

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Una molécula de unión multiespecífica, que comprende:
 - 5 (a) una primera molécula de unión a antígeno (ABM1) que se une específicamente a un primer antígeno asociado a tumor (TAA1);
 - (b) una segunda molécula de unión a antígeno (ABM2) que se une específicamente a un segundo antígeno asociado a tumor (TAA2); y
 - (c) una tercera molécula de unión a antígeno (ABM3) que se une específicamente a
- 10 un antígeno expresado sobre una célula inmunitaria humana, opcionalmente el TAA1 y/o el TAA2 se expresa en un linfocito B canceroso.
2. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el linfocito B canceroso es un derivado de célula plasmática o un derivado de
- 15 linfocito B y opcionalmente la célula inmunitaria se selecciona de un linfocito T, una célula NK o un macrófago.
3. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el TAA1 y el TAA2 se seleccionan independientemente de BCMA y
- 20 GPRC5D y/o el antígeno expresado en la célula inmunitaria humana es CD3.
4. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las ABM1, ABM2 y ABM3 se seleccionan cada una independientemente de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, un nanocuerpo o VHH.
- 25 5. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde, la molécula de unión multiespecífica comprende cuatro cadenas polipeptídicas: una primera cadena pesada, una primera cadena ligera, una
- 30 segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera.

6. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde (1) la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada son iguales y tienen la estructura que se muestra a continuación:

- (a) $VH_a-CH1-L1-VHH_b-Fc-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}$;
- (b) $VH_a-CH1-L1-VH_{CD3}-L2-VL_{CD3}-Fc-L3-VHH_b$;
- (c) $VHH_b-L1-VH_a-CH1-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-Fc$;
- (d) $VH_a-CH1-L1-VHH_b-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-Fc$; o
- (e) $VH_a-CH1-L1-VH_b-L2-VL_b-Fc-L3-VH_{CD3}-L4-VL_{CD3}$;

y/o, (2) la primera cadena ligera y la segunda cadena ligera son iguales y tienen la estructura que se muestra a continuación: VL_a-CL ;

en donde VH_a y VL_a son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a GPRC5D, respectivamente, VHH_b es un nanocuerpo que se une específicamente a BCMA, VH_b y VL_b son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a BCMA, respectivamente, VH_{CD3} y VL_{CD3} son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a CD3, respectivamente, Fc es una región Fc de cualquier anticuerpo y L1, L2, L3 y L4 son los mismos o diferentes enlazadores, respectivamente.

7. La molécula multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde (1) la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada son diferentes y tienen la estructura que se muestra a continuación:

(a) una primera cadena pesada $VH_a-CH1-L1-VHH_b-Fc1$ y una segunda cadena pesada $VH_a-CH1-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-Fc2$; ;

(b) una primera cadena pesada $VHH_b-L1-VH_a-CH1-Fc1$ y una segunda cadena pesada $VH_a-CH1-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-Fc2$;

(c) una primera cadena pesada $VH_a-CH1-L1-VH_b-L2-VL_b-Fc1$ y una segunda cadena pesada $VH_a-CH1-L3-VH_b-L4-VL_b-Fc2-L5-VH_{CD3}-L6-VL_{CD3}$;

(d) una primera cadena pesada $VH_a-CH1-L1-VHH_b-Fc1$ y una segunda cadena pesada $VH_a-CH1-L2-VHH_b-Fc2-L3-VH_{CD3}-L4-VL_{CD3}$; o

(e) una primera cadena pesada $VHH_b-L1-VH_a-CH1-Fc1$ y una segunda cadena pesada $VHH_b-L2-VH_a-CH1-Fc2-L3-VH_{CD3}-L4-VL_{CD3}$;

opcionalmente, la primera cadena pesada tiene además una etiqueta Flag en el extremo carboxilo terminal y/o la segunda cadena pesada tiene además una etiqueta His en el extremo carboxilo terminal en los (a)-(e) mencionados anteriormente;

y, (2) la primera cadena ligera y la segunda cadena ligera son iguales y tienen la estructura que se muestra a continuación: VL_a-CL;

en donde VH_a y VL_a son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a GPRC5D, respectivamente, VHH_b es un nanocuerpo que se une específicamente a BCMA, VH_b y VL_b son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a BCMA, respectivamente, VH_{CD3} y VL_{CD3} son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a CD3, respectivamente, y L1, L2, L3, L4, L5 y L6 son los mismos o diferentes enlazadores, respectivamente.

8. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula de unión multiespecífica comprende tres cadenas polipeptídicas: una primera cadena pesada, una segunda cadena pesada y una cadena ligera, en donde (1) la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada tienen la estructura que se muestra a continuación:

(a) una primera cadena pesada VHH_b-L1-VHH_a-Fc1 y una segunda cadena pesada VH_a-CH1-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-Fc2;

(b) una primera cadena pesada VHH_b-L1-VH_{CD3}-L2-VL_{CD3}-Fc1 y una segunda cadena pesada VH_a-CH1-Fc2; o

(c) una primera cadena pesada VHH_b-Fc1 y una segunda cadena pesada VH_a-CH1-L1-VH_{CD3}-L2-VL_{CD3}-Fc2;

opcionalmente, la primera cadena pesada tiene además una etiqueta Flag en el extremo carboxilo terminal y/o la segunda cadena pesada tiene además una etiqueta His en el extremo carboxilo terminal en los (a)-(c) mencionados anteriormente;

y, (2) la cadena ligera tiene la estructura que se muestra a continuación: VL_a-CL;

en donde VH_a y VL_a son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a GPRC5D respectivamente, VHH_b es un nanocuerpo que se une específicamente a BCMA, VH_b y VL_b son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a

BCMA respectivamente, VH_{CD3} y VL_{CD3} son una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unen específicamente a CD3 respectivamente, Fc1 y Fc2 son cada uno una región Fc de cualquier anticuerpo y L1, L2 y L3 son los mismos o diferentes enlazadores, respectivamente.

5

9. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde Fc1 y Fc2 de la molécula de unión multiespecífica son diferentes, Fc1 es perilla-Fc y Fc2 es orificio-Fc; o, Fc1 es orificio-Fc y Fc2 es perilla-Fc; preferentemente, en donde la perilla-Fc comprende una mutación T366W y/o el orificio-Fc comprende una mutación T366S, L368A y/o Y407V; y, preferentemente, Fc1 y Fc2 son regiones Fc de IgG1 o IgG4.

10

10. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde Fc1 y Fc2 de la molécula multiespecífica son iguales o diferentes y tienen una mutación de aminoácido que cambia las funciones efectoras; preferentemente, la mutación que cambia las funciones efectoras comprende una mutación S228P, F234A, L234A y/o L235A; y más preferentemente, la mutación que cambia las funciones efectoras comprende: (a) una mutación L234A y/o L235A de Fc de IgG1; y/o (b) una mutación S228P, F234A y/o L235A de Fc de IgG4.

15

20

11. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde ABM3 es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada: (a) la región variable de la cadena ligera comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 54-56 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 54-56; y (b) la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 51-53 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 51-53.

25

30

12. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 10 y/o la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 9.

13. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la ABM3 es scFv.

14. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el TAA1 y el TAA2 se seleccionan del siguiente grupo:
(a) TAA1 es BCMA y TAA2 es GPRC5D; o (b) TAA1 es GPRC5D y TAA2 es BCMA.

15. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a GPRC5D en la molécula de unión multiespecífica comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada de un anticuerpo: (a) la región variable de la cadena ligera comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, el LCDR1, LCDR2 y LCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 42-44 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 42-44, la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 39-41 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 39-41; o (b) la región variable de la cadena ligera comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, el LCDR1, LCDR2 y LCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 48-50 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 48-50, la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 45-47 o que tienen 1, 2, 3 o más

inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 45-47.

5 16. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 15, en donde:

10 (a) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 6 y/o la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 5; o

15 (b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 8 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 8 y/o la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 7.

20

17. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a GPRC5D en la molécula de unión multiespecífica es Fab.

25 18. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a BCMA en la molécula de unión multiespecífica comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo, la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 27-29 como se muestra en SEQ ID NO: 30-32 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 27-29 o SEQ ID NO: 30-32.

30

19. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

20. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a BCMA es VHH.

21. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a BCMA en la molécula de unión multiespecífica comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada de un anticuerpo: (a) la región variable de la cadena ligera comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 36-38 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 36-38; y (b) la región variable de la cadena pesada comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 33-35 o que tienen 1, 2, 3 o más inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 33-35.

22. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 4 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 4 y/o la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 3 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad con SEQ ID NO: 3.

23. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la molécula de unión a antígeno que se une específicamente a BCMA es scFv.

24. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde las ABM1, ABM2 y/o ABM3 es quimérico, humanizado o completamente humanizado.

5 25. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende además un fragmento Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas; comprendiendo preferentemente un fragmento Fc de IgG1 humana o IgG4 humana.

10 26. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el fragmento Fc comprende Fc1 y Fc2 iguales o diferentes.

15 27. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el fragmento Fc tiene una mutación de aminoácido que cambia las funciones efectoras; preferentemente, la mutación del aminoácido que cambia las funciones efectoras comprende una mutación S228P, F234A, L234A y/o L235A; y más preferentemente, la mutación de aminoácidos que cambia las funciones efectoras comprende: (a) una mutación L234A y/o L235A de Fc de IgG1; y/o (b) una mutación S228P, F234A y/o L235A de Fc de IgG4.

20 28. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 27, en donde los diferentes Fc1 y Fc2 tienen mutaciones de aminoácidos que promueven la heterodimerización; preferentemente, las mutaciones de aminoácidos que promueven la heterodimerización comprenden una mutación de perilla en orificio (KIH); y más preferentemente, la mutación de perilla en orificio comprende: (a) una mutación T366W
25 en cualquier región Fc; y (b) una mutación T366S, L368A y/o Y407V en otra región Fc.

29. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el Fc1 comprende además una etiqueta His y el Fc2 comprende además una etiqueta Flag; o el Fc1 comprende además una etiqueta Flag y el Fc2 comprende además
30 una etiqueta His.

30. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 29, en donde la molécula de unión multiespecífica es trivalente, tetravalente, pentavalente o hexavalente.

5 31. Un ácido nucleico aislado, que codifica la molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.

32. Un vector recombinante, que comprende el ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 31.

10

33. Una célula hospedadora, que comprende el ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 31 o el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 32, en donde preferentemente, la célula hospedadora es una célula eucariota o una célula procariota; más preferentemente, la célula hospedadora deriva de una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula de insecto, *Escherichia coli* y/o *Bacillus subtilis*; y más preferentemente, la célula hospedadora es una célula Expi293.

20 34. Un método para preparar una molécula de unión multiespecífica, que comprende: cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 33 en condiciones apropiadas y aislar la molécula de unión multiespecífica.

25 35. Una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica comprende la molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, el ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 31, el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 32, la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 33 o un producto preparado mediante el método de acuerdo con la reivindicación 34, y uno o más vehículos, diluyentes, tampones o excipientes farmacéuticamente aceptables; preferentemente, la composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico contra el cáncer adicional, preferentemente, la composición farmacéutica se usa para el tratamiento y/o la prevención de cánceres, y preferentemente el cáncer es linfoma de linfocitos B; y más preferentemente, el linfoma de linfocitos B es mieloma múltiple.

36. Un método para estimular los linfocitos T, que comprende: administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 35.

37. La molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, el ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 31, la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 33, un producto preparado mediante el método de acuerdo con la reivindicación 34 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 35, para su uso en la preparación de un fármaco para prevenir y/o tratar cánceres, o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres; preferentemente, el cáncer es linfoma de linfocitos B; y más preferentemente, el linfoma de linfocitos B es mieloma múltiple.

15

38. Un método para tratar y/o prevenir cánceres, que comprende: administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, el ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 31, la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 33, un producto preparado mediante el método de acuerdo con la reivindicación 34 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 35, en donde preferentemente, el cáncer es linfoma de linfocitos B; y más preferentemente, el linfoma de linfocitos B es mieloma múltiple.

20