect Sure de 10 ml y se lavaron con PBS, pH 7,4 para 3 volúmenes de columna (CV). Las proteínas se eluyeron de la columna con citrato de Na 0,1 M, pH 3,6, elución en etapas y se neutralizaron con Tris-HCl 2 M, pH 8,5. Las proteínas monoméricas se aislaron mediante aplicación en una columna HiLoad 16x60 Superdex de 200 pg (Sigma) equilibrada con PBS, pH 7,4. Las fracciones que contenían proteínas monoméricas se agruparon, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4°C.

Purificación de BITS7201A

- 30 Las proteínas parentales de botón y ojal fueron purificadas aplicando sobrenadantes clarificados sobre una columna MabSelect Sure de 10 mL y fueron lavadas con 3 CV de PBS, pH 7,4. Las proteínas se eluyeron de la columna con 0,1 M de citrato de Na, pH 3,6. Para neutralizar y estabilizar la proteína, las muestras se diluyeron 1:1 con tampón arginina/succinato 1 M, pH 8,7. A continuación, los anticuerpos originales se aplicaron en una columna HiLoad 26x60 Superdex de 200 pg (Sigma) equilibrada con acetato de sodio 0,15 M de amortiguador de arginina 0,5 M, pH 8,5. El material biespecífico se generó posteriormente mezclando los anticuerpos parentales en una proporción de 1:1 en

presencia de cisteamina 5 mM e incubando durante la noche a temperatura ambiente. Se realizó un segundo paso preparatorio de filtración en gel para eliminar cualquier especie de alto peso molecular del material biespecífico intercambiado mediante la aplicación a una columna HiLoad 26x60 Superdex de 200 pg equilibrada con PBS, pH 7.4. Las fracciones
 5 que contenían proteínas monoméricas biespecíficas se agruparon, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4°C.

Comparación de las características de unión

- 10 La cinética de unión de la unión de IL-13, IL-17A e IL-17F humana al anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF, denominado "UCBXXXX", y anticuerpos de la técnica anterior se evaluaron mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore T200) y comparado directamente dentro de un solo experimento. Además, se utilizó la resonancia de plasmones superficiales para evaluar si la unión del anticuerpo multiespecífico UCBXXXX
 15 de IL-13/IL-17AF o moléculas de comparación a IL-13 resultó en el bloqueo de la interacción de IL-13 con los receptores de IL-13.

Se inmovilizó un anticuerpo específico de fragmento F(ab')₂ de IgG antihumano de cabra (Jackson ImmunoResearch) en un chip sensor CM5 mediante química de acoplamiento de
 20 amina a un nivel de aproximadamente 5000 RU. Para la evaluación de la afinidad, cada ciclo de análisis compuesto por la captura de anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF o molécula biespecífica de comparación en la superficie anti-F(ab')₂ (50 a 100RU), inyección de analito (a 25 °C a un caudal de 30 µl por minuto durante 180 s), después de lo cual se controló la disociación durante 1200 s para IL-13 e IL-17A y 600 s para IL-17F. Al final de
 25 cada ciclo, la superficie se regeneró a un caudal de 10 µl/min usando una inyección de 60s de HCl 50mM seguida de una inyección de 30s de NaOH 5mM y una inyección final de 60s de HCl 50mM. Los analitos se inyectaron en diluciones en serie de 2 veces en amortiguador de ejecución HBS-EP+ (GE Healthcare) a concentraciones de 10 nM a 0,3125 nM para IL-13 y de 5nM a 0,156nM para IL-17A e IL-17F. La IL-17A y la IL-17F se
 30 prepararon internamente, mientras que la IL-13 humana se obtuvo de R&D Systems. Se incluyeron inyecciones de amortiguador en blanco para restar el ruido y la deriva del instrumento.

Los parámetros cinéticos se determinaron usando un modelo de unión 1:1 usando el
 35 software de evaluación Biacore T200 (versión 3.0). Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7: Comparación de constantes cinéticas para la unión a IL-13, IL-17A e IL-17F.

Molécula	Analito	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
UCBXXX*	IL-13	3.61E+06	1.11E-04	25,8
BITS7210A*		2.05E+06	5.69E-05	27,5
DVD2166		8.16E+05	1.50E-05	18,35
DVD2174		6.50E+05	3.66E-05	56,34
UCBXXX*	IL-17A	3.20E+06	3.45E-05	8,2
BITS7210A*		1.27E+07	1.06E-03	84,4
DVD2166		5.59E+05	7.68E-05	137,4
DVD2174		4.76E+05	1.28E-04	268,4
UCBXXX*	IL-17F	2.66E+06	2.19E-04	82,1
BITS7210A*		7.71E+06	5.74E-04	74.4
DVD2166		←←←←← Sin unión →→→→→		
DVD2174		←←←←← Sin unión →→→→→		
*Los resultados representan la media de dos repeticiones técnicas dentro del mismo experimento				

Para evaluar el bloqueo del receptor IL-13R α 1, cada molécula de anticuerpo se capturó en la superficie F(ab')₂ de IgG antihumana de cabra (hasta aproximadamente 50 a 100 RU), seguido de una inyección de IL-13 (25 nM durante 180 s a 10 μ l/ min) e inyección de IL-13R α 1 (R&D Systems, 100 nM durante 300 s a 10 μ l/min). Fueron incluidas inyecciones en blanco tanto de IL-13 como de IL-13R α 1 para sustraer cualquier respuesta de deriva o de fondo. Como se resume en la Tabla 8, UCBXXXX pudo bloquear la interacción de IL-13 con IL-13R α 1, mientras que las moléculas BITS7210A, DVD2166 y DVD 2174 no lo hicieron.

Tabla 8: Bloqueo del receptor IL-13R α 1 por anticuerpos multiespecíficos IL-13/IL-17AF y moléculas de comparación.

Molécula	Captura (RU)	Unión IL-13 (RU)	Unión IL-13R α 1 (RU)	Bloqueador IL-13R α 1
UCBXXXX	65,4	7,3	0,2	Sí
BITS7210A	86	8,6	15,7	No
DVD2166	115,2	11,7	13,8	No
DVD2174	115,3	11,3	16,2	No

Se realizó otro experimento para evaluar la capacidad del anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF para bloquear la unión a IL-13R α 1 e IL-13R α 2. En este experimento, se

capturaron aproximadamente 260 RU de UCBXXXX en un anticuerpo CH1 antihumano de ratón inmovilizado (UCB interno), seguido de una inyección de IL-13 (25 nM durante 180 s a 10 µl/min) y luego bien sea IL-13Rα1 o IL-13Rα2 (R&D Systems, 100 nM durante 300 s a 10 µl/min). Se incluyeron inyecciones en blanco de IL-13, IL-13Rα1 e IL-13Rα2 para sustraer cualquier respuesta de deriva o de fondo. Los resultados demostraron que UCBXXXX pudo bloquear la interacción de IL-13 con IL-13Rα1 e IL-13Rα2. (Tabla 9).

Tabla 9: Bloqueo de los receptores IL-13Rα1 e IL-13Rα2 por el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF.

Captura (RU)	Unión IL-13 (RU)	Unión IL-13Rα1 (RU)	Unión IL-13Rα2 (RU)
264,4	27,0	0,8	0,3

Discusión

El estudio de comparación demostró que el anticuerpo multiespecífico IL-13/IL-17AF de UCBXXXX, el anticuerpo biespecífico BITS7210A y los anticuerpos de doble dominio variable DVD2166 y DVD2174 pudieron unirse con gran afinidad a IL-13. Sin embargo, las características de las interacciones de unión fueron muy diferentes. UCBXXXX pudo bloquear la interacción de IL-13 con IL-13-Rα1, mientras que BITS7210A, DVD2166 y DVD2174 no lo hicieron.

El estudio de comparación demostró además que el anticuerpo multiespecífico UCBXXXX, el anticuerpo biespecífico BITS7210A y los anticuerpos de doble dominio variable DVD2166 y DVD2174 pudieron unirse a IL-17. De nuevo, sin embargo, las características de las interacciones de unión fueron muy diferentes. La afinidad de unión de UCBXXXX por IL-17A fue significativamente mayor que la de BITS7210A y los anticuerpos DVD. UCBXXXX y BITS7210A se unieron con una afinidad similar a IL-17F mientras que los anticuerpos DVD no pudieron unirse a IL-17F en absoluto.

La interacción entre IL-13 e IL-13Rα1, en presencia de estos anticuerpos, es importante en el contexto de la reducción de la inmunogenicidad potencial. La evidencia sugiere que la inmunogenicidad, en particular la generación de anticuerpos antifármacos (ADA), debe considerarse de cerca al investigar posibles nuevas terapias de anticuerpos biespecíficos. Un importante impulsor de la generación de ADA es el compromiso y la subsiguiente internalización del anticuerpo terapéutico con antígenos diana expresados en la superficie celular (Schellekens, H., 2002; Clin Ther. 24(11):1720-40). Los complejos de anticuerpo

terapéutico/antígeno diana internalizados se transportan a través de varios compartimentos intracelulares y pueden reciclarse de nuevo a la superficie celular o sufrir degradación (St Pierre *et al.*, 2011); lo que puede conducir a la presentación de péptidos por moléculas presentadoras de antígenos y generación de ADA.

5

En el anticuerpo biespecífico BITS7201A, la porción IL-13 F(ab) de la molécula es la misma que la del anticuerpo anti-IL-13, lebrikizumab (ver el ejemplo 6 de WO2015/127405A2). Se cree que lebrikizumab se une a IL-13 en un sitio que permite que IL-13 se una a sus receptores IL-13R α 1 e IL-13R α 2, pero bloquea la interacción con el receptor de IL-4R α (Popovic *et al.*, 2017; J Mol Biol. 429(2):208-19). Este tipo particular de interacción puede permitir la internalización del complejo anticuerpo/antígeno diana/receptor a través de IL-13R α 2 y, por lo tanto, aumentar el potencial de una respuesta inmunogénica. En un ensayo clínico de fase I, BITS7201A se asoció con una alta incidencia de anticuerpos antifármaco (ADA) y se retiró del desarrollo clínico.

15

De manera similar, los anticuerpos DVD2166 y DVD2174 de doble dominio variable no pudieron bloquear la interacción de IL-13 con IL-13-R α 1.

Para mitigar el riesgo potencial de inmunogenicidad, UCBXXXX se ha diseñado específicamente para que, al interactuar con sus respectivos antígenos diana IL-13, IL-17A e IL-17F, se evite que interactúen con los receptores en las células, lo que reduce la posibilidad de internalización, degradación y potencial para la generación de ADA. La incidencia de ADA con UCBXXXX en humanos solo se conocerá con certeza una vez que los datos clínicos estén disponibles.

25

Los datos generados anteriormente indican que el anticuerpo multiespecífico UCBXXXX de IL-13/IL-17AF tiene las propiedades correctas para convertirse en un anticuerpo terapéutico eficaz contra IL-13/IL-17, con una eficacia mejorada y un menor riesgo de inmunogenicidad.

30

REINVINDICACIONES

1. Un anticuerpo multiespecífico que se une a IL-13 humana, IL-17A humana y/o IL-17F humana, que comprende un sitio de unión a IL-13 que comprende:
una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:15 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:16 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:17 para CDR-L3, y
una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:18 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:19 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:20 para CDR-H3.
2. Un anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 1, donde el sitio de unión de IL-13 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:27 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:28.
3. Un anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 1, donde el sitio de unión de IL-13 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:31 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:32.
4. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a IL-17A humana e IL-17F humana que comprende:
una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:1 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:2 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:3 para CDR-L3, y
una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:4 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:5 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:6 para CDR-H3.
5. Un anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 4, donde el sitio de unión al antígeno que se une a la IL-17A humana y a la IL-17F humana comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:9.

6. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se une a IL-13 humana, IL-17A humana y/o IL-17F humana, que comprende:

a) una cadena polipeptídica de la fórmula (Ia):

VH-CH1-X-V1; y

b) una cadena polipeptídica de la fórmula (IIa):

VL-CL-Y-V2;

en donde:

VH representa un dominio variable de cadena pesada;

CH1 representa el dominio 1 de una región constante de cadena pesada;

X representa un enlace o enlazador;

Y representa un enlace o enlazador;

V1 representa un scFv, un dsscFv o un dsFv;

VL representa un dominio variable de cadena ligera;

CL representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como

Ckappa;

V2 representa un scFv, un dsscFv o un dsFv;

en donde la cadena polipeptídica de la fórmula (Ia) comprende un dominio de unión a la proteína A; y

en donde la cadena polipeptídica de la fórmula (IIa) no se une a la proteína A.

7. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde:

V_L y V_H comprenden un sitio de unión al antígeno que se une a la IL-17A humana y a la IL-17F humana,

V₂ comprende un sitio de unión a antígeno que se une a la IL-13 humana, y

V₁ comprende un sitio de unión a antígeno que se une a la albúmina sérica humana;

en donde

V_L comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, y

V_H comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:4 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:5 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-H3;

en donde

V₁ comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 39 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 40 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 41

para CDR-L3; y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:42 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:43 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:44 para CDR-H3; y

en donde

V_2 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 15 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 16 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 17 para CDR-L3, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:18 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:19 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:20 para CDR-H3.

8. Un anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde V_L comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:7 y V_H comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:9.
9. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde V_2 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:27 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:28.
10. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde V_2 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:31 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:32.
11. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde V_1 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 45 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 46.
12. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde V_1 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:49 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:50.

13. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de V_2 están conectadas por un enlazador, dicho enlazador que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:66.
14. Un anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 13, en donde V_2 es un scFv que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:35 o un dsscFv que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:37.
15. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en donde la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de V_1 están conectadas por un enlazador, dicho enlazador que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:68.
16. Un anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 15, en donde V_1 es un scFv que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:53 o un dsscFv que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:55.
17. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, donde Y es un enlazador que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:65.
18. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, donde X es un enlazador que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:67.
19. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 59.
20. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 61 o SEQ ID NO: 63.
21. Un anticuerpo multiespecífico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 59 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 63.
22. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo multiespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.

23. Un vector de expresión que porta el polinucleótido de la reivindicación 22.
24. Una célula huésped que comprende el vector como se define en la reivindicación 23.
25. Un método para producir el anticuerpo multiespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 24 en condiciones que permitan la producción del anticuerpo y recuperar el anticuerpo producido.
26. El método de la reivindicación 25 que comprende un paso de purificación de la proteína A.
27. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
28. Un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-21 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 27 para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
29. El anticuerpo o composición farmacéutica según la reivindicación 28, para uso en el tratamiento o prevención de dermatitis atópica, eccema crónico de manos, micropoliposis o poliposis nasal, alergia alimentaria o esofagitis eosinofílica.
30. Un método para tratar o prevenir la dermatitis atópica, el eccema crónico de manos, la micropoliposis o poliposis nasal, la alergia alimentaria o la esofagitis eosinofílica, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo multiespecífico según las reivindicaciones 1-21 o una composición farmacéutica según la reivindicación 27 a un paciente que lo necesite.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que tiene especificidad por IL-13 humana, IL-17A humana y/o IL-17F humana. La invención se refiere además a métodos para producir el anticuerpo multiespecífico y a su uso terapéutico para el tratamiento de la dermatitis atópica y otras enfermedades.