

ANTICUERPO MULTIESPECÍFICO ANTI-TAA/ANTI-CD3

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 útil como
5 ingrediente activo en una composición farmacéutica para ser utilizada en el tratamiento de un humano.

Antecedentes de la invención

El grupo de diferenciación 3 (CD3, por sus siglas en inglés) es una proteína que transmite una
señal de activación a una célula T formando, en la superficie de la célula T, un complejo junto con un
10 receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés). El CD3 es un complejo que consiste en cinco
subunidades de cadenas gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ), zeta (ζ) y eta (η), y las subunidades forman tres
dímeros, $\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$ y $\zeta\zeta$. La expresión de CD3 es específica de las células T y ocurre en todas las etapas de la
diferenciación de las células T. Además, el CD3 se expresa tanto en una célula T normal como en una
célula T tumoral y, por lo tanto, se utiliza ampliamente como marcador de células T (NPL 1).

El grupo de diferenciación 137 (CD137, también conocido como 4-1BB) es una molécula que
15 pertenece a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF, por sus siglas en inglés),
que se ha reportado que se expresa en la superficie de una célula inmunitaria como una célula T, una
célula B, una célula asesina natural (NK, por sus siglas en inglés), una célula dendrítica, un eosinófilo y un
mastocito. En particular, se sabe que el CD137 de una célula T se une a un ligando CD137 de una célula
20 presentadora de antígeno y está involucrado en la activación y supervivencia de la célula T como una
molécula coestimuladora (NPL 2).

Como nueva terapia contra el cáncer que utiliza el sistema inmune *in vivo*, se ha desarrollado un
anticuerpo de reclutamiento de células T biespecífico. El aspecto más común del anticuerpo de
reclutamiento de células T biespecífico implica la unión simultánea a un antígeno asociado a tumor (TAA,
25 por sus siglas en inglés) expresado en una célula cancerosa y CD3 expresado en una célula T, reduciendo
así la distancia física entre la célula T y la célula cancerosa e introduciendo simultáneamente una señal de
activación mediada por CD3 en la célula T para inducir un efecto citotóxico de la célula T en la célula
cancerosa. Blinatumomab, que se dirige a CD3 y al grupo de diferenciación 19 (CD19, por sus siglas en
inglés) como antígenos, ya se ha utilizado en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (ALL, por
30 sus siglas en inglés) recidivante o refractaria en la práctica clínica y se han demostrado excelentes efectos
terapéuticos. En los últimos años, también se ha desarrollado un anticuerpo de reclutamiento de células T
biespecífico que se une tanto al TAA expresado en una célula cancerosa como al CD137 expresado en
una célula T (NPL 3). Se conocen varios TAA como blancos del anticuerpo de reclutamiento de células T
biespecífico y, por ejemplo, los anticuerpos de reclutamiento de células T biespecíficos dirigidos a TAA
35 como CD33, BCMA, PSMA y EGFRvIII se han estudiado y desarrollado como agentes terapéuticos para
varios tipos de cáncer (NPL 4).

Se sabe que la bioactividad del anticuerpo de reclutamiento de células T biespecífico se ve afectada
por varios factores, como los formatos del anticuerpo, los niveles de expresión de los TAA específicos, los

epítomos de los TAA reconocidos por el anticuerpo, las afinidades con los TAA y CD3 y la cinética *in vivo*, y se considera esencial controlar adecuadamente estos factores para desarrollar un anticuerpo reclutador de células T biespecífico que logre tanto eficacia como seguridad (NPL 5). En cuanto a la seguridad, los problemas generalmente conocidos y comunes a los anticuerpos de reclutamiento de células T biespecíficos incluyen efectos secundarios (toxicidades en el blanco/fuera del tumor) resultantes de la expresión del TAA blanco en tejido normal distinto de tumores y el síndrome de liberación de citocinas (CRS, por sus siglas en inglés), que se basa en la activación del sistema inmunológico. Las posibles vías para evitar las toxicidades en el blanco/fuera del tumor incluyen, por ejemplo, dirigirse a una molécula, una variante, una modificación postraducciona o similar específicamente presente en el tejido canceroso como un antígeno; proporcionar un anticuerpo con una pluralidad de sitios de unión para TAA para aumentar la selectividad para las células cancerosas que expresan un antígeno a alta densidad a través de un efecto de avidéz; y desarrollar un anticuerpo que pueda ser activado localmente por una proteasa o similar presente en el tejido tumoral. Se ha propuesto una forma potencial de reducir el riesgo de CRS que implica modular la afinidad de los anticuerpos de reclutamiento de células T biespecíficas hacia CD3 para reducir la producción de citocinas mientras se mantiene la actividad citotóxica (NPL 5), por ejemplo, y hay reportes sobre el desarrollo de anticuerpos anti-CD3 con diferentes afinidades (PTL 2 a 4).

Para mejorar aún más la eficacia terapéutica, en los últimos años se han realizado estudios sobre diversos anticuerpos multiespecíficos, como un anticuerpo de reclutamiento de células T triespecífico que se une a dos TAA diferentes y a un antígeno en las células T, un anticuerpo de reclutamiento de células T triespecífico que se une a un TAA y a dos antígenos diferentes en las células T, y un anticuerpo triespecífico que se une a los antígenos de un TAA y a los antígenos respectivos de las células T y las células NK (NPL 6 a 8).

Lista de referencias

Literatura de patente

- PTL 1: Patente Japonesa Núm. 5686953
- PTL 2: Patente de Estados Unidos Núm. 9587021
- PTL 3: Patente de Estados Unidos Núm. 9701759
- PTL 4: Patente de Estados Unidos Núm. 10259887

Literatura no relacionada con patentes

- NPL 1: Blood Research, 2022; 57: p.55-61
- NPL 2: Cancer Science, 2020; 111(5): p.1461-1467
- NPL 3: Science Translational Medicine, 2019; 11(496): eaav5989
- NPL 4: Biomarker Research, 2021; 9(1): p.38
- NPL 5: Methods, 2019; 154: p.102
- NPL 6: Biomedicines, 2020; 8(7): 204
- NPL 7: Nature, 2022;603: p.328-334
- NPL 8: Theranostics 2023; 13(3): p.1028-1041

Breve descripción de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 que pueda usarse en el tratamiento de un humano.

5 Solución al problema

En el curso de la investigación de la producción de un anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 dirigido a varios TAA, los presentes inventores consideraron que la afinidad óptima de un fragmento variable de cadena única anti-CD3 ((anti-CD3 scFv scFv, por sus siglas en inglés) variaría dependiendo del nivel de expresión del TAA que se va a combinar y la afinidad de un anticuerpo anti-TAA por el TAA.

10 Por lo tanto, los presentes inventores obtuvieron anticuerpos anti-CD3 scFv que tienen diversa afinidad mediante el uso de información pública y sus propias técnicas para analizar la información de la estructura de la proteína, que se combinaron con anticuerpos anti-TSPAN8 para obtener múltiples anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 (Ejemplo 1), y también se introdujeron múltiples mutaciones para mejorar la estabilidad del anti-CD3 scFv para obtener un anti-CD3 scFv que tenga afinidad y estabilidad
15 diversas, obteniendo así con éxito múltiples anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 que tengan diversas actividades de unión a CD3 y estabilidad (Ejemplo 2).

Para confirmar que el anti-CD3 scFv obtenido también podría combinarse con cualquier anticuerpo anti-TAA distinto del anti-TSPAN8 para producir un anticuerpo biespecífico que tenga afinidad y estabilidad diversas, los presentes inventores produjeron luego un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3
20 combinando un anticuerpo anti-CD37 y un anti-CD3 scFv, un anticuerpo biespecífico anti-SLC34A2/anti-CD3, un anticuerpo biespecífico anti-CLDN4/anti-CD3 y un anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/anti-CD3, y así se confirmó que estos anticuerpos biespecíficos mantenían tanto una afinidad como una estabilidad diversas (Ejemplos 3 a 7). Además, los presentes inventores confirmaron que se podrían proporcionar anticuerpos trispecíficos combinando estos anticuerpos biespecíficos con un anticuerpo anti-CD137 que
25 se une a CD137 (Ejemplo 7).

Específicamente, la presente invención se refiere a los siguientes [1] a [25].

[1] Un anticuerpo multiespecífico que incluye: una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-antígeno asociado a tumor (TAA) que se une a TAA; y una región anti-CD3 scFv que incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de
30 cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que se une a CD3, en donde la región anti-CD3 scFv es cualquiera de (1) a (16):

(1) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de
35 aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(3) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(4) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de

aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 20;

(5) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 22;

5 (6) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 24;

(7) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 26;

(8) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 28;

10 (9) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 30;

(10) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

15 (11) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

(12) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

(13) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

20 (14) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

25 (16) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 44.

[2] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con [1], en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico que tiene las estructuras (a) a (c):

30 (a) una región Fab de un anticuerpo anti-TAA que consiste en un fragmento de cadena pesada que incluye una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TAA y una cadena ligera que incluye una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TAA;

(b) una región anti-CD3 scFv que incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3; y

(c) una región Fc que consiste en un primer polipéptido Fc unido al fragmento de cadena pesada de la región Fab (a) y un segundo polipéptido Fc unido a la región anti-CD3 scFv (b).

35 [3] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con [2], en donde la región Fc comprende la mutación botón en ojal o mutación LALA, L234A y L235A, donde las posiciones de la mutación son posiciones de aminoácidos en la región constante de Igγ1 humana de acuerdo con el índice EU.

[4] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con [2], en donde la región Fc comprende la

mutación botón en ojal y la mutación LALA.

[5] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [2] a [4], en donde la región Fc comprende la mutación P329A y/o la mutación P331G, donde una posición de la mutación es una posición de aminoácido en la región constante de IgY1 humana de acuerdo con el índice EU.

5 [6] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [2] a [5], en donde el fragmento de cadena pesada de la región Fab del anticuerpo anti-TAA y el primer polipéptido Fc están unidos a través de una región bisagra; y la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos a través de una región bisagra.

10 [7] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con [6], en donde la región de bisagra que une la región anti-CD3 scFv al segundo polipéptido Fc comprende la mutación C220S, donde una posición de la mutación es una posición de aminoácido en la región constante de IgY1 humana de acuerdo con el índice EU.

15 [8] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con [6], en donde la región Fc comprende la mutación botón en ojal, la mutación LALA y la mutación P329A y/o P331G, en donde la región de bisagra que une la región anti-CD3 scFv al segundo polipéptido Fc comprende la mutación C220S, donde una posición de la mutación es una posición de aminoácido en la región constante de IgY1 humana de acuerdo con el índice EU.

20 [9] Un anticuerpo multiespecífico que es un anticuerpo biespecífico anti-antígeno asociado a tumor (TAA)/anti-CD3, que incluye: una cadena pesada de un anticuerpo anti-TAA que se une a TAA, en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada que incluye una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TAA; una cadena ligera que incluye una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TAA; y un polipéptido en el que están unidas una región anti-CD3 scFv que incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que se une a CD3 y un segundo polipéptido Fc, en donde la región anti-CD3 scFv es cualquiera de (1) a
25 (16):

(1) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

30 (3) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(4) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 20;

35 (5) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 22;

(6) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 24;

(7) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de

aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 26;

(8) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 28;

5 (9) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 30;

(10) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

(11) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

10 (12) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

(13) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

15 (14) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

(16) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 44.

20 [10] Un anticuerpo multiespecífico que es un anticuerpo trispecífico que se obtiene añadiendo además una región anti-CD137 scFv que incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD137 que se une a CD137 al anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [2] a [9], en donde la región anti-CD137 scFv es cualquiera de (a) a (e):

25 (a) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 242 de la SEQ ID NO: 46;

(b) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 48;

(c) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 249 de la SEQ ID NO: 50;

30 (d) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 52; y

(e) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO: 54.

35 [11] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con [10], en donde la región anti-CD137 scFv está unida a uno o ambos extremos carboxilo terminal del primer polipéptido Fc y del segundo polipéptido Fc.

[12] Un anticuerpo multiespecífico que es un anticuerpo trispecífico anti-antígeno asociado a tumor (TAA)/anti-CD3/anti-CD137 que incluye: una cadena pesada de un anticuerpo anti-TAA que se une a TAA, en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada que incluye una

región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TAA; una cadena ligera que incluye una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TAA; y un polipéptido en el que una región anti-CD3 scFv que incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que se une a CD3 y un segundo polipéptido Fc están unidas, en donde una región anti-CD137 scFv que incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD137 también está unida a uno o ambos extremos carboxilo terminales del primer polipéptido Fc y del segundo polipéptido Fc,

en donde la región anti-CD3 scFv es cualquiera de (1) a (16):

(1) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(3) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(4) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 20;

(5) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 22;

(6) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 24;

(7) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 26;

(8) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 28;

(9) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 30;

(10) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

(11) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

(12) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

(13) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

(14) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

(16) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 44, y

en donde la región anti-CD137 scFv es cualquiera de (a) a (e):

(a) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 242 de la SEQ ID NO: 46;

(b) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 48;

(c) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 249 de la SEQ ID NO: 50;

(d) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 52; y

(e) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO: 54.

[13] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [1] a [12], en donde el anticuerpo anti-TAA es un anticuerpo anti-TAA que se une a cualquiera de los TAA:

HER2, HER3, HER4, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD40, CD44, CD70, CD123, CD138, CXCR3, CXCR5, CCR3, CCR4, CCR9, CRTH2, PMCH, CD4, CD25, CD200, endoplasmina, BCMA, CD276, TSPAN8, CLDN4, CLDN6, CLDN18.2, ENPP3, SLC34A2, TROP2, MerTK, Nectin-4, ASGR1, mesotelina, PSMA, LIV-1, MUC1, MUC2, MUC4, MUC16, CDH6, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20, CEACAM21, URLC10, NY-ESO-1, GAA, OFA, ciclinaB1, WT-1, CEF, VEGRR1, VEGFR2, TTK, HPV16, HPV16E7, HPV18, CEAIMA910, KOC1, SL-701, MART-1, gp100, tirosinasa, survivina, MAGE-3.1, MAGE-10.A2, OVA BiP, gp209-2M, melan-A, NA17.A2, KOC1, CO16, DEPDC1, MPHOSPH1, MAGE12, ONT-10, GD2L, GD3L, URLC10, CDCA1, TF, PSA, TERT, STF-II, G17DT, ICT-107, Dex2, hTERT, PAP, TRP2, LRRC15, c-Met, PD-L1, FAP, EGFR, B3-H3, GPC3, y 5T4.

[14] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [1] a [13], que se modifica postraduccionamente.

[15] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con [14], en donde la modificación postraducciona es piroglutamilación en un extremo amino terminal de la región variable de la cadena pesada y/o eliminación de lisina en un extremo carboxilo terminal de la cadena pesada.

[16] Un polinucleótido para usarse en la producción del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [1] a [15], en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en (1) a (16):

(1) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(3) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

5 (4) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 20;

(5) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 22;

10 (6) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 24;

(7) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID
15 NO: 26;

(8) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 28;

(9) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv
20 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 30;

(10) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

25 (11) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

(12) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID
30 NO: 36;

(13) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

(14) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv
35 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID

NO: 42; y

(16) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 44.

5 [17] Un polinucleótido para usarse en la producción del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [10] a [15], en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en (a) a (e):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 242 de la SEQ ID NO: 46;

10 (b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 48;

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 249 de la SEQ ID NO: 50;

(d) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 52; y

20 (e) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO: 54.

[18] Un vector de expresión que incluye el polinucleótido de acuerdo con [16] o [17].

[19] Una célula hospedera que incluye el polinucleótido de acuerdo con [16] [17] o el vector de expresión de acuerdo con [18].

25 [20] Un método de producción que incluye un paso de cultivo de la célula hospedera de acuerdo con [19].

[21] Una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de [1] a [15] y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 [22] El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [1] a [15], para usarse en el tratamiento contra el cáncer.

[23] La composición farmacéutica de acuerdo con [21], para usarse en el tratamiento contra el cáncer.

[24] Un método para tratar el cáncer que incluye administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [1] a [15].

35 [25] Uso del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con cualquiera de [1] a [15] en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

Efectos ventajosos de la invención

El anti-CD3 scFv de la presente invención se puede combinar con un anticuerpo para un TAA

arbitrario (anticuerpo anti-TAA) para proporcionar un anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 (incluyendo un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo trispecífico), que puede unirse tanto a un TAA arbitrario como a un CD3 y mejorar un efecto letal de una célula T sobre una célula cancerosa al reducir la distancia física entre la célula cancerosa y la célula T. Por consiguiente, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención y una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo multiespecífico se pueden utilizar para tratar el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1-1: La Figura 1-1 muestra los resultados de la evaluación de la actividad citotóxica de un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 en un sistema de cocultivo de células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark y células pan-T expandidas. La abscisa indica la concentración de anticuerpos y la ordenada indica el área de fluorescencia de GFPSpark de cada pocillo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores promedio para cada condición se indicaron mediante símbolos y se conectaron mediante una línea poligonal.

Figura 1-2: La Figura 1-2 muestra los resultados de la evaluación de la actividad citotóxica de un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 en un sistema de cocultivo de células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark y células pan-T expandidas. La abscisa indica la concentración de anticuerpos y la ordenada indica el área de fluorescencia de GFPSpark de cada pocillo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores promedio para cada condición se indicaron mediante símbolos y se conectaron mediante una línea poligonal.

Figura 2-1: La Figura 2-1 muestra los resultados de la evaluación de la actividad inductora de secreción de IFN- γ de un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 en un sistema de cocultivo de células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark y células pan-T expandidas. La abscisa indica la concentración de anticuerpos y la ordenada indica la concentración de IFN- γ en un sobrenadante de cultivo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores promedio para cada condición se indicaron mediante símbolos y se conectaron mediante una línea poligonal.

Figura 2-2: La Figura 2-2 muestra los resultados de la evaluación de la actividad inductora de secreción de IFN- γ de un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 en un sistema de cocultivo de células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark y células pan-T expandidas. La abscisa indica la concentración de anticuerpos y la ordenada indica la concentración de IFN- γ en un sobrenadante de cultivo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores promedio para cada condición se indicaron mediante símbolos y se conectaron mediante una línea poligonal.

Figura 2-3: La Figura 2-3 muestra los resultados de la evaluación de la actividad inductora de secreción de TNF- α de un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 en un sistema de cocultivo de células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark y células pan-T expandidas. La abscisa indica la concentración de anticuerpos y la ordenada indica la concentración de TNF- α en un sobrenadante de cultivo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores promedio para cada condición se indicaron mediante símbolos y se conectaron mediante una línea poligonal.

Figura 2-4: La Figura 2-4 muestra los resultados de la evaluación de la actividad inductora de secreción de TNF- α de un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 en un sistema de cocultivo de células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark y células pan-T expandidas. La abscisa indica la concentración de anticuerpos y la ordenada indica la concentración de TNF- α en un sobrenadante de cultivo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores promedio para cada condición se indicaron mediante símbolos y se conectaron mediante una línea poligonal.

Figura 3-1: La Figura 3-1 muestra un efecto antitumoral de BTE-0136 en un modelo de cáncer subcutáneo de células SU-DHL-6 transferidas a células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humanas. La abscisa en el gráfico de la izquierda indica el número de días después del inicio de la administración de anticuerpos, la ordenada indica el volumen del tumor y una barra de error indica un error estándar. El gráfico de la derecha muestra el valor del volumen tumoral de cada individuo 11 días después del inicio de la administración. La abscisa indica una dosis de BTE-0136 y la ordenada indica el volumen del tumor. La línea horizontal indica un valor promedio y una barra de error indica un error estándar. Se obtuvo una probabilidad significativa, valor p, al comparar el volumen del tumor en un grupo tratado con solución salina amortiguada de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) con el volumen del tumor en un grupo tratado con BTE-0136 en cada dosis mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett. En el gráfico, ** indica un grupo que tiene un valor p menor que un nivel de significancia de 0.01, y * indica un grupo que tiene un valor p menor que un nivel de significancia de 0.05.

Figura 3-2: La Figura 3-2 muestra un efecto antitumoral de BTE-0142 en un modelo de cáncer subcutáneo de células SU-DHL-6 transferidas a PBMC humanas. La abscisa en el gráfico de la izquierda indica el número de días después del inicio de la administración de anticuerpos, la ordenada indica el volumen del tumor y una barra de error indica un error estándar. El gráfico de la derecha muestra el valor del volumen tumoral de cada individuo 11 días después del inicio de la administración. La abscisa indica una dosis de BTE-0142 y la ordenada indica el volumen del tumor. La línea horizontal indica un valor promedio y una barra de error indica un error estándar. Se obtuvo una probabilidad significativa, valor p, al comparar el volumen del tumor en un grupo tratado con PBS con el volumen del tumor en un grupo tratado con BTE-0142 en cada dosis mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett. En el gráfico, ** indica un grupo que tiene un valor p menor que un nivel de significancia de 0.01, y * indica un grupo que tiene un valor p menor que un nivel de significancia de 0.05.

Figura 3-3: La Figura 3-3 muestra un efecto antitumoral de BTE-0148 en un modelo de cáncer subcutáneo de células SU-DHL-6 transferidas a PBMC humanas. La abscisa en el gráfico de la izquierda indica el número de días después del inicio de la administración de anticuerpos, la ordenada indica el volumen del tumor y una barra de error indica un error estándar. El gráfico de la derecha muestra el valor del volumen tumoral de cada individuo 11 días después del inicio de la administración, la abscisa indica la dosis de BTE-0148 y la ordenada indica el volumen tumoral. La línea horizontal indica un valor promedio y una barra de error indica un error estándar. Se obtuvo una probabilidad significativa, valor p, al comparar el volumen del tumor en un grupo tratado con PBS con el volumen del tumor en un grupo tratado con BTE-0148 en cada dosis mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett. En el gráfico, ** indica un

grupo que tiene un valor p menor que un nivel de significancia de 0.01.

Figura 4: La figura 4 indica la actividad de unión de 11 tipos de anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 a CD3. La abscisa indica la concentración de anticuerpos y la ordenada indica la absorbancia (cantidad de unión del anticuerpo).

Figura 5: La Figura 5 muestra los resultados de la evaluación de la actividad citotóxica de un anticuerpo biespecífico anti-SLC34A2/anti-CD3 en un sistema de cocultivo de células OVCAR-3_GFPSpark y células pan-T expandidas. La abscisa indica la concentración de anticuerpos y la ordenada indica el área de fluorescencia de GFPSpark de cada pocillo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores promedio para cada condición se indicaron mediante símbolos y se conectaron mediante una línea poligonal.

Figura 6-1: La figura 6-1 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de muestras de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN4/anti-CD3 tratadas en condiciones reductoras y no reductoras.

Figura 6-2: La figura 6-2 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de muestras de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD3 tratadas en condiciones reductoras y no reductoras.

Figura 7-1: La figura 7-1 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de muestras de anticuerpos trispecíficos anti-CLDN4/anti-CD3/anti-CD137 tratados en condiciones reductoras y no reductoras.

Figura 7-2: La figura 7-2 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de muestras de anticuerpos trispecíficos anti-PD-L1/anti-CD3/anti-CD137 tratadas en condiciones reductoras y no reductoras.

Figura 8: La figura 8 muestra la actividad de unión de los anticuerpos de prueba a CD3 medida y evaluada mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés). La ordenada de la figura representa un valor obtenido al restar la absorbancia a 570 nm de la absorbancia a 450 nm, y la abscisa representa la concentración de los anticuerpos de prueba. Los símbolos indican la absorbancia promedio al momento de la adición de cada anticuerpo de prueba.

Figura 9: La figura 9 muestra la actividad de unión de los anticuerpos de prueba a CD137 medida y evaluada mediante ELISA. La ordenada de la figura representa un valor obtenido al restar la absorbancia a 570 nm de la absorbancia a 450 nm, y la abscisa representa la concentración de los anticuerpos de prueba. Los símbolos indican la absorbancia promedio al momento de la adición de cada anticuerpo de prueba.

Figura 10: La figura 10 muestra la actividad de unión de los anticuerpos de prueba a CLDN4 medida y evaluada mediante ELISA basado en células. La ordenada de la figura representa un valor obtenido al restar la absorbancia a 570 nm de la absorbancia a 450 nm, y la abscisa representa la concentración de los anticuerpos de prueba. Los símbolos indican la absorbancia promedio al momento de la adición de cada anticuerpo de prueba.

Descripción de las modalidades

A continuación, se describirá con detalle la presente invención.

Definiciones

Los términos utilizados en este documento tienen el significado comúnmente utilizado por los

técnicos en la materia en este campo técnico, a menos que se especifique lo contrario a continuación.

Un anticuerpo (o inmunoglobulina) se refiere a una glicoproteína que tiene una estructura de cuatro cadenas con forma de Y simétrica que consiste en dos cadenas pesadas que tienen una sola secuencia y dos cadenas ligeras que tienen una sola secuencia como estructura básica. Un anticuerpo se divide en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. La estructura básica de una molécula de anticuerpo es común entre las clases, y dos cadenas pesadas que tienen un peso molecular de 50,000 a 70,000 y dos cadenas ligeras que tienen un peso molecular de 20,000 a 30,000 están unidas a través de un puente disulfuro o un enlace no covalente para formar una molécula de anticuerpo que tiene una estructura de cuatro cadenas en forma de Y que tiene un peso molecular de 150,000 a 190,000. Una cadena pesada está compuesta por una cadena polipeptídica que generalmente contiene aproximadamente 440 aminoácidos con una estructura característica de cada clase y se designa como Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ e Ig ϵ correspondientes a IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. La IgG se divide además en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y las cadenas pesadas correspondientes a estas subclases se designan respectivamente como Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 e Ig γ 4. Una cadena ligera está compuesta por una cadena polipeptídica que generalmente contiene aproximadamente 220 aminoácidos y se sabe que se divide en dos tipos, cadena ligera λ y cadena ligera κ , que se designan respectivamente como Ig λ e Ig κ . Los dos tipos de cadenas ligeras pueden emparejarse con cualquier tipo de cadenas pesadas.

Una cadena pesada tiene cuatro puentes disulfuro intracadena (cinco en Ig μ e Ig ϵ) de una molécula de anticuerpo, y una cadena ligera tiene dos enlaces disulfuro intracadena, y se forma un bucle con cada 100 a 110 residuos de aminoácidos. La estructura tridimensional es similar entre los bucles, lo que se denomina unidad estructural o dominio. Tanto en una cadena pesada como en una cadena ligera, un dominio ubicado en el extremo N se designa como una región variable, que se sabe que tiene varias secuencias de aminoácidos incluso cuando el anticuerpo se produce a partir de la misma clase (o subclase) de animales de la misma especie y que está involucrada en la especificidad de unión anticuerpo-antígeno. Una secuencia de aminoácidos de un dominio en el extremo C-terminal corriente abajo de la región variable es sustancialmente constante en cada clase o subclase, y el dominio se designa como una región constante. La cadena pesada tiene, desde el extremo N hacia el extremo C, una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena pesada (CH, por sus siglas en inglés). El CH se divide además en tres dominios: dominio CH1, dominio CH2 y dominio CH3, dispuestos en este orden desde el extremo N-terminal. La cadena ligera tiene, desde el extremo N hacia el extremo C, una región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena ligera (CL, por sus siglas en inglés).

La secuencia de aminoácidos de tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) presentes en cada uno de los VH y VL es muy variable, lo que contribuye a la variabilidad de las regiones variables. Las CDR son regiones que consisten en aproximadamente 5 a 10 residuos de aminoácidos en el extremo N de cada una de las cadenas pesada y ligera en el orden CDR1, CDR2 y CDR3 y forman un sitio de unión al antígeno. Por otra parte, una porción que excluye los CDR en la región variable se designa como región marco (FR, por sus siglas en inglés), que consiste en FR1 a FR4, con relativamente poca

variación en la secuencia de aminoácidos.

El tratamiento del anticuerpo con la enzima proteolítica papaína produce tres fragmentos de anticuerpo. Los dos fragmentos del extremo N-terminal se denominan regiones Fab (fragmentos de unión a antígeno; fragmento, unión a antígeno). Como se utiliza en este documento, el término "región Fab" se refiere a una región que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada y la cadena ligera (VL y CL), que se une a un antígeno en una porción de la punta en un sitio de unión al antígeno formado por la región Fab. Tal como se utiliza en este documento, el término "fragmento de cadena pesada" se refiere a un fragmento que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada que compone la región Fab.

El fragmento en el extremo C-terminal se designa como región Fc (fragmento cristizable; fragmento, cristizable). Tal como se utiliza en este documento, el término "polipéptido Fc" se refiere a un polipéptido que consiste en el dominio CH2 y el dominio CH3 de la cadena pesada, y el término "región Fc" se refiere a un complejo que consiste en dos polipéptidos Fc.

El fragmento de cadena pesada y el polipéptido Fc están unidos a través de una porción denominada región bisagra. Además, las dos cadenas pesadas del anticuerpo están unidas entre sí por un puente disulfuro en la región bisagra.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" se utiliza en un sentido general, en particular como término para una molécula o una parte de una molécula a la que una proteína de unión a antígeno, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, puede unirse específicamente. El antígeno puede ser una molécula como proteínas y ácidos nucleicos. Un antígeno puede tener uno o más epítopos capaces de interactuar con diferentes anticuerpos y similares.

Tal como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que se une específicamente a un antígeno y puede tener cualquier estructura siempre que pueda unirse específicamente a un antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo comprende, además de un polipéptido que tiene una estructura de cuatro cadenas como estructura básica tal como IgG, polipéptidos en diversas formas, tales como un fragmento de unión a antígeno, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico y un anticuerpo triespecífico descritos a continuación.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una molécula que tiene actividad de unión a antígeno derivada de un anticuerpo y que incluye al menos una cadena polipeptídica. Los ejemplos representativos del fragmento de unión al antígeno incluyen un fragmento de región variable de cadena sencilla (scFv), un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂. El scFv es un fragmento de unión a antígeno monovalente compuesto por VH y VL unidos a través de un enlazador. El fragmento Fab es un fragmento de unión a antígeno monovalente compuesto por un fragmento que contiene la cadena ligera y el dominio VH y CH1 de la cadena pesada. El fragmento Fab' es un fragmento de unión a antígeno monovalente compuesto por un fragmento que contiene la cadena ligera, el dominio VH y CH1 de la cadena pesada, y una parte de la región bisagra, y en esta parte de la región bisagra se incluye un residuo de cisteína que forma un puente S-S entre las cadenas pesadas. El fragmento F(ab')₂ es una molécula bivalente en la que los fragmentos Fab' están unidos entre sí a través de un puente disulfuro. El término "monovalente" significa que se incluye un sitio

de unión a antígeno, y el término "bivalente" significa que se incluyen dos sitios de unión a antígeno. Tal como se utiliza en este documento, el término "región scFv" se refiere a una región que incluye scFv.

Tal como se utiliza en este documento, el término "polipéptido" significa una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Los aminoácidos utilizados en el polipéptido pueden ser aminoácidos naturales o artificiales. El número de residuos de aminoácidos contenidos en el polipéptido puede ser 2 o más, preferiblemente 10 o más.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo capaz de unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes, al que se denomina, por ejemplo, anticuerpo biespecífico o anticuerpo trispecífico dependiendo del número de antígenos a los que se va a unir. Los anticuerpos multiespecíficos incluyen un complejo de dos o más anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno, cada uno capaz de unirse a un antígeno diferente, y el término "anticuerpos" utilizado en este documento comprende anticuerpos multiespecíficos, a menos que se especifique lo contrario en el contexto.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo capaz de unirse específicamente a dos antígenos diferentes, y el término "anticuerpo trispecífico" se refiere a un anticuerpo capaz de unirse específicamente a tres antígenos diferentes.

Tal como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina humana. Como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que una parte, la mayoría o la totalidad de los residuos de aminoácidos, excluyendo los CDR, han sido reemplazados por residuos de aminoácidos derivados de una molécula de inmunoglobulina humana. Un método de humanización no está particularmente limitado, y se puede producir un anticuerpo humanizado con referencia, por ejemplo, a las Patentes de EE. UU. Núm. 5225539 y 6180370.

Tal como se utiliza en este documento, el término "modificación postraducciona" significa que un anticuerpo sufre una modificación postraducciona cuando el anticuerpo se expresa en una célula. Los ejemplos de modificación postraducciona incluyen modificaciones tales como piroglutamilación, glicosilación, oxidación, desamidación y glicación de glutamina o ácido glutámico en un extremo N-terminal de la cadena pesada, y deleción de lisina por escisión de lisina en un extremo C-terminal de la cadena pesada con carboxipeptidasa. Se sabe que dicha modificación postraducciona se produce en varios anticuerpos (J. Pharm. Sci., 2008, Vol. 97, p. 2426-2447).

Tal como se utiliza en este documento, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos y comprende ARN o ADN. El ARN o ADN a utilizar puede ser de origen natural o sintetizado artificialmente.

Se puede prescribir un número de residuo de aminoácido del anticuerpo que se utilizará en este documento especificando la numeración de Kabat o el índice EU (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a edición, 1991, publicación del NIH Núm. 91-3242) de acuerdo con estos sistemas de numeración.

Tal como se utiliza en este documento, el término "primera" o "segunda" se utiliza para distinguir

convenientemente dos o más porciones. El uso de tal término no pretende impartir un orden o significado específico a menos que se mencione claramente.

Tal como se utiliza en este documento, el término "enlace" o "enlazado" significa que una pluralidad de componentes (por ejemplo, una región Fab y un polipéptido Fc) están unidos entre sí directamente o a través de uno o más intermediarios (ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, un enlazador peptídico y una región bisagra). Tal como se utiliza en este documento, el término "enlazador peptídico" significa uno o más residuos de aminoácidos arbitrarios que pueden introducirse mediante ingeniería genética para enlazar regiones variables entre sí. La longitud del enlazador peptídico que se utilizará en la presente invención no está particularmente limitada, pero los técnicos en la materia pueden seleccionarla adecuadamente dependiendo del propósito.

Tal como se utiliza en este documento, el término "identidad" significa un valor de identidad obtenido utilizando EMBOSS Needle (Nucleic Acids Res., 2015, Vol. 43, pág. W580-W584) con parámetros preparados como predeterminados. Los parámetros son como a continuación:

Penalización por *gaps* abiertos = 10

Penalización por *gaps* extendidos = 0.5

Matriz = EBLOSUM62

Penalización por *gap* final = falso

Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" significa un humano u otros animales que necesitan prevención o tratamiento y es, en un aspecto, un humano que necesita tratamiento o prevención.

La tetraspanina-8 (TSPAN8) es una proteína transmembrana de cuatro pasos que pertenece a la familia de las tetraspaninas con dos regiones de bucle extracelular y tres dominios citoplasmáticos. Se sabe que TSPAN8 está involucrado en la adhesión celular, la motilidad celular y la activación y el crecimiento celular, y se expresa en un alto nivel en el cáncer gástrico, el cáncer de páncreas, el cáncer colorrectal, el cáncer de hígado y otros tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha reportado de una asociación entre una mayor expresión de TSPAN8 y la progresión o metástasis del cáncer (Biomolecules, 2020, Vol. 10, pág. 383).

El grupo de diferenciación 37 (CD37, por sus siglas en inglés) es una proteína transmembrana de cuatro pasos que pertenece a la familia de las tetraspaninas con dos regiones extracelulares y tres regiones citoplasmáticas. El análisis realizado con ratones inactivados (*knockout*) reveló que el CD37 también está involucrado en funciones inmunes como la producción de anticuerpos y la regulación de las funciones de las células T (Int. J Mol. Sci., 2020, Vol. 21, p. 9531). La expresión del CD37 en el tejido normal se limita a las células sanguíneas, particularmente en niveles altos en las células B maduras. Además, también se sabe que CD37 se expresa con frecuencia y en gran medida en cánceres de la sangre, como el linfoma no Hodgkin y la leucemia linfocítica crónica, que se derivan de células B maduras (Blood Adv., 2019, Vol. 3, pág. 1230).

El miembro 2 de la familia 34 de transportadores de solutos ((SLC34A2, por sus siglas en inglés) también conocido como NaPi2b) es un transportador de fosfato dependiente de sodio sensible al pH, que se expresa, por ejemplo, en el pulmón, la glándula salival, la glándula mamaria y el intestino delgado, y

está involucrado en la absorción de fosfato dietético. Además, se sabe que las anomalías en los genes SLC34A2 causan microlitiasis alveolar (Pflugers Arch., 2019, Vol. 471, pág. 165). SLC34A2, que se expresa altamente en el cáncer de pulmón y el cáncer de ovario, ha atraído la atención como molécula blanco de agentes terapéuticos para estos cánceres (Mol. Cancer Ther., 2021, Vol. 20, p. 896).

La claudina-4 (CLDN4) es una proteína transmembrana de cuatro pasos que pertenece a la familia de las claudinas, que se expresa en una célula epitelial y en una célula endotelial, y desempeña un papel importante como molécula principal que compone una unión estrecha. CLDN4 se expresa en gran medida en el tejido canceroso de, por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga y cáncer de ovario, lo que sugiere que un anticuerpo anti-CLDN4 puede ser aplicable al tratamiento o diagnóstico del cáncer (Cancer Science, 2009, Vol. 100, p. 1623-1630).

El ligando de muerte programada 1 (PD-L1) es un ligando de la muerte celular programada-1 (PD-1). PD-1, cuya expresión se induce en células T con activación sostenida, regula la activación de las células T de manera inhibitoria al unirse al ligando PD-L1 o ligando de muerte programada 2 (PD-L2) (Annu. Rev. Immunol., 2008, Vol. 26, p. 677-704). En general, dicho mecanismo regulador de la activación de las células T se denomina punto de control inmunitario y se conoce como uno de los mecanismos de retroalimentación negativa para prevenir respuestas inmunes excesivas.

Anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico que se une a CD37 y CD3 (también denominado "anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3") con las estructuras (a) a (c).

El anticuerpo biespecífico que se une a CD37 y CD3 comprende:

(a) una región Fab de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en un fragmento de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD37;

(b) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3; y

(c) una región Fc que consiste en un primer polipéptido Fc unido al fragmento de cadena pesada de la región Fab (a) y un segundo polipéptido Fc unido a la región anti-CD3 scFv (b).

El anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3. Una región anti-CD3 scFv conocida en este campo técnico o una región anti-CD3 scFv producida con base en información de secuencia sobre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 conocido en este campo técnico se puede utilizar para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención. Los anticuerpos anti-CD3 conocidos incluyen clones como OKT3, UTCH1, L2K y TR66, cuyas secuencias se utilizan como anticuerpos biespecíficos (Pharmacol. Ther., 2018, Vol. 182, p. 161-175).

En una modalidad, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 en el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención son cualquiera de (1) a (3):

(1) una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de la SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

5 (2) una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de la SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

10 (3) una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de la SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En la región anti-CD3 scFv, el tipo y la longitud de un enlazador peptídico que une la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 no están particularmente limitados, pero pueden ser seleccionados apropiadamente por aquellos técnicos en la materia. La longitud es preferiblemente de 5 o más aminoácidos (el límite superior no está particularmente limitado, pero normalmente es de 30 o menos aminoácidos, y preferiblemente de 20 o menos aminoácidos), particularmente preferiblemente de 15 aminoácidos. Como enlace peptídico, se puede utilizar, por ejemplo, un enlace glicina-serina (enlace GS) o un enlace glicina-lisina-prolina-glicina-serina (enlace GKPGS).
Ejemplos de dicho enlazador son los siguientes:

Ser
Gly-Ser
Gly-Gly-Ser
Ser-Gly-Gly
25 Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 55)
Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 56)
Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 57)
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 58)
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 59)
30 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 60)
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 61)
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 62)
(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n
(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n
35 Gly-Lys-Pro-Gly-Ser (SEQ ID NO: 63)
(Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n

En lo anterior, n representa un número entero de 1 o más. Los técnicos en la materia pueden seleccionar de forma apropiada la longitud y la secuencia del conector peptídico según el propósito.

En una modalidad, el enlazador utilizado para la región anti-CD3 scFv es un enlazador que tiene la secuencia (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n. En una modalidad, el enlazador utilizado para la región anti-CD3 scFv es preferiblemente un enlazador que tiene la secuencia (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)₄.

En una modalidad, la región anti-CD3 scFv es cualquiera de (1) a (3):

(1) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(3) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 10, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 65 en SEQ ID NO: 10, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 98 a 104 en SEQ ID NO: 10; y la región variable de una cadena ligera del anticuerpo anti-CD37 que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 de la SEQ ID NO: 12, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 56 en SEQ ID NO: 12, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 89 a 95 en SEQ ID NO: 12.

En una modalidad, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 comprende NO: 10, y la región variable de una cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de la SEQ ID NO: 12.

Como región constante de cadena pesada de la cual se deriva el dominio CH1 del fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37, se puede seleccionar cualquiera de las regiones constantes Igγ, Igμ, Igα, Igδ e Igε. La Igγ se puede seleccionar, por ejemplo, entre Igγ1, Igγ2, Igγ3 e Igγ4. En una modalidad, el fragmento de cadena pesada de la región Fab del anticuerpo anti-CD37 comprende un dominio CH1 derivado de la región constante de Igγ1 humana.

Como CL de la cadena ligera de la región Fab del anticuerpo anti-CD37, se puede seleccionar la región constante de Igλ o Igκ. En una modalidad, la cadena ligera de la región Fab del anticuerpo anti-CD37 comprende una CL. En una modalidad, la cadena ligera de la región Fab del anticuerpo anti-CD37 comprende una región constante de Igκ humana, CL.

En una modalidad, la región Fab del anticuerpo anti-CD37 está compuesta por un fragmento de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 213 de SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

En la presente especificación, un polipéptido en el que están unidos un fragmento de cadena pesada que incluye la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 y un primer polipéptido Fc también se denomina "cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37". En el anticuerpo biespecífico anti-

CD37/anti-CD3 de la presente invención, el fragmento de cadena pesada de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 y el polipéptido Fc (primer polipéptido Fc) pueden estar unidos directamente o a través de un conector peptídico o una región bisagra. Alternativamente, en el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención, la región anti-CD3 scFv y el polipéptido Fc (segundo polipéptido Fc) pueden estar unidos directamente o a través de un conector peptídico o una región bisagra.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de acuerdo con cualquiera de (a) a (c):

(a) un anticuerpo biespecífico que contiene una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que contiene un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 10, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 65 en SEQ ID NO: 10, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 98 a 104 en SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que incluye una región variable de cadena ligera que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 12, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 56 en SEQ ID NO: 12, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 89 a 95 en SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(b) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que contiene un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 10, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 65 en SEQ ID NO: 10, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 98 a 104 en SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 12, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 56 en SEQ ID NO: 12, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 89 a 95 en SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que incluye una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(c) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que contiene un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 10, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 65 en SEQ ID NO: 10, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 98 a 104 en SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que contiene un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 12, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 56 en SEQ ID NO: 12, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 89 a 95 en SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que incluye una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de acuerdo con cualquiera de (a) a (c):

(a) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12; y un polinucleótido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(b) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12; y un polinucleótido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la

SEQ ID NO: 16; y

(c) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12; y un polinucleótido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de acuerdo con cualquiera de (a) a (c):

(a) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 213 de SEQ ID NO: 10, una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(b) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 213 de SEQ ID NO: 10, una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(c) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 213 de SEQ ID NO: 10, una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención, cualquiera de las regiones constantes Igy, Igμ, Igα, Igδ e Igε se puede seleccionar como una región constante de cadena pesada de la cual se derivan el primer polipéptido Fc y el segundo polipéptido Fc que componen la región Fc. La Igy se puede seleccionar, por ejemplo, entre Igy1, Igy2, Igy3 e Igy4. En una modalidad, el primer polipéptido Fc y el segundo polipéptido Fc son polipéptidos Fc derivados de la región constante Igy1 humana.

La región Fc del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede contener una mutación que reduce la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés). L234A es un reemplazo de leucina con alanina en la posición de aminoácido 234 en la región constante de Igγ1 humana de acuerdo con el índice EU. L235A es un reemplazo de leucina con alanina en la posición de aminoácido 235 en la región constante de Igγ1 humana de acuerdo con el índice EU. La mutación de aminoácidos L234A y L235A de la región constante de Igγ1 humana se denomina "mutación LALA". Se sabe que esta mutación reduce la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad dependiente del complemento de un anticuerpo (Mol. Immunol., 1992, Vol. 29, p. 633-639).

La región Fc del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede contener además una mutación basada en otra técnica conocida. Por ejemplo, la región Fc puede contener la mutación P329A (J Biol Chem., 2001, vol. 276, número 9, pág. 6591-6604) o una mutación basada en la técnica de botón en ojal (en adelante también denominada "mutación botón en ojal"). La mutación P329A tiene el efecto de mantener bajas las actividades de ADCC y CDC al atenuar la unión a FcγR y C1q. De acuerdo con la técnica de botón en ojal, una cadena lateral de aminoácidos presente en la región CH3 de una cadena pesada se reemplaza con una cadena lateral más grande (botón), y una cadena lateral de aminoácidos presente en la región CH3 de otra cadena pesada se reemplaza con una cadena lateral más pequeña (ojal), y de esta manera, la heterodimerización de las cadenas pesadas se acelera con el botón dispuesto dentro del ojal, y de esta manera, se puede obtener de manera eficiente una molécula de anticuerpo heterodimerizada de interés (Nature, 1994, Vol. 372, p. 379-383).

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención incluye una región Fc que comprende la mutación LALA. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención incluye una región Fc que comprende la mutación P329A. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención incluye una región Fc que comprende una mutación botón en ojal. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención incluye una región Fc que comprende una o más mutaciones de mutación LALA, mutación P329A y mutación botón en ojal. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención incluye una región Fc que comprende la mutación LALA y la mutación botón en ojal. En una modalidad, la mutación botón en ojal contenida en el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende la mutación T366W en un polipéptido Fc que forma la región Fc, y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en otro polipéptido Fc que forma la región Fc (véase la Publicación Internacional Núm. WO 1998/050431).

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un primer polipéptido Fc que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 229 a 445 de SEQ ID NO: 10. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un segundo polipéptido Fc que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 270 a 486 de SEQ ID NO: 14; una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 270 a 486 de la SEQ ID NO: 16; o una secuencia de

aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 270 a 486 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polinucleótido descrito en cualquiera de (a) a (c):

(a) una región Fc que consiste en un primer polipéptido Fc que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 229 a 445 de SEQ ID NO: 10 y un segundo polipéptido Fc consistente en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 270 a 486 de SEQ ID NO: 14;

(b) una región Fc que consiste en un primer polipéptido Fc que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 229 a 445 de SEQ ID NO: 10 y un segundo polipéptido Fc consistente en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 270 a 486 de SEQ ID NO: 16; y

(c) una región Fc que consiste en un primer polipéptido Fc que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 229 a 445 de SEQ ID NO: 10 y un segundo polipéptido Fc consistente en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 270 a 486 de SEQ ID NO: 18.

En el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención, el fragmento de cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 y el primer polipéptido Fc pueden estar unidos a través de una región de bisagra para formar una cadena pesada del anticuerpo anti-CD37.

Alternativamente, en el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención, la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc pueden estar unidos a través de una región bisagra.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que el fragmento de cadena pesada de la región Fab del anticuerpo anti-CD37 y el primer polipéptido Fc están unidos a través de una región bisagra. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polipéptido en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos a través de una región bisagra. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un fragmento de cadena pesada de la región Fab del anticuerpo anti-CD37 y el primer polipéptido Fc están unidos a través de una región bisagra; y un polipéptido en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos a través de una región bisagra.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende una cadena pesada en la que el fragmento de cadena pesada de la región Fab del anticuerpo anti-CD37 y el primer polipéptido Fc están unidos a través de una región bisagra; una cadena ligera de la región anti-CD37 scFv; y un polipéptido en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos a través de una región bisagra.

En el caso de comprender una región bisagra, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede contener una mutación en la región bisagra basándose en una técnica conocida.

Por ejemplo, la región bisagra puede contener la mutación C220S (Methods, 2019, Vol. 154, p. 38-50). La mutación C220S tiene como objetivo eliminar la cisteína en la posición 220, que ha quedado libre como resultado de la pérdida de la cisteína emparejada debido a la pérdida de la cisteína presente en la región constante de la cadena ligera. Cuando el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende una región bisagra, en una modalidad, la región bisagra une la región anti-CD3 scFv al segundo polipéptido Fc.

En una modalidad del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención, la región Fc comprende la mutación LALA, la mutación P329A y la mutación botón en ojal, y la región de bisagra que une la región anti-CD3 scFv al segundo polipéptido Fc comprende la mutación C220S.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polipéptido que comprende una región bisagra que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 214 a 445 de SEQ ID NO: 10 y el primer polipéptido Fc. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polipéptido que comprende una región bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 255 a 486 de SEQ ID NO: 14; una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 255 a 486 de la SEQ ID NO: 16; o una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 255 a 486 de la SEQ ID NO: 18; y el segundo polipéptido.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende polipéptidos descritos en cualquiera de (a) a (c):

(a) un polipéptido que comprende una región de bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 214 a 445 de SEQ ID NO: 10 y el primer polipéptido Fc; y un polipéptido que comprende una región tipo bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 255 a 486 de SEQ ID NO: 14 y el segundo polipéptido Fc;

(b) un polipéptido que consiste en una región bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 214 a 445 de SEQ ID NO: 10 y el primer polipéptido Fc; y un polipéptido que comprende una región tipo bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 255 a 486 de SEQ ID NO: 16 y el segundo polipéptido Fc; y

(c) un polipéptido que consiste en una región bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 214 a 445 de SEQ ID NO: 10 y el primer polipéptido Fc; y un polipéptido que comprende una región tipo bisagra que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 255 a 486 de SEQ ID NO: 18 y el segundo polipéptido Fc.

En la presente especificación, las mutaciones de aminoácidos como la mutación LALA, la mutación P329A, la mutación botón en ojal y la mutación C220S se describen en función de las posiciones de los aminoácidos en la región constante de IgY1 humana de acuerdo con el índice EU. Por ejemplo, como se describió anteriormente, L234A es un reemplazo de leucina con alanina en la posición de aminoácido 234 en la región constante de IgY1 humana de acuerdo con el índice EU.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es cualquiera de (a) a (c):

(a) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(b) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; y

(c) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede modificarse postraduccionalmente. En una modalidad, la modificación postraducciona es la piroglutamilación en el extremo N de la región variable de la cadena pesada y/o la eliminación de lisina en el extremo C de la cadena pesada. Se sabe en la técnica que la modificación postraducciona por piroglutamilación en el extremo N o la delección de lisina en el extremo C no afecta la actividad del anticuerpo

(Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, p. 24-39).

El anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se une al CD37 humano (número de acceso de GenBank NM_001774.3) y a la proteína del complejo CD3εδ humano (CD3ε: GenBank Acceso No. NM_000733.3 y CD3δ: GenBank Acceso No. NM_000732.4 o NM_001040651.1). Es posible confirmar si el anticuerpo se une a la proteína del complejo CD37 humano y CD3εδ humano utilizando un método de medición de actividad de unión conocida. Ejemplos de métodos para medir la actividad de unión incluyen el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) y la citometría de flujo. En el caso de utilizar ELISA, por ejemplo, se puede emplear un método descrito en el Ejemplo 1-4.

El anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede ser producido por aquellos técnicos en la materia mediante un método conocido en la materia basado en información de secuencia y similares sobre el anticuerpo anti-CD37 y la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de la región anti-CD3 scFv divulgada en este documento. Además, la región anti-CD3 scFv del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede ser producida por aquellos técnicos en la materia mediante un método conocido en la materia basado en información de secuencia y similares en la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 conocido.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En la producción de un anticuerpo humanizado, se puede introducir apropiadamente una mutación inversa empleando un método bien conocido por los técnicos en la materia (Bioinformatics, 2015, Vol. 31, p. 434-435). El anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se puede producir mediante, pero no particularmente limitado a, un método descrito más adelante en la sección "Método para producir el anticuerpo biespecífico de la invención y anticuerpo biespecífico de la invención producido por el método", por ejemplo.

Polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona un polinucleótido para usarse en la producción del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención (también denominado "polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención").

En una modalidad, el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en (a) a (j):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12;

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(d) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(e) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(f) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;

(g) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-cD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;

(h) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(i) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; y

(j) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En una modalidad, el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención, que codifica la región Fab de un anticuerpo anti-CD37, comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de SEQ ID NO: 10, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12.

En una modalidad, el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en (k) a (p):

(k) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(l) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos

en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(m) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(n) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(o) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(p) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, los polinucleótidos del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en (a) a (c):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena

pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y,

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, los polinucleótidos del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en (a) a (c):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una

secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, los polinucleótidos del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en (a) a (c):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; y

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

El polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede ser producido por aquellos técnicos en la materia basándose en la secuencia de nucleótidos del mismo empleando un método conocido en este campo técnico. Por ejemplo, el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se puede sintetizar empleando un método de síntesis genética conocido en este campo técnico. Como el método de síntesis genética, se puede utilizar cualquiera de varios métodos conocidos por los técnicos en la materia, tales como un método para sintetizar un gen de anticuerpo descrito en la Publicación Internacional Núm. WO 90/07861.

Vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende polinucleótidos del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención (también denominado "vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención") descrito en (a) a (j). Estos polinucleótidos pueden estar contenidos cada uno en diferentes vectores, o una pluralidad de polinucleótidos pueden estar contenidos en un vector:

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12;

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(d) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(e) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(f) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;

(g) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-cD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;

(h) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(i) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; y

(j) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En una modalidad, el vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de SEQ ID NO: 10, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12.

En una modalidad, el vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polinucleótido descrito en cualquiera de (k) a (p):

(k) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(l) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(m) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(n) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(o) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de

cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

- 5 (p) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, el vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polinucleótido descrito en cualquiera de (a) a (c):

- (a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

- (b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

- 35 (c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-

CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, el vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polinucleótido descrito en cualquiera de (a) a (c):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que

comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, el vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polinucleótido descrito en cualquiera de (a) a (c):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; y

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

El vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención no está particularmente limitado siempre que pueda producir un polinucleótido en varias células hospederas tales como una célula eucariota (por ejemplo, una célula animal, una célula de insecto, una célula vegetal o una levadura) y/o una célula procariota (tal como *E. coli*). Los ejemplos del vector de expresión incluyen un vector plasmídico y un vector de virus. Como vector plasmídico, se pueden utilizar, por ejemplo, la serie pcDNA (Thermo Fisher Scientific), pALTER(R)-MAX (Promega Corporation), pHEK293 Ultra Expression Vector (Takara Bio Inc.) o pEE 6.4 o pEE 12.4 (Lonza Biologics). Como vector viral se puede utilizar, por ejemplo, un lentivirus, un adenovirus, un retrovirus o un virus adenoasociado. Por ejemplo, cuando se utiliza un lentivirus para introducir el polinucleótido en una célula, se puede utilizar el vector pLV SIN-CMV/EF1 α (Takara Bio Inc.) o el vector pLenti (Thermo Fisher Scientific) como lentivirus. En una modalidad, un vector utilizado en el vector de expresión para el anticuerpo biespecífico de la presente invención es pcDNA™

3.4-TOPO(R) (Thermo Fisher Scientific) o pcDNA™ 3.1 (Thermo Fisher Scientific).

El vector de expresión para el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede contener un promotor unido operativamente al polinucleótido. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido en una célula animal incluyen un promotor derivado de virus como CMV, RSV y SV40, un promotor de actina, un promotor EF (factor de elongación) 1 α y un promotor de choque térmico. Ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido en una bacteria (como *Escherichia*) incluyen un promotor trp, un promotor lac, un promotor λ PL y un promotor tac. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido en una levadura incluyen un promotor GAL1, un promotor GAL10, un promotor PHO5, un promotor PGK, un promotor GAP y un promotor ADH.

Cuando se utiliza una célula animal, una célula de insecto o una levadura como célula hospedera para la preparación de un vector de expresión, el vector de expresión para el anticuerpo biespecífico de la presente invención puede incluir un codón de inicio y un codón de parada. En este caso, se pueden incluir una secuencia potenciadora, las regiones no traducidas 5' y 3' de un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención, o la cadena pesada o la cadena ligera del mismo, una secuencia señal secretora, una unión de empalme, un sitio de poliadenilación o una unidad replicable. Cuando se utiliza *E. coli* como célula hospedera, el vector de expresión de la presente invención puede incluir un codón de inicio, un codón de paro, una región terminadora y una unidad replicable. El vector de expresión de la presente invención puede contener un gen marcador de selección de fármacos que se utiliza habitualmente según el propósito (como un gen de resistencia a la tetraciclina, un gen de resistencia a la ampicilina, un gen de resistencia a la kanamicina, un gen de resistencia a la neomicina y un gen de dihidrofolato reductasa).

Célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona una célula hospedera que ha sido transformada por el vector de expresión del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención o que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 en la célula (colectivamente también denominado "célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención"). La célula hospedera comprende no sólo una célula para cultivar *in vitro* sino también una célula que constituye un tejido *in vivo*.

En una modalidad, las células hospederas que comprenden el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprenden un polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención descrito en (a) a (j) o un vector de expresión del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención que comprende el polinucleótido:

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12;

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(d) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(e) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(f) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;

(g) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-cD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;

(h) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(i) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; o

(j) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En una modalidad, la célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de SEQ ID NO: 10, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12.

En una modalidad, la célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende un polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención descrito en cualquiera de (k) a (p):

(k) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(l) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(m) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(n) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(o) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(p) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, la célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende polinucleótidos descritos en cualquiera de (a) a (c):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena

pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

5 (b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos
10 en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la
15 SEQ ID NO: 16; y

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-
20 CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-
25 CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, la célula hospedera que comprende el polinucleótido de un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende polinucleótidos descritos en cualquiera de (a) a (c):

30 (a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que
35 comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste

en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12 y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, la célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende polinucleótidos descritos en cualquiera de (a) a (c):

(a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un

polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; y

(c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

La célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención no está particularmente limitada siempre que sea compatible con el vector de expresión o el método de transferencia genética utilizado y pueda expresar el polipéptido codificado por el polinucleótido. Ejemplos de la célula hospedera incluyen varias células tales como células convencionales usualmente utilizadas en este campo técnico y células establecidas artificialmente (por ejemplo, células animales (tales como una célula CHO-K1, una célula ExpiCHO-S (R), una célula CHOK1SV, una célula CHO-DG44, una célula HEK293 y una célula NS0), células de insectos (tales como Sf9), bacterias (tales como *Escherichia*) y levaduras (tales como *Saccharomyces* y *Pichia*). En una modalidad, la célula hospedera de la presente invención es una célula CHO-K1 o una célula ExpiCHO-S (R).

El método de introducción del polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención o el vector de expresión del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención en la célula hospedera no está particularmente limitado y, por ejemplo, se puede utilizar un método generalmente utilizado por los técnicos en la materia, como el método del fosfato de calcio, el método de electroporación y el método de lipofección. Los sistemas de administración generalmente conocidos de polinucleótidos, como liposomas, nanopartículas lipídicas y exosomas, pueden utilizarse como métodos de lipofección.

La selección de la célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención se puede realizar mediante un método utilizado habitualmente por los técnicos en la materia. Los ejemplos del método de selección disponible incluyen un método de selección de fármacos que utiliza un gen marcador de selección de fármacos y un fármaco como tetraciclina, ampicilina, neomicina e higromicina; y un método de aislamiento de células como un método de dilución limitante, un método de clasificación de células individuales y un método de recogida de colonias.

Método de producción del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona un método para producir el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención (también denominado "método de producción del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención"). El método de producción del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede incluir el cultivo de la célula hospedera

que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 descrito en la sección de "Célula hospedera que comprende el polinucleótido de anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención" para expresar el anticuerpo en la célula o en un sobrenadante de cultivo, y un método para recolectar, aislar y purificar el anticuerpo, por ejemplo, pero no se limita a dicho método siempre que se pueda producir el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención.

La célula hospedera que comprende el polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención puede cultivarse mediante un método conocido. Las condiciones de cultivo tales como la temperatura, el pH de un medio y el tiempo de cultivo pueden ser seleccionados apropiadamente por aquellos técnicos en la materia. Cuando la célula hospedera es una célula animal, por ejemplo, medio esencial mínimo (MEM) (Science, 1959, Vol. 130, p. 432-437), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) (Virol., 1959, Vol. 8, p. 396), medio RPMI-1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, Vol. 199, p. 519), o medio 199 (Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, p. 1-8) se puede utilizar como medio un medio que comprenda entre un 5 % y un 20 % de suero bovino fetal. El pH del medio es, por ejemplo, de aproximadamente 6 a 8, y el cultivo se realiza habitualmente a unos 30 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 336 horas con aireación o agitación, si es necesario. Cuando la célula hospedera es una célula de insecto, por ejemplo, el medio de Grace (Proc. Natl. Acad. Sci. Med., 1985, Vol. 82, p. 1-8404) se puede utilizar como medio un medio que comprenda entre un 5 % y un 20 % de suero bovino fetal. El pH del medio es, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 8, y el cultivo se realiza habitualmente a aproximadamente 20 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 100 horas con aireación o agitación, si es necesario. Cuando la célula hospedera es *E. coli* o una levadura, por ejemplo, se utiliza adecuadamente como medio un medio líquido que comprende una fuente de nutrición. El medio nutritivo comprende, por ejemplo, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico necesaria para el crecimiento de la célula hospedera transformada. Ejemplos de fuentes de carbono incluyen glucosa, dextrano, almidón soluble y sacarosa; los ejemplos de fuentes de nitrógeno inorgánico o de nitrógeno orgánico incluyen sales de amonio, sales de ácido nítrico, aminoácidos, un licor de maíz, peptona, caseína, un extracto de carne, una torta de soya y un extracto de papa. Se pueden incluir otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (como cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de magnesio) o vitaminas), un antibiótico (como tetraciclina, neomicina, ampicilina o kanamicina) o similares, si se desea. El pH del medio es, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 8. Cuando la célula hospedera es *E. coli*, por ejemplo, se puede utilizar como medio de cultivo medio Luria Bertani (LB), medio M9 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. 3, A2.2) o similar. El cultivo se realiza habitualmente a aproximadamente 14 a 43 °C durante aproximadamente 3 a 24 horas con aireación o agitación, si es necesario. Cuando la célula hospedera es una levadura, por ejemplo, se puede usar medio mínimo de Burkholder (Proce. Natl. Acad. Sci. USA., 1980, Vol. 77, p. 4505) o similar como medio. El cultivo se realiza habitualmente a aproximadamente 20 a 35 °C durante aproximadamente 14 a 144 horas con aireación o agitación, si es necesario. A través de dicho cultivo, se puede expresar el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención.

El método de producción del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención

puede incluir, además de cultivar la célula hospedera que comprende un polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención para expresar el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3, recolectar, aislar o purificar el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la célula hospedera transformada. Los ejemplos de un método de aislamiento o purificación incluyen un método que utiliza solubilidad, tal como precipitación salina (*salting-out*) y un método de precipitación por solvente; un método que utiliza una diferencia en un peso molecular, tal como diálisis, ultrafiltración y filtración en gel; un método que utiliza carga, tal como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de hidroxipatita; un método que utiliza una afinidad específica, tal como la cromatografía de afinidad; un método que utiliza una diferencia en hidrofobicidad, tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa; y un método que utiliza una diferencia en un punto isoelectrónico, tal como isoelectroenfoque. En una modalidad, el anticuerpo secretado en un sobrenadante de cultivo se puede purificar mediante diversas cromatografías, como la cromatografía en columna utilizando una columna de proteína A o una columna de proteína G.

El anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención también comprende un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 producido mediante el método de producción del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención.

Composición farmacéutica del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 (también denominada la "composición farmacéutica del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención"). La composición farmacéutica del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención comprende una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mediante un método habitualmente utilizado con un excipiente habitualmente utilizado en este campo técnico, es decir, un excipiente farmacéutico, un vehículo farmacéutico o similar. Los ejemplos de una forma de dosificación de dicha composición farmacéutica incluyen agentes parenterales, tales como una inyección y una gota, que pueden administrarse mediante administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraperitoneal o similares. En la formulación, se puede utilizar un excipiente, un vehículo, un aditivo o similar adecuado para la forma de dosificación en un intervalo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un producto modificado postraduccionalmente del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o similar que ha sufrido ambas o una de eliminación de lisina en el extremo C terminal o piroglutamilación en el extremo N terminal, puede quedar comprendida en la presente invención.

En una modalidad, la composición farmacéutica del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención seleccionado de cualquiera de (a) a (c) y/o un producto modificado postraduccionalmente del anticuerpo:

(a) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(b) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 16 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 16; y

(c) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada de el anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 115 de la SEQ ID NO: 10; una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 12; y un polipéptido en el que un segundo polipéptido Fc está unido a una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 18 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención seleccionado de cualquiera de (a) a (c) y/o un producto modificado postraduccionalmente del anticuerpo:

(a) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(b) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; y

(c) un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos, y/o un producto modificado postraduccionalmente del anticuerpo.

En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos, y/o un producto modificado postraduccionalmente del anticuerpo.

En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD37 que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos, y/o un producto modificado postraduccionalmente del anticuerpo.

Las cantidades del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención agregadas en la formulación varían dependiendo del grado de síntoma y la edad del paciente, una forma de dosificación de la formulación a utilizar, un título de unión del anticuerpo o similares, y, por ejemplo, pueden ser aproximadamente de 0.001 mg/kg a 100 mg/kg.

Uso farmacéutico del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención

El anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención y una composición

farmacéutica que lo comprende pueden usarse para tratar el cáncer. Además, la presente invención comprende un método para tratar el cáncer, el método comprende administrar, a un sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención. Además, la presente invención comprende el anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 para tratar el

5 cáncer. Además, la presente invención comprende el uso del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la presente invención en la producción de una composición farmacéutica para tratar el cáncer. Los ejemplos del cáncer que se tratará mediante la presente invención incluyen, pero no se limitan particularmente a, diseminación peritoneal de varias células cancerosas; cáncer gástrico; cáncer de pulmón; cánceres de la sangre tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda

10 (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de células T y síndromes mielodisplásicos; cánceres sólidos como adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinoma indiferenciado, carcinoma de células grandes, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma, cáncer de piel, linfoma de células T de la piel, cáncer de

15 mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de vagina, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer de intestino delgado, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer de ovario y tumor cerebral; cánceres de tejidos óseos, tejidos cartilaginosos, tejidos adiposos, tejidos musculares, tejidos

20 vasculares y tejidos hematopoyéticos; sarcomas como el condrosarcoma, el sarcoma de Ewing, el hemangioendotelioma maligno, el schwannoma maligno, el osteosarcoma y el sarcoma de tejidos blandos; y blastomas como el glioblastoma, el glioblastoma multiforme, el hepatoblastoma, el meduloblastoma, el nefroblastoma, el neuroblastoma, pancreatoblastoma, blastoma pleuropulmonar y retinoblastoma.

En una modalidad, el cáncer que se va a tratar mediante la presente invención es linfoma no

25 Hodgkin, linfoma de células B, CLL, AML o linfoma de células T. En una modalidad, el cáncer que se va a tratar mediante la presente invención es preferiblemente linfoma no Hodgkin, linfoma de células B o CLL.

Anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona un anticuerpo multiespecífico anti-antígeno asociado a tumor (TAA)/anti-CD3 (también denominado "anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente

30 invención") que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-TAA que se une a TAA; y una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que se une a CD3.

En una modalidad, la región anti-CD3 scFv del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la

35 presente invención es cualquiera de (1) a (16):

(1) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 14 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste

anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 34 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

(12) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 36 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

(13) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 38 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

(14) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 40 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 42 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

(16) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 44 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 44.

En una modalidad, la región anti-CD3 scFv del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención es cualquiera de (1) a (16):

(1) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(3) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(4) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 20;

(5) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 22;

(6) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 24;

(7) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de

aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 26;

(8) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 28;

5 (9) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 30;

(10) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

(11) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

10 (12) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

(13) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

15 (14) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

(16) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 44.

20 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3. En este campo técnico se conocen varios formatos de un anticuerpo biespecífico que comprende una región scFv, y cualquiera de estos formatos se puede utilizar para un anticuerpo biespecífico, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención (mAbs, 2017, Vol. 9, p. 182-212).

25 En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo biespecífico (también denominado "anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención") que tiene estructuras de acuerdo con (a) a (c):

30 (a) una región Fab de un anticuerpo anti-TAA que consiste en un fragmento de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TAA y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TAA;

(b) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3; y

(c) una región Fc que consiste en un primer polipéptido Fc unido al fragmento de cadena pesada de la región Fab (a) y un segundo polipéptido Fc unido a la región anti-CD3 scFv (b).

35 En el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención, cualquiera de las regiones constantes Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ e Ig ϵ puede seleccionarse como la región Fc. La Ig γ se puede seleccionar, por ejemplo, entre Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 e Ig γ 4. En una modalidad, el primer polipéptido Fc y el segundo polipéptido Fc son polipéptidos Fc derivados de la región constante Ig γ 1 humana. La región Fc

puede tener, por ejemplo, una mutación botón en ojal. Los ejemplos de la mutación botón en ojal que se utilizarán incluyen, pero no se limitan a, la mutación T366W en un polipéptido Fc que forma la región Fc, y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en otro polipéptido Fc que forma la región Fc (véase la Publicación Internacional Núm. WO 1998/050431). En una modalidad, la mutación botón en ojal contenida en el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención es la mutación T366W en un polipéptido Fc que forma la región Fc, y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en otro polipéptido Fc que forma la región Fc.

La región Fc del anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede contener una mutación que deteriora la ADCC o la CDC descrita en la sección "Anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención". Los ejemplos de la mutación que deteriora el ADCC o el CDC incluyen, entre otros, la mutación LALA.

La región Fc del anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede contener además una mutación basada en otra técnica conocida. Por ejemplo, la región Fc puede contener la mutación P329A, la mutación P331G o la mutación P331S. La mutación P329A es un reemplazo de prolina con alanina en la posición de aminoácido 329 en la región constante de IgG1 humana, y la mutación P331G y la mutación P331S son cada una un reemplazo de prolina con glicina o serina en la posición de aminoácido 331 en la región constante de IgG1 humana. Se sabe que la mutación P329A deteriora la actividad ADCC de los anticuerpos, y se sabe que la mutación P329A, la mutación P331G y la mutación P331S deterioran la CDC de los anticuerpos (J Immunol., 2000, Vol. 164 (8). p. 4049-4184). Aquí las posiciones 329 y 331 son posiciones de aminoácidos en la región constante de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU.

En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende una mutación botón en ojal. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende mutaciones de aminoácidos de L234A y L235A (mutación LALA). En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende una mutación botón en ojal o una mutación LALA. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende una mutación botón en ojal y una mutación LALA. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende la mutación P329A. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende la mutación P331G o la mutación P331S. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende una o más mutaciones de la mutación botón en ojal, mutación LALA, mutación P329A, mutación P331G y mutación P331S. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende una mutación botón en ojal y/o una mutación LALA, y una mutación P329A y/o una mutación P331G o una mutación P331S. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende una región Fc que comprende una mutación botón en ojal y/o una mutación LALA, y una

mutación P329A y/o una mutación P331G.

En el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención, el fragmento de cadena pesada de la región Fab del anticuerpo anti-TAA y el primer polipéptido Fc pueden estar unidos a través de una región bisagra. Alternativamente, en el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención, la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc pueden estar unidos a través de una región bisagra. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende un fragmento de cadena pesada de la región Fab del anticuerpo anti-TAA y el primer polipéptido Fc que están unidos a través de una región bisagra, y la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc que están unidos a través de una región bisagra.

En el caso de comprender una región bisagra, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede contener una mutación en la región bisagra basándose en una técnica conocida. Por ejemplo, la región bisagra puede contener la mutación C220S (Methods, 2019, Vol. 154, p. 38-50). La mutación C220S tiene como objetivo eliminar la cisteína en la posición 220, que ha quedado libre como resultado de la pérdida de la cisteína emparejada debido a la pérdida de la cisteína presente en la región constante de la cadena ligera. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende la mutación C220S en la región bisagra que une la región anti-CD3 scFv al segundo polipéptido Fc. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención comprende mutación botón en ojal, mutación LALA y mutación P329A y/o mutación P331G en la región Fc, y mutación C220S en la región bisagra que une la región anti-CD3 scFv al segundo polipéptido Fc.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo multiespecífico que es un anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3, que comprende: una cadena pesada de un anticuerpo anti-TAA en el que el primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TAA; una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TAA; y un polipéptido en el que la región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que se une a CD3 y un segundo polipéptido Fc están unidas, en donde el polipéptido, en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidas, es cualquiera de (1) a (16):

(1) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(2) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(3) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(4) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(5) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 en el que

la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(6) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(7) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(8) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(9) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(10) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(11) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(12) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(13) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(14) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos;

(15) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos; y

(16) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos.

En general, se sabe que en condiciones en las que un anticuerpo biespecífico que se une a dos moléculas de antígeno está presente en una concentración mayor que el antígeno, se forman una gran cantidad de dímeros en los que el anticuerpo biespecífico se une a solo una de las moléculas de antígeno, inhibiendo la formación de trímeros que se unen a ambos antígenos. Como resultado, se sabe, por ejemplo, que el efecto de la actividad citotóxica de las células T se atenúa en un intervalo de concentración alto de un anticuerpo de reclutamiento de células T que se une a CD3 (AAPS J. 2019, Vol. 21(4), p. 66). En el anticuerpo de reclutamiento de células T biespecífico, una disminución en la cantidad de citocinas producidas (por ejemplo, IFN- γ y TNF- α) y la atenuación de la actividad citotóxica en un intervalo alto de concentración de anticuerpos se consideran el resultado de la inhibición de la formación de los trímeros descritos anteriormente. Estos resultados no se pueden obtener cuando los anticuerpos anti-TAA o anti-CD3 se analizan independientemente, y las propiedades se hacen evidentes solo después de la preparación de anticuerpos de reclutamiento de células T biespecíficos. Las propiedades anteriores se aplican no sólo a los anticuerpos biespecíficos, sino también a los anticuerpos triespecíficos y otros anticuerpos multiespecíficos. Cuando se selecciona un anticuerpo que se desarrollará como producto farmacéutico en función de estas propiedades, se pueden utilizar, por ejemplo, los resultados obtenidos

mediante el ensayo de citotoxicidad de células T redirigidas (RTCC, por sus siglas en inglés) o la evaluación de producción de citocinas descrita en el Ejemplo 4.

El anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede ser un anticuerpo triespecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 (también denominado "anticuerpo triespecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención") en el que una región anti-CD137 scFv que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD137 que se une a CD137 está unida además al anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo triespecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 en el que una región anti-CD137 scFv que se une a CD137 se agrega además al anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención.

En una modalidad, el anticuerpo triespecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención comprende una región anti-CD137 scFv de acuerdo con cualquiera de (a) a (e):

(a) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 46, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 66 en SEQ ID NO: 46, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 99 a 107 de la SEQ ID NO: 46; y una región variable de una cadena ligera que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 157 a 167 de la SEQ ID NO: 46, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 183 a 189 en SEQ ID NO: 46, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 222 a 231 de la SEQ ID NO: 46;

(b) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 48, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 65 en SEQ ID NO: 48, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 98 a 107 en SEQ ID NO: 48; y una región variable de una cadena ligera que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 156 a 168 de la SEQ ID NO: 48, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 184 a 190 en SEQ ID NO: 48, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 223 a 233 de la SEQ ID NO: 48;

(c) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 23 a 35 de SEQ ID NO: 50, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 51 a 57 en SEQ ID NO: 50, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 90 a 100 de la SEQ ID NO: 50; y una región variable de cadena pesada que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 162 a 166 de la SEQ ID NO: 50, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 181 a 196 en SEQ ID NO: 50, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en

las posiciones de aminoácidos 229 a 238 de la SEQ ID NO: 50;

(d) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 52, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 65 en SEQ ID NO: 52, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 98 a 107 en SEQ ID NO: 52; y una región variable de una cadena ligera que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 156 a 168 de la SEQ ID NO: 52, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 184 a 190 en SEQ ID NO: 52, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 223 a 233 de la SEQ ID NO: 52; y

(e) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 54, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 50 a 65 en SEQ ID NO: 54, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 98 a 110 en SEQ ID NO: 54; y una región variable de una cadena ligera que comprende un CDR1 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 159 a 171 de la SEQ ID NO: 54, un CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 187 a 193 en SEQ ID NO: 54, y un CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 226 a 236 de la SEQ ID NO: 54.

En una modalidad, el anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención comprende una región anti-CD137 scFv de acuerdo con cualquiera de (a) a (e):

(a) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO: 46 y una región variable de una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 134 a 242 de la SEQ ID NO: 46;

(b) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO: 48 y una región variable de una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 134 a 244 de la SEQ ID NO: 48;

(c) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 111 de SEQ ID NO: 50 y una región variable de una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 132 a 249 de la SEQ ID NO: 50;

(d) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO: 52 y una región variable de una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 134 a 244 de la SEQ ID NO: 52; y

(e) una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada que consiste

en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 121 de SEQ ID NO: 54 y una región variable de una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 137 a 247 de la SEQ ID NO: 54.

En una modalidad, el anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención comprende una región anti-CD137 scFv de acuerdo con cualquiera de (a) a (e):

(a) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 242 de la SEQ ID NO: 46;

(b) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 48;

(c) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 249 de la SEQ ID NO: 50;

(d) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 52; y

(e) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO: 54.

En el anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137, el número de regiones anti-CD137 scFv y sitios de fusión no está particularmente limitado y, por ejemplo, la región anti-CD137 scFv está enlazada al extremo carboxilo terminal del primer polipéptido Fc o del segundo polipéptido Fc, o al extremo amino terminal o al extremo carboxilo terminal de la cadena ligera del anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3. En una modalidad, el anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención comprende una región anti-CD137 scFv que está unida al extremo carboxilo terminal del primer polipéptido Fc o del segundo polipéptido Fc del anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3. En una modalidad, el anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención comprende una región anti-CD137 scFv que está unida a los extremos carboxilo terminales del primer polipéptido Fc y del segundo polipéptido Fc del anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención es un anticuerpo trispecífico que tiene estructuras de acuerdo con (a) a (d):

(a) una región Fab de un anticuerpo anti-TAA que consiste en un fragmento de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TAA y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TAA;

(b) una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3;

(c) una región Fc que consiste en un primer polipéptido Fc unido al fragmento de cadena pesada de la región Fab (a) y un segundo polipéptido Fc unido a la región anti-CD3 scFv (b); y

(d) una región anti-CD137 scFv unida a uno o ambos extremos carboxilo terminal del primer polipéptido Fc y del segundo polipéptido Fc.

En una modalidad, el anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención es un anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 que comprende una cadena pesada

de un anticuerpo anti-TAA en el que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TAA; una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TAA; y un polipéptido en el que están unidas una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que se une a CD3 y un segundo polipéptido Fc, en donde una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD137 también está unida a uno o ambos extremos carboxilo terminales del primer polipéptido Fc y del segundo polipéptido Fc.

En una modalidad, el anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención es un anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 que comprende una cadena pesada en la que un primer polipéptido Fc está unido a un fragmento de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TAA; una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-TAA; y un polipéptido en el que están unidas una región anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 que se une a CD3 y un segundo polipéptido Fc, en donde una región anti-CD137 scFv que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD137 también está unida a uno o ambos extremos carboxilo terminales del primer polipéptido Fc y del segundo polipéptido Fc,

en donde la región anti-CD3 scFv es cualquiera de (1) a (16):

(1) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(3) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(4) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 20;

(5) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 22;

(6) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 24;

(7) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 26;

(8) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 28;

(9) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 30;

(10) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones

de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

(11) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

(12) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

(13) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

(14) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

(16) una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 44, y

en donde la región anti-CD137 scFv es cualquiera de (a) a (e):

(a) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 242 de la SEQ ID NO: 46;

(b) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 48;

(c) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 249 de la SEQ ID NO: 50;

(d) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 52; y

(e) una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO: 54.

El anticuerpo anti-TAA que se utilizará en el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención no está particularmente limitado siempre que comprenda una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que se unan a TAA expresado en la superficie de células cancerosas humanas. El TAA es deseablemente un antígeno que se expresa sólo en células cancerosas o se sobreexpresa en células cancerosas.

En una modalidad, el anticuerpo anti-TAA que se utilizará en el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención es un anticuerpo anti-TAA que se une a cualquiera de los TAA:

HER2, HER3, HER4, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD40, CD44, CD70, CD123, CD138, CXCR3, CXCR5, CCR3, CCR4, CCR9, CRTH2, PMCH, CD4, CD25, CD200, endoplasmina, BCMA, CD276, TSPAN8, CLDN4, CLDN6, CLDN18.2, ENPP3, SLC34A2, TROP2, MerTK, Nectina-4, ASGR1, mesotelina, PSMA, LIV-1, MUC1, MUC2, MUC4, MUC16, CDH6, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20, CEACAM21, URLC10, NY-ESO-1, GAA, OFA, cyclinB1, WT-1, CEF, VEGRR1, VEGFR2, TTK, HPV16, HPV16E7, HPV18, CEAIMA910, KOC1, SL-701, MART-1, gp100, tirosinasa, survivina, MAGE-3.1, MAGE-10.A2, OVA BiP,

gp209-2M, melan-A, NA17.A2, KOC1, CO16, DEPDC1, MPHOSPH1, MAGE12, ONT-10, GD2L, GD3L, URLC10, CDCA1, TF, PSA, TERT, STF-II, G17DT, ICT-107, Dex2, hTERT, PAP, TRP2, LRRC15, c-Met, PD-L1, FAP, EGFR, B3-H3, GPC2, GPC3, 5T4

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede modificarse postraduccionamente. En una modalidad, la modificación postraducciona es la piroglutamilación en el extremo N de la región variable de la cadena pesada y/o la eliminación de lisina en el extremo C de la cadena pesada. Se sabe en el campo técnico que la modificación postraducciona por piroglutamilación en el extremo N o la deleción de lisina en el extremo C no afecta la actividad del anticuerpo (Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, p. 24-39).

Polinucleótido del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la invención

La presente invención proporciona un polinucleótido para usarse en la producción del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención (también denominado "polinucleótido del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención"). En una modalidad, el polinucleótido para usarse en la producción del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención es un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en (1) a (16):

(1) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(3) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(4) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 20;

(5) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 22;

(6) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 24;

(7) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 26;

(8) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID

NO: 28;

(9) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 30;

5 (10) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

(11) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

(12) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

15 (13) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

(14) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

20 (15) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

(16) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 44.

En una modalidad, el polinucleótido para usarse en la producción del anticuerpo trispecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 de la presente invención es un polinucleótido que codifica una región anti-CD137 scFv seleccionada del grupo que consiste en (a) a (e):

30 (a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 242 de la SEQ ID NO: 46;

(b) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 48;

35 (c) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 249 de la SEQ ID NO: 50;

(d) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137

scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 244 de la SEQ ID NO: 52; y

(e) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una región anti-CD137 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO: 54.

El polinucleótido del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede ser producido fácilmente por aquellos técnicos en la materia con referencia a la sección de "Polinucleótido del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención".

Vector de expresión para el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende polinucleótidos que codifican el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención (también denominado "vector de expresión del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención"). El vector de expresión puede ser producido fácilmente por aquellos técnicos en la materia con referencia a la sección de "Vector de expresión del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención". Los polinucleótidos del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención pueden estar contenidos cada uno en diferentes vectores, o una pluralidad de polinucleótidos pueden estar contenidos en un vector.

Célula hospedera del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona una célula hospedera que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención (también denominado "célula hospedera del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención"). La célula hospedera que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede ser producida fácilmente por aquellos técnicos en la materia con referencia a la sección de "Célula hospedera del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención".

Método de producción del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona un método para producir el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención (también denominado "método de producción del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención"). El anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede ser producido fácilmente por aquellos técnicos en la materia con referencia a la sección de "Método de producción del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención".

Composición farmacéutica del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la invención

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable (también denominado "composición farmacéutica del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención"). Los ejemplos de la forma de dosificación, excipiente, vehículo, aditivo y similares en la composición farmacéutica del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención incluyen aquellos descritos en la sección de "Composición farmacéutica o similar del anticuerpo

biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención". Las cantidades del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención agregadas en la formulación varían dependiendo del grado de síntoma y la edad del paciente, una forma de dosificación de la formulación a utilizar, un título de unión del anticuerpo o similares, y, por ejemplo, pueden ser aproximadamente de 0.001 mg/kg a 100 mg/kg. La composición farmacéutica del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención se puede utilizar para tratar el cáncer de un sujeto. En una modalidad, la composición farmacéutica del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención se utiliza para tratar el cáncer de un sujeto. La composición farmacéutica del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede ser preparada fácilmente por aquellos técnicos en la materia con referencia a la sección de "Anticuerpo Biespecífico Anti-CD37/Anti-CD3 de la Invención". Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o similar que ha sufrido ambas o una de eliminación de lisina en el extremo C terminal o piroglutamilación en el extremo N terminal, puede quedar comprendida en la presente invención.

Uso farmacéutico del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la invención

El anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención y una composición farmacéutica que lo comprende pueden usarse para tratar el cáncer. Además, la presente invención comprende un método para tratar el cáncer, el método comprende administrar, a un sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención. Además, la presente invención comprende el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 para tratar el cáncer. Además, la presente invención comprende el uso del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención en la producción de una composición farmacéutica para tratar el cáncer. La presente invención proporciona además un método para tratar el cáncer, el método comprende administrar, a un sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención o la composición farmacéutica del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención; un anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 para tratar el cáncer; y el uso del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención en la producción de una composición farmacéutica para tratar el cáncer (todos los cuales se denominan en conjunto "uso farmacéutico del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención"). Los ejemplos del cáncer que se va a tratar en el uso farmacéutico del anticuerpo anti-TAA/anti-CD37 y similares de la presente invención incluyen cánceres descritos en la sección de "Composición farmacéutica del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención". El uso farmacéutico del anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención puede ser realizado por aquellos técnicos en la materia con referencia a la sección de "Uso farmacéutico del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 de la invención".

Anti-CD3 scFv de la invención

La presente invención proporciona además un anti-CD3 scFv de acuerdo con cualquiera de los puntos (1) a (16):

(1) anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-

secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

(11) anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 34 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una

secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

(12) anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 36 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una

secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

(13) anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 38 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una

secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

(14) anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 40 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una

secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 42 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una

secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

(16) anti-CD3 scFv que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 125 de SEQ ID NO: 44 y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3 que consiste en una

secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 146 a 254 de la SEQ ID NO: 44.

En una modalidad, el anti-CD3 scFv de la presente invención es cualquiera de (1) a (16):

(1) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 14;

(2) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 16;

(3) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 18;

(4) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 20;

(5) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 22;

(6) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 24;

(7) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 26;

(8) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 28;

5 (9) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 30;

(10) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 32;

10 (11) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 34;

(12) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 36;

(13) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 38;

15 (14) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 40;

(15) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 42; y

20 (16) anti-CD3 scFv que consiste en una secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 1 a 254 de la SEQ ID NO: 44.

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica el anti-CD3 scFv descrito anteriormente, un vector de expresión que comprende el polinucleótido y una célula hospedera que comprende el polinucleótido o el vector de expresión.

25 El anti-CD3 scFv de la presente invención también está disponible como un anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 que comprende el anticuerpo anti-TAA que se une a TAA y la región anti-CD3 scFv de la presente invención. Además, el anti-CD3 scFv de la presente invención proporciona células, vectores virales o vectores plasmídicos en los que el anti-CD3 scFv se expresa en la superficie celular. Los técnicos en la materia pueden producir dichas células, vectores virales o vectores plasmídicos utilizando el anti-CD3 scFv de la presente invención o un polinucleótido que codifica el anti-CD3 scFv.

30 Se proporcionan aquí ejemplos específicos, a los que se hace referencia para obtener una mejor comprensión de la presente invención, sólo con fines ilustrativos y estos ejemplos no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplos

35 Actualmente, se están desarrollando diversos anticuerpos biespecíficos que reclutan células T dirigidos a TAA como agentes terapéuticos para el cáncer. El presente solicitante ha logrado obtener un anticuerpo biespecífico anti-TSPAN8/anti-CD3 utilizando un anticuerpo anti-TSPAN8 que reconoce selectivamente TSPAN8 expresado en una célula cancerosa (WO 2022/102768) y también ha estado estudiando la aplicación clínica del anticuerpo biespecífico. Además, con el fin de producir una plataforma

de descubrimiento de fármacos para el desarrollo de un anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3, que es un anticuerpo biespecífico que se une a cualquier TAA y CD3, el presente solicitante ha decidido realizar un estudio de mejora del anti-CD3 scFv obtenido en el examen para la preparación del anticuerpo biespecífico anti-TSPAN8-anti-CD3.

Se sabe que la bioactividad de los anticuerpos de reclutamiento de células T biespecíficos se ve afectada por varios factores, como los formatos de los anticuerpos, los niveles de expresión de los TAA específicos, los epítomos reconocidos por los anticuerpos, las afinidades a los TAA y CD3 y la cinética *in vivo*. Desde el punto de vista de la eficacia y la seguridad, los presentes inventores consideraron que la afinidad óptima del anti-CD3 scFv por el CD3 variaría dependiendo del nivel de expresión del TAA que se va a combinar y de la afinidad de un anticuerpo anti-TAA por el TAA, y por lo tanto llevaron a cabo los siguientes estudios bajo el supuesto de que un anticuerpo de reclutamiento de células T biespecífico con un equilibrio óptimo de afinidad podría obtenerse preparando múltiples anti-CD3 scFv que tengan diversa afinidad y buscando una combinación óptima de cualquier anticuerpo anti-TAA y anti-CD3 scFv.

Ejemplo 1: Obtención de anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 con diversa afinidad de unión a CD3

Basado en la información sobre un anticuerpo biespecífico anti-TSPAN8/anti-CD3 compuesto de polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 2, 4 y 6, se realizaron los siguientes estudios para preparar un grupo anti-CD3 scFv con diversa afinidad por CD3.

La cadena pesada del anticuerpo anti-TSPAN8 que consiste en SEQ ID NO: 2 y el polipéptido en el que se encuentra la región anti-CD3 scFv que consiste en SEQ ID NO: 6 y el segundo polipéptido Fc están unidos. Este constructo contiene mutación LALA, mutación N297G y mutación botón en ojal. La mutación LALA se refiere a la mutación de aminoácidos L234A y L235A de la región constante de IgY1 humana. La mutación N297G es el reemplazo de asparagina con glicina en la posición de aminoácido 297 en la región constante de IgY1 humana de acuerdo con el índice EU (Protein cell, 2018, Vol. 9, p. 63-73). La mutación botón en ojal es la mutación T366W en un polipéptido Fc (que corresponde a la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 255 a 486 de SEQ ID NO: 6) que forma la región Fc, y mutaciones T366S, L368A e Y407V en otro polipéptido Fc (correspondiente a la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 220 a 451 de SEQ ID NO: 2) que forma la región Fc. Las posiciones de las mutaciones son posiciones de aminoácidos en la región constante de IgY1 humana de acuerdo con el índice EU.

Ejemplo 1-1: Diseño de secuencia de anti-CD3 scFv con diversa afinidad de unión a CD3

Para estimar los residuos de aminoácidos que pueden afectar la afinidad de unión de CD3 en el anti-CD3 scFv de SEQ ID NO: 6, se realizó un análisis utilizando (1) información pública, (2) información estructural del anticuerpo, (3) información de frecuencia de aminoácidos en cada posición de residuo de aminoácido y (4) información de la secuencia de la línea germinal humana. Los métodos se describen detalladamente a continuación. Como resultado, se diseñaron 66 variantes enumeradas en la Tabla 1.

(1) Como información pública, se utilizaron como referencia ejemplos de modificación de la secuencia de aminoácidos del anti-CD3 scFv descritos en los PTL 1 a 4. PTL 1 describe el anti-CD3 scFv

derivado de ratones. En los PTL 2 a 4, el anti-CD3 scFv derivado de PTL 1 se humaniza y se modifica la afinidad de unión a CD3.

(2) La información estructural de los anticuerpos se tomó de 5FCS (DOI: 10.2210/pdb5FCS/pdb), registrado en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) (Protein Data Bank; <https://www.rcsb.org>) como referencia. El 5FCS contenía información estructural 3D sobre un diacuerpo que tenía una alta identidad de aminoácidos (95 % de identidad para la región variable de la cadena pesada y 93 % de identidad para la región variable de la cadena ligera) con la secuencia de aminoácidos del anti-CD3 scFv contenido en SEQ ID NO: 6, que se utilizó como información para ajustar la afinidad. MOE, un sistema de química computacional integrado proporcionado por *Chemical Computing Group*, se utilizó para observar la información estructural.

(3) La información de frecuencia de aminoácidos en cada posición de residuo de aminoácido se obtuvo con referencia a abYsis (<http://www.abysis.org/abysis/>). Se sabe que la secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo tiene una tendencia a que los aminoácidos aparezcan dependiendo de la posición del residuo. Por ejemplo, en los anticuerpos humanos, se ha descubierto que la glutamina o el ácido glutámico aparece predominantemente como el primer aminoácido en la región variable de la cadena pesada. En otras palabras, se espera que un anticuerpo que tiene un aminoácido que se desvía de esta tendencia de frecuencia de aparición sea físicamente inestable porque la secuencia del anticuerpo no es natural. Por lo tanto, se determinó que esta información sería útil como información para diseñar un anticuerpo estable.

(4) La información de la secuencia de la línea germinal humana se obtuvo con referencia al Sistema de Información Internacional *ImMunoGeneTics* (IMGT, por sus siglas en inglés) (<http://www.IMGT.org/>). Históricamente, los anticuerpos humanizados han logrado reducir el riesgo antigénico en la práctica clínica. Para mantener el riesgo antigénico bajo en la práctica clínica, se diseñaron variantes para que fueran lo más cercanas posible a la secuencia de la línea germinal humana.

Con base en la información de (1) a (4) anteriores, se realizó el siguiente análisis y discusión. Específicamente, por ejemplo, PTL 4 revela que la sustitución del aminoácido 58 (H58) en la numeración de Kabat de la región variable de la cadena pesada, tirosina (Tyr), por alanina (Ala) provoca una disminución en la actividad de unión del anti-CD3 scFv a CD3. Dado que el aminoácido de H58 en SEQ ID NO: 6 también es Tyr, se asumió que el reemplazo con otro aminoácido cambiaba la actividad de unión. Sin embargo, como el mecanismo de la disminución de la actividad de enlace no estaba claro, se utilizó la información estructural del 5FCS registrada en el PDB para un debate más profundo. Cuando se observó la información estructural de 5FCS utilizando MOE, se infirió que Tyr de H58 no estaba directamente involucrado en la unión a un antígeno, pero jugó un papel importante en el mantenimiento de la estructura de CDR-H2 (según la definición de numeración de Kabat) a través de la interacción hidrofóbica. Dado que se sabe generalmente que los CDR desempeñan un papel muy importante en la unión a un antígeno, se consideró que la Tyr de H58 mantenía la capacidad de unión a CD3 al respaldar la estructura de CDR-H2. En otras palabras, dado que se infiere que el H58 no está directamente involucrado en la unión del antígeno, el reemplazo con otro aminoácido tendría menos probabilidades de resultar en una pérdida completa de

actividad. Los aminoácidos candidatos a sustituir se seleccionaron con referencia a la información de frecuencia de aminoácidos en H58. Los resultados revelaron que el ácido aspártico (Asp), la isoleucina (Ile), la lisina (Lys), la asparagina (Asn), la arginina (Arg), la serina (Ser), la treonina (Thr) y similares podrían ser candidatos para el aminoácido a sustituir. De esta forma, se podrían crear anticuerpos modificados estables reemplazando H58 con estos aminoácidos. Finalmente, la confirmación de la secuencia de la línea germinal humana estrechamente relacionada con SEQ ID NO: 6 reveló que H58 de IGHV3-72*01 (Número de acceso IMGT X92206) era ácido glutámico (Glu), y H58 de IGHV3-73*01 (Número de acceso IMGT X70197) era Ala. Por lo tanto, la sustitución de H58 por Glu o Ala reduciría el riesgo de alta antigenicidad en la práctica clínica. Tras considerar exhaustivamente lo anterior, se decidió que el aminoácido candidato para la sustitución en H58 sería cualquiera de Asp, Ile, Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Glu y Ala.

De la misma manera que se describió anteriormente, se determinaron los aminoácidos a sustituir para cada uno de los aminoácidos H30 a 31, H30 a 32, H31, H35, H52C, H52C y 54, H58, H73, H100A, H101, H49, H100E, L89, L89 y 91, L91, L96 y L36. Finalmente, se diseñaron las secuencias de las 66 variantes (Tabla 1).

Ejemplo 1-2: Obtención del grupo de anticuerpos biespecíficos scFv anti-TSPAN8/anti-CD3 con diversa afinidad de unión a CD3

Se obtuvieron las 66 variantes diseñadas en el Ejemplo 1-1.

Se sintetizó ADN que codifica un polipéptido en el que se unieron la región anti-CD3 scFv establecida en SEQ ID NO: 5 y el segundo polipéptido Fc de acuerdo con un método convencional y se insertó en un vector pcDNA3.4 TOPO (A14697, disponible en Thermo Fisher Scientific) (en adelante, el polipéptido en el que se unieron la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc se denomina "anti-CD3 scFv-Fc"). El vector así producido se designa como ApiD00000. El ADN que codifica las secuencias de aminoácidos de 66 variantes se sintetizó mediante un método convencional y se insertó en un vector pcDNA 3.4 TOPO. Los vectores así producidos se designan como ApiD00001 a ApiD00066. De manera similar, el ADN se sintetizó basándose en las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3) que codifican el anticuerpo anti-TSPAN8 a ser insertado en un vector pcDNA3.4 TOPO. Los vectores así preparados se designan como ApiD00067 y ApiD00068, respectivamente.

Para obtener anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 que contienen anti-CD3 scFv antes de la modificación, las células ExpiCHO-S (R) (A29127, disponible en Thermo Fisher Scientific) también se transfectaron con ApiD00067, ApiD00068 y ApiD00000 que codifican anti-CD3 scFv. De acuerdo con un método convencional, los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando MabSelect SuRe (17-5438-02, disponible en GE Healthcare) para obtener anticuerpos purificados. El anticuerpo biespecífico anti-TSPAN8/anti-CD3 resultante se designa como BTE-0001. Para obtener anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 que contienen 66 variantes de anti-CD3 scFv, las células ExpiCHO-S (R) también se transfectaron con ApiD00067, ApiD00068 y cualquiera de ApiD00001 a ApiD00066 que codifican anti-CD3 scFv. De acuerdo con un método convencional, los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando MabSelect SuRe para obtener 66 anticuerpos purificados. Los anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 resultantes se designan como BTE-0002 a BTE-0067. Los nombres de los vectores utilizados para la

preparación de los anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 y la información sobre los sitios de modificación y aminoácidos sustituidos del anti-CD3 scFv se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1-1

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada (anti-TSPAN8)	Cadena ligera (anti-TSPAN8)	anti-CD3 scFv-Fc (anti-CD3)	Mutación de la región variable anti-CD3 (aminoácido antes de la mutación_número de Kabat_aminoácido después de la mutación)
BTE-0001	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00000	
BTE-0002	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00001	T_H31_I
BTE-0003	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00002	T_H31_G
BTE-0004	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00003	T_H31_S
BTE-0005	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00004	N_H30_S, T_H31_G, Y_H32_S
BTE-0006	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00005	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H
BTE-0007	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00006	N_H30_S, T_H31_S
BTE-0008	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00007	N_H35_S
BTE-0009	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00008	N_H35_H
BTE-0010	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00009	N_H35_D
BTE-0011	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00010	N_H35_A
BTE-0012	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00011	N_H35_G
BTE-0013	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00012	N_H35_W
BTE-0014	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00013	N_H35_Y
BTE-0015	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00014	Y_H52C_A
BTE-0016	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00015	Y_H52C_F
BTE-0017	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00016	Y_H52C_A, N_H54_S
BTE-0018	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00017	Y_H58_A
BTE-0019	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00018	Y_H58_E
BTE-0020	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00019	Y_H58_D
BTE-0021	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00020	Y_H58_I
BTE-0022	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00021	Y_H58_K
BTE-0023	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00022	Y_H58_N
BTE-0024	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00023	Y_H58_R
BTE-0025	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00024	Y_H58_S
BTE-0026	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00025	Y_H58_T
BTE-0027	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00026	D_H73_T
BTE-0028	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00027	D_H73_N
BTE-0029	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00028	D_H73_E
BTE-0030	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00029	D_H73_K
BTE-0031	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00030	S_H100A_E
BTE-0032	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00031	S_H100A_P

Tabla 1-2

5	BTE-0033	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00032	S_H100A_A
	BTE-0034	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00033	S_H100A_D
	BTE-0035	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00034	S_H100A_F
	BTE-0036	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00035	S_H100A_G
	BTE-0037	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00036	S_H100A_H
10	BTE-0038	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00037	S_H100A_I
	BTE-0039	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00038	S_H100A_K
	BTE-0040	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00039	S_H100A_L
	BTE-0041	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00040	S_H100A_M
	BTE-0042	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00041	S_H100A_N
15	BTE-0043	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00042	S_H100A_Q
	BTE-0044	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00043	S_H100A_R
	BTE-0045	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00044	S_H100A_T
	BTE-0046	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00045	S_H100A_V
	BTE-0047	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00046	S_H100A_Y
20	BTE-0048	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00047	A_H101_D
	BTE-0049	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00048	A_H49_G
	BTE-0050	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00049	A_H49_S
	BTE-0051	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00050	W_H100E_Y
	BTE-0052	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00051	A_L89_L
25	BTE-0053	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00052	A_L89_L, W_L91_Y
	BTE-0054	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00053	A_L89_L, W_L91_S
	BTE-0055	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00054	A_L89_V, W_L91_Y
	BTE-0056	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00055	W_L91_Y
	BTE-0057	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00056	W_L96_Y
30	BTE-0058	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00057	W_L96_F
	BTE-0059	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00058	W_L96_G
	BTE-0060	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00059	W_L96_L
	BTE-0061	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00060	W_L96_P
	BTE-0062	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00061	W_L96_R
	BTE-0063	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00062	W_L96_V
	BTE-0064	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00063	V_L36_F
	BTE-0065	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00064	V_L36_Y
	BTE-0066	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00065	V_L36_H
	BTE-0067	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00066	V_L36_L

Ejemplo 1-3: Preparación de la proteína del complejo CD3εδ

Para evaluar la actividad de unión del anticuerpo biespecífico anti-TSPAN8/anti-CD3 a la proteína del complejo CD3, se obtuvo el CD3εδ. La proteína del complejo CD3εδ se obtuvo introduciendo dos vectores de expresión que contenían CD3ε o CD3δ en las células. Se utilizó el vector pcDNA3.4 TOPO como vector de expresión. ADN que codifica una secuencia de aminoácidos en la que el Fc de alpaca (correspondiente a las posiciones de aminoácidos 102 a 328 en el número de acceso de Genbank CAO79574.1) se unió a la secuencia señal y al dominio extracelular de CD3ε (correspondiente a las posiciones de aminoácidos 1 a 126 en el número de acceso de UNIPROT P07766) en este orden se insertó

en el primer vector de expresión. ADN que codifica una secuencia de aminoácidos en la que el Fc de alpaca (correspondiente a las posiciones de aminoácidos 102 a 327 en el número de acceso de Genbank CAO79574.1) estaba unido a la secuencia señal y al dominio extracelular de CD3 δ (correspondiente a las posiciones de aminoácidos 2 a 105 en el número de acceso de UNIPROT P04234) en este orden se insertó en el segundo vector. El ADN se sintetizó de acuerdo con un método convencional. Los dos vectores así preparados se transfectaron en células ExpiCHO-S (R). Los sobrenadantes de cultivo se purificaron mediante purificación por afinidad utilizando MabSelect SuRe y el método de intercambio aniónico utilizando HiTrap(R) Q High Performance (17-1154-01, disponible en GE Healthcare) para obtener la proteína del complejo CD3 $\epsilon\delta$.

Ejemplo 1-4: Evaluación de la actividad de unión a CD3 del grupo de anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 con diversa afinidad de unión a CD3

Las actividades de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 BTE-0001 a BTE-0067 a CD3 se evaluaron mediante ELISA. La prueba ELISA se realizó de acuerdo con el método convencional. La proteína del complejo CD3 $\epsilon\delta$ obtenida en el Ejemplo 1-3 se inmovilizó en una placa. Se utilizaron BTE-0001 a BTE-0067 como anticuerpos de prueba. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG Fc de cabra antihumano, Multi-Species SP ads-HRP (2014-05, disponible en SouthernBiotech). Se utilizó TMB+ Sustrato-Cromógeno (S1599, disponible en Dako) como reactivo de detección. Se utilizó Infinite M200pro (disponible en Tecan) para medir la absorbancia. Los valores de EC50 calculados a partir de la absorbancia medida se muestran en la Tabla 2. Los valores de EC50 se calcularon utilizando un modelo de pendiente variable (cuatro parámetros) en GraphPad Prism con el valor máximo en la misma placa fijado en la parte superior y el valor mínimo en el blanco en la misma placa fijado en la parte inferior. Dado que BTE-0001 siempre se midió en cada placa como control, solo el valor EC50 de BTE-0001 se expresó como el valor promedio de una pluralidad de placas.

Ejemplo 1-5: Evaluación de la estabilidad del grupo de anticuerpos biespecíficos scFv anti-TSPAN8/anti-CD3 con diversa afinidad de unión a CD3

Se realizó un ensayo de desplazamiento térmico (en adelante denominado "TSA, por sus siglas en inglés") para evaluar la estabilidad de BTE-0001 a BTE-0067. La temperatura de desnaturalización del punto medio (en adelante denominada "Tm, por sus siglas en inglés") en la que se desplegó el 50 % de las moléculas se midió mediante TSA. Se sabe generalmente que cuanto mayor sea la Tm, más termoestable será la proteína. Para el TSA se utilizó el kit de tinte de desplazamiento térmico de proteínas (Protein Thermal Shift Dye Kit, 4461146, disponible en Applied biosystems, en adelante denominado "Kit"). Cada anticuerpo se mezcló con un colorante fluorescente adjunto al kit de acuerdo con el protocolo del kit, se dispuso en una placa de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de 96 pocillos (4346907, disponible en Applied Biosystems) y se midió utilizando el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (disponible en Applied Biosystems). La medición de TSA se realizó elevando la temperatura de 25 °C a 99 °C. Para el análisis se utilizó el software Protein Thermal Shift (4466038, disponible en Applied biosystems).

La Tm más baja se calculó a partir del espectro obtenido en la medición de acuerdo con un método

convencional. La diferencia con Tm de BTE-0001 se definió como dTm. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Como resultado, la mayoría de los BTE-0002 a BTE-0067 obtenidos mediante la modificación tenían una Tm igual o inferior a la del BTE-0001 antes de la modificación. Sólo BTE-0006 a BTE-0008, BTE-0010, BTE-0034, BTE-0048 y BTE0062 tuvieron una Tm más alta que BTE-0001. Aunque se esperaba que la Tm fuera de aproximadamente 63 °C o superior, la mayoría de los anticuerpos resultantes tenían una Tm de aproximadamente 60 °C, lo que sugiere que la estabilidad térmica no era suficiente.

Tabla 2-1

	Nombre del anticuerpo	ELISA EC ₅₀ (ng/mL)	TSA Tm (°C)	TSA dTm (°C)
10	BTE-0001	6.52	60.0	0
	BTE-0002	10.4	59.7	-0.3
	BTE-0003	7.67	58.9	-1.1
	BTE-0004	5.37	60.0	0
15	BTE-0005	38.7	59.3	-0.7
	BTE-0006	224	61.1	1.1
	BTE-0007	3.79	61.1	1.1
	BTE-0008	431	63.3	3.3
	BTE-0009	286	60.0	0
	BTE-0010	2040	61.9	1.9
20	BTE-0011	378	59.7	-0.3
	BTE-0012	993	60.0	0
	BTE-0013	>7500	N.T.	N.T.
	BTE-0014	>7500	N.T.	N.T.
	BTE-0015	17.6	60.0	0
	BTE-0016	4.20	59.3	-0.7
	BTE-0017	30.0	59.3	-0.7
25	BTE-0018	61.3	59.7	-0.3
	BTE-0019	577	60.0	0
	BTE-0020	1260	60.0	0
	BTE-0021	38.7	58.6	-1.4
	BTE-0022	46.2	57.1	-2.9
	BTE-0023	208	58.9	-1.1
30	BTE-0024	41.2	57.1	-2.9
	BTE-0025	49.4	60.0	0
	BTE-0026	45.9	59.3	-0.7
	BTE-0027	2950	N.D.	N.D.
	BTE-0028	380	N.D.	N.D.
	BTE-0029	80.2	N.D.	N.D.
35	BTE-0030	>7500	N.T.	N.T.
	BTE-0031	17.4	60.0	0
	BTE-0032	255	58.9	-1.1
	BTE-0033	10.4	58.6	-1.4

Tabla 2-2

5	BTE-0034	47.1	60.8	0.8
	BTE-0035	87.5	57.1	-2.9
	BTE-0036	4.31	59.7	-0.3
	BTE-0037	31.0	58.6	-1.4
	BTE-0038	438	56.7	-3.3
10	BTE-0039	8.35	58.2	-1.8
	BTE-0040	38.9	57.5	-2.5
	BTE-0041	40.7	58.2	-1.8
	BTE-0042	57.5	59.3	-0.7
	BTE-0043	19.8	58.9	-1.1
15	BTE-0044	8.44	57.8	-2.2
	BTE-0045	8.25	58.9	-1.1
	BTE-0046	320	57.1	-2.9
	BTE-0047	135	56.7	-3.3
	BTE-0048	142	61.5	1.5
20	BTE-0049	4.98	58.9	-1.1
	BTE-0050	9.99	56.4	-3.6
	BTE-0051	7.35	59.7	-0.3
	BTE-0052	1230	54.9	-5.1
	BTE-0053	>7500	56.4	-3.6
25	BTE-0054	>7500	56.4	-3.6
	BTE-0055	35.5	58.2	-1.8
	BTE-0056	98.9	59.7	-0.3
	BTE-0057	1010	58.2	-1.8
	BTE-0058	847	58.2	-1.8
30	BTE-0059	>7500	55.3	-4.7
	BTE-0060	>7500	58.2	-1.8
	BTE-0061	>7500	58.9	-1.1
	BTE-0062	>7500	61.1	1.1
	BTE-0063	>7500	58.2	-1.8
35	BTE-0064	1870	58.6	-1.4
	BTE-0065	>7500	57.5	-2.5
	BTE-0066	>7500	60.0	0
	BTE-0067	3.34	58.6	-1.4

En la tabla, N.D. indica no determinado y N.T. Indica no evaluado.

Ejemplo 2: Obtención de anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 con diversa afinidad de unión a CD3 y estabilidad mejorada

En el Ejemplo 1, los presentes inventores lograron obtener anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 que tienen diversa afinidad de unión a CD3. Al mismo tiempo, sin embargo, también se sugirió que la estabilidad térmica de los anticuerpos no era suficiente. Por lo tanto, se seleccionaron 11 anticuerpos de los anticuerpos obtenidos en el Ejemplo 1 utilizando la afinidad de unión a CD3 como indicador para realizar estudios con el objetivo de mejorar la estabilidad. Se seleccionaron BTE-0015, BTE-0025, BTE-0031 y BTE-0034 como anticuerpos con alta actividad de unión, BTE-0006, BTE-0009 y BTE-

0048 como anticuerpos con actividad de unión media, y BTE-0008, BTE-0011, BTE-0012 y BTE-0019 se seleccionaron como anticuerpos con baja actividad de unión. En adelante, estos anticuerpos también se denominarán colectivamente "11 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3".

Ejemplo 2-1: Diseño de secuencia de anticuerpo biespecífico anti-TSPAN8/anti-CD3 con mutación

introducida para mejorar la estabilidad

Se diseñaron variantes para mejorar la estabilidad de los 11 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3. Para el diseño de las variantes se hizo referencia a la Patente de EE. UU. Núm. 9701759 y a la Patente de Japón Núm. 5686953. Específicamente, se analizaron las correlaciones entre las secuencias y los valores de propiedad con referencia a los valores de propiedad de T_m (°C) y rendimiento (mg/mL) descritos en la Figura 27 de la Patente de EE. UU. Núm. 9701759. Por ejemplo, en 53 de los 55 anticuerpos enumerados en la Figura 27 de la Patente de EE. UU. Núm. 9701759, el aminoácido número 75 (L75) en la región variable de la cadena ligera es leucina (Leu), mientras que XENP11838 y XENP12149 son cada uno isoleucina (Ile). Se encontró que estos anticuerpos tendían a tener T_m y rendimiento más altos que los otros 53 anticuerpos. Por lo tanto, en los 11 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3, se introdujo una mutación que altera el aminoácido L75 de Leu a Ile. Como resultado del mismo análisis de correlación para todos los residuos de aminoácidos, se encontró que la T_m y el rendimiento de los anticuerpos modificados tendían a ser altos cuando el aminoácido 100 (H100) en la región variable de la cadena pesada era ácido aspártico (Asp), cuando el aminoácido 58 (L58) en la región variable de la cadena ligera era valina (Val), cuando el aminoácido 85 (L85) en la región variable de la cadena ligera era ácido aspártico (Asp), y cuando el aminoácido 95 (L95) en la región variable de la cadena ligera era histidina (His). Tenga en cuenta que los valores L75, H100, L58, L85 y L95 anteriores se basan en la numeración de Kabat.

Con base en este resultado, se diseñaron 55 anticuerpos introduciendo mutaciones de Ile en L75, Asp en H100, Val en L58, Asp en L85 y His en L95 en los 11 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3.

Además, en los 55 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3, se introdujo la mutación P329A, en la que la prolina 329 (Pro) en el índice EU se sustituyó por Ala, en lugar de la N297G utilizada en el Ejemplo 1. Para confirmar el efecto del cambio de N297G a P329A sobre la estabilidad, también se diseñaron anticuerpos biespecíficos (BTE-0125 a BTE-0135) cambiando N297G en los 11 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 a P329A. Los anticuerpos preparados en el Ejemplo 2-1 también se denominan "anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 66". Los nombres de los vectores utilizados para la producción de los 66 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 y la información sobre los sitios de modificación y aminoácidos sustituidos del anti-CD3 scFv se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3-1

	Nombre del anticuerpo	Cadena pesada (anti-TSPAN8)	Cadena ligera (anti-TSPAN8)	anti-CD3 ScFv-Fc (anti-CD3)	Mutación de la región variable anti-CD3 (aminoácido antes de la mutación_número de Kabat_aminoácido después de la mutación)
5	BTE-0070	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00078	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, N_H100_D
	BTE-0071	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00079	N_H35_S, N_H100_D
	BTE-0072	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00080	N_H35_H, N_H100_D
	BTE-0073	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00081	N_H35_A, N_H100_D
	BTE-0074	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00082	N_H35_G, N_H100_D
10	BTE-0075	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00083	Y_H52C_A, N_H100_D
	BTE-0076	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00084	Y_H58_E, N_H100_D
	BTE-0077	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00085	Y_H58_S, N_H100_D
	BTE-0078	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00086	N_H100_D, S_H100A_E
	BTE-0079	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00087	N_H100_D, S_H100A_D
15	BTE-0080	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00088	N_H100_D, A_H101_D
	BTE-0081	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00136	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, T_L58_V
	BTE-0082	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00137	N_H35_S, T_L58_V
	BTE-0083	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00138	N_H35_H, T_L58_V
	BTE-0084	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00139	N_H35_A, T_L58_V
20	BTE-0085	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00140	N_H35_G, T_L58_V
	BTE-0086	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00141	Y_H52C_A, T_L58_V
	BTE-0087	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00142	Y_H58_E, T_L58_V
	BTE-0088	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00143	Y_H58_S, T_L58_V
	BTE-0089	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00144	S_H100A_E, T_L58_V
25	BTE-0090	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00145	S_H100A_D, T_L58_V
	BTE-0091	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00146	A_H101_D, T_L58_V
	BTE-0092	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00100	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, L_L75_I
	BTE-0093	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00101	N_H35_S, L_L75_I
	BTE-0094	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00102	N_H35_H, L_L75_I
30	BTE-0095	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00103	N_H35_A, L_L75_I
	BTE-0096	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00104	N_H35_G, L_L75_I
	BTE-0097	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00105	Y_H52C_A, L_L75_I
	BTE-0098	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00106	Y_H58_E, L_L75_I
	BTE-0099	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00107	Y_H58_S, L_L75_I
30	BTE-0100	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00108	S_H100A_E, L_L75_I
	BTE-0101	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00109	S_H100A_D, L_L75_I
	BTE-0102	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00110	A_H101_D, L_L75_I

Tabla 3-2

35	BTE-0103	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00111	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, E_L85_D
	BTE-0104	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00112	N_H35_S, E_L85_D
	BTE-0105	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00113	N_H35_H, E_L85_D
	BTE-0106	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00114	N_H35_A, E_L85_D
	BTE-0107	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00115	N_H35_G, E_L85_D
	BTE-0108	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00116	Y_H52C_A, E_L85_D
	BTE-0109	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00117	Y_H58_E, E_L85_D

5	BTE-0110	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00118	Y_H58_S, E_L85_D
	BTE-0111	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00119	S_H100A_E, E_L85_D
	BTE-0112	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00120	S_H100A_D, E_L85_D
	BTE-0113	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00121	A_H101_D, E_L85_D
	BTE-0114	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00122	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, L_L95_H
10	BTE-0115	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00123	N_H35_S, L_L95_H
	BTE-0116	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00124	N_H35_H, L_L95_H
	BTE-0117	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00125	N_H35_A, L_L95_H
	BTE-0118	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00126	N_H35_G, L_L95_H
	BTE-0119	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00127	Y_H52C_A, L_L95_H
15	BTE-0120	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00128	Y_H58_E, L_L95_H
	BTE-0121	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00129	Y_H58_S, L_L95_H
	BTE-0122	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00130	S_H100A_E, L_L95_H
	BTE-0123	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00131	S_H100A_D, L_L95_H
	BTE-0124	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00132	A_H101_D, L_L95_H
20	BTE-0125	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00147	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H
	BTE-0126	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00148	N_H35_S
	BTE-0127	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00149	N_H35_H
	BTE-0128	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00150	N_H35_A
	BTE-0129	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00151	N_H35_G
25	BTE-0130	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00152	Y_H52C_A
	BTE-0131	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00153	Y_H58_E
	BTE-0132	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00154	Y_H58_S
	BTE-0133	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00155	S_H100A_E
	BTE-0134	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00156	S_H100A_D
	BTE-0135	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00157	A_H101_D

Ejemplo 2-2: Obtención de anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 con mutación introducida para mejorar la estabilidad

El ADN que codifica las secuencias de aminoácidos del scFv-Fc anti-CD3 de los 66 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 se sintetizó de acuerdo con un método convencional y se insertó en un vector pcDNA3.4 TOPO. Los vectores así preparados se designan como ApiD00078 a ApiD00088, ApiD00100 a ApiD00132 y ApiD00136 a ApiD00157 (en adelante también denominados "66 vectores anti-CD3 scFv") (Tabla 3). Como la mutación N297G contenida en la región Fc de estos vectores se cambió a la mutación P329A, el ADN en el que se encuentra la mutación N297G en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo anti-TSPAN8 se cambió a la mutación P329A y se sintetizó y se insertó en el vector pcDNA3.4 TOPO. El vector así producido se designa como ApiD00133.

Para obtener anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 modificados, las células ExpiCHO-S (R) se transfectaron con cualquiera de los 66 vectores anti-CD3 scFv, ApiD00067 y ApiD00068. De acuerdo con un método convencional, los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando MabSelect SuRe para obtener 66 anticuerpos anti-TSPAN8/anti-CD3 de BTE-0070 a BTE-135. Los nombres de los vectores utilizados para la producción de los anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 y la información sobre los sitios de modificación y aminoácidos sustituidos del anti-CD3 scFv se muestran en la Tabla 3.

Ejemplo 2-3: Evaluación de la actividad de unión a CD3 del grupo de anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 con mutación introducida para mejorar la estabilidad

Las actividades de unión de los 66 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 a CD3 se evaluaron mediante el ELISA descrito en el Ejemplo 1-4. Como resultado, incluso cuando se realizaron varias modificaciones al anti-CD3 scFv para mejorar la estabilidad, varias actividades de unión a CD3 no se vieron afectadas significativamente y las actividades de unión originales se mantuvieron en su mayoría. Las relaciones de los valores de EC₅₀ para la unión a CD3 y los valores de EC₅₀ para BTE-0001 se muestran en la Tabla 4.

Ejemplo 2-4: Evaluación de la estabilidad de 66 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 con mutación introducida para mejorar la estabilidad

Las estabildades de los 66 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 se evaluaron mediante el TSA descrito en el Ejemplo 1-5. La T_m resultante y la diferencia de dT_m con la T_m de BTE-0001 se muestran en la Tabla 4. Un anticuerpo con una EC₅₀ ELISA de 1250 ng/mL o menos y una T_m de 63 °C o más en TSA se definió como un anticuerpo con estabilidad mejorada. Además, se seleccionó un anticuerpo con el que la cantidad de anticuerpo producido (rendimiento) en relación con el volumen del medio durante la preparación de la proteína fue de 1 mg/mL o más. Además, se seleccionaron 34 anticuerpos biespecíficos anti-TSPAN8/anti-CD3 scFv y se dejaron reposar a 40 °C durante una semana para evaluar su estabilidad. Las estabildades de los anticuerpos se evaluaron midiendo las actividades de unión de CD3 de los anticuerpos antes y después de la incubación estática utilizando resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés). Para las mediciones se utilizó Biacore T-200 (Cytiva). Se preparó un chip utilizado para las mediciones de Biacore inmovilizando un anticuerpo anti-His en el chip sensor Serie S CM5 (29104988, disponible en Cytiva) utilizando el kit de captura de His (28995056, disponible en Cytiva) y el kit de acoplamiento de amina (BR100050, disponible en Cytiva), seguido de la unión de la proteína heterodímera CD3εhumana y CD3δ , etiqueta His y etiqueta libre (MALS verifica) (CDD-H52W1, disponible en AcroBiosystems). La actividad de unión de CD3 después de la incubación estática (Biacore40C1W) se calculó con la actividad de unión de CD3 antes de la incubación estática como 100 % (Tabla 4). Cuanto más bajos sean los valores relativos en el Biacore40C1W, peor será la estabilidad del almacenamiento estático. Como resultado, se encontraron anticuerpos BTE-0079, 0080, 0090, 0091, 0092, 0097 a 0102, 0111 a 0113, 0134, 0135 con una T_m de 63 °C o superior y una actividad residual de 78 % o más retenida. Los anti-CD3 scFv utilizados en los 16 anticuerpos también se denominan "16 anti-CD3 scFv".

Tabla 4-1

Nombre del anticuerpo	ELISA EC ₅₀ (ng/mL)	T _m (°C)	TSA	dT _m (°C)	TSA	Biacore 40C1W(%)
BTE-0070	632	63.5		3.5		N.T.
BTE-0071	>7500	66.3		6.3		N.T.
BTE-0072	1640	62.4		2.4		N.T.
BTE-0073	1330	63.0		3.0		N.T.
BTE-0074	>7500	64.0		4.0		N.T.
BTE-0075	113	62.4		2.4		N.T.

	BTE-0076	438	62.7	2.7	N.T.
	BTE-0077	274	62.2	2.2	N.T.
	BTE-0078	634	63.7	3.7	N.T.
	BTE-0079	220	64.0	4.0	78.9
	BTE-0080	1180	64.3	4.3	93.9
5	BTE-0081	152	63.8	3.8	67.2
	BTE-0082	322	66.0	6.0	57.2
	BTE-0083	165	62.1	2.1	N.T.
	BTE-0084	361	61.2	1.2	N.T.
	BTE-0085	729	61.6	1.6	N.T.
	BTE-0086	37.9	62.1	2.1	N.T.
10	BTE-0087	1020	62.2	2.2	N.T.
	BTE-0088	55.6	61.9	1.9	N.T.
	BTE-0089	97.5	63.0	3.0	N.T.
	BTE-0090	120	63.7	3.7	103.4
	BTE-0091	623	64.1	4.1	103.3
	BTE-0092	187	64.6	4.6	89.3
15	BTE-0093	90.3	66.9	6.9	N.D.
	BTE-0094	297	63.0	3.0	N.T.
	BTE-0095	410	63.5	3.5	N.T.
	BTE-0096	802	64.1	4.1	59.5
	BTE-0097	30.8	63.1	3.1	83.2
	BTE-0098	438	63.5	3.5	79.2
	BTE-0099	68.2	63.1	3.1	82.8
20	BTE-0100	247	64.1	4.1	83.6

Tabla 4-2

	BTE-0101	113	64.3	4.3	83.3
	BTE-0102	770	64.4	4.4	101.2
	BTE-0103	180	64.1	4.1	42.1
	BTE-0104	499	66.6	6.6	N.D.
	BTE-0105	201	63.0	3.0	N.T.
25	BTE-0106	327	62.7	2.7	N.T.
	BTE-0107	594	63.0	3.0	N.T.
	BTE-0108	8.31	62.9	2.9	72.2
	BTE-0109	217	63.2	3.2	N.T.
30	BTE-0110	47.1	62.8	2.8	N.T.
	BTE-0111	66.0	63.7	3.7	78.7
	BTE-0112	43.3	64.1	4.1	84.8
	BTE-0113	363	64.6	4.6	101.4
	BTE-0114	86.0	63.5	3.5	N.T.
	BTE-0115	358	65.3	5.3	57.5
35	BTE-0116	187	61.8	1.8	N.T.
	BTE-0117	90.0	61.2	1.2	N.T.
	BTE-0118	709	61.5	1.5	N.T.
	BTE-0119	23.2	62.7	2.7	N.T.
	BTE-0120	240	62.7	2.7	N.T.

5	BTE-0121	45.8	62.2	2.2	N.T.
	BTE-0122	242	63.5	3.5	N.T.
	BTE-0123	192	64.3	4.3	N.T.
	BTE-0124	378	63.7	3.7	69.7
	BTE-0125	163	63.1	3.1	51.8
10	BTE-0126	330	65.4	5.4	60.0
	BTE-0127	122	61.5	1.5	41.6
	BTE-0128	174	61.3	1.3	64.9
	BTE-0129	469	61.9	1.9	52.8
	BTE-0130	10.9	61.8	1.8	77.7
	BTE-0131	269	62.1	2.1	79.2
	BTE-0132	31.5	61.8	1.8	72.9
	BTE-0133	69.3	62.6	2.6	69.0
	BTE-0134	46.0	63.1	3.1	86.8
	BTE-0135	204	63.5	3.5	84.8

En la tabla, N.D. indica no determinado y N.T. Indica no evaluado.

15 Ejemplo 3: Obtención de anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3

Para confirmar si los 16 anti-CD3 scFv obtenidos en el Ejemplo 2-4 también podrían usarse para anticuerpos biespecíficos con cualquier anticuerpo anti-TAA, se intentó obtener un anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 usando un anticuerpo CD37.

Como anticuerpos anti-CD37, los anticuerpos anti-CD37 se establecen en las SEQ ID NO: Se utilizaron los números 10 y 12 derivados de la Publicación Internacional Núm. WO 2015017552. El ADN se sintetizó basándose en la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo anti-CD37 descrito en SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 11 de la Publicación Internacional Núm. WO 2015017552 e insertado en el vector pcDNA3.4 TOPO. Los vectores así preparados se designan como ApiD00158 y ApiD00159. Las células ExpiCHO-S (R) fueron transfectadas con ApiD00087, ApiD00088, ApiD00145, ApiD00146, ApiD00100, ApiD00105 a ApiD00110, ApiD00119 a ApiD00121, ApiD00156 y ApiD00157 que codifican anti-CD3 scFv. De acuerdo con un método convencional, los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando MabSelect SuRe. Los 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3 resultantes se denominan BTE-0136 a 0149, 0151 y 0152 (en adelante, también denominados los "16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3"). Los nombres de los vectores utilizados para la producción de los anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3, el número de aminoácidos modificado del anti-CD3 scFv y la información sobre la mutación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

5	Nombre del anticuerpo	Cadena pesada (anti-CD37)	Cadena ligera (anti-CD37)	anti-CD3 scFv-Fc (anti-CD3)	Mutación de la región variable anti-CD3 (aminoácido antes de la mutación_número de Kabat_aminoácido después de la mutación)
	BTE-0136	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00087 (SEQ ID NO: 14)	N_H100_D, S_H100A_D
	BTE-0137	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00088 (SEQ ID NO: 20)	N_H100_D, A_H101_D
10	BTE-0138	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00145 (SEQ ID NO: 22)	S_H100A_D, T_L58_V
	BTE-0139	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00146 (SEQ ID NO: 24)	A_H101_D, T_L58_V
	BTE-0140	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00100 (SEQ ID NO: 26)	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, L_L75_I
15	BTE-0141	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00105 (SEQ ID NO: 28)	Y_H52C_A, L_L75_I
	BTE-0142	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00106 (SEQ ID NO: 16)	Y_H58_E, L_L75_I
	BTE-0143	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00107 (SEQ ID NO: 30)	Y_H58_S, L_L75_I
20	BTE-0144	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00108 (SEQ ID NO: 32)	S_H100A_E, L_L75_I
	BTE-0145	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00109 (SEQ ID NO: 34)	S_H100A_D, L_L75_I
	BTE-0146	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00110 (SEQ ID NO: 36)	A_H101_D, L_L75_I
25	BTE-0147	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00119 (SEQ ID NO: 38)	S_H100A_E, E_L85_D
	BTE-0148	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00120 (SEQ ID NO: 18)	S_H100A_D, E_L85_D
	BTE-0149	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00121 (SEQ ID NO: 40)	A_H101_D, E_L85_D
	BTE-0151	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00156 (SEQ ID NO: 42)	S_H100A_D
30	BTE-0152	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00157 (SEQ ID NO: 44)	A_H101_D

Ejemplo 4: Evaluación de la actividad *in vitro* del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3]

Para seleccionar un anticuerpo con excelente estabilidad y actividad de los 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3 preparados en el Ejemplo 3, se evaluaron la actividad de unión a CD3 humano, la estabilidad y la citotoxicidad en un sistema de cocultivo de células que expresan CD37 y células T humanas (citotoxicidad de células T redirigidas: RTCC) y la producción de citocinas se evaluaron de la siguiente manera.

Ejemplo 4-1: Evaluación de la actividad de unión de 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3

Las actividades de unión de los 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3 a CD3 se evaluaron mediante el ELISA descrito en el Ejemplo 1-4. Como resultado, se confirmó que los 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD3 mantuvieron sustancialmente sus diversas actividades de unión a CD3 incluso en los anticuerpos biespecíficos con anticuerpos anti-CD37. Los valores de EC₅₀ para las actividades de unión de los 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3 a CD3 se muestran en la Tabla 6.

Ejemplo 4-2: Evaluación de la estabilidad de 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3

Las estabilidades de los 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3 se evaluaron mediante el TSA descrito en el Ejemplo 1-5. La T_m y la diferencia de dT_m con respecto a la T_m de BTE-0001 se muestran en la Tabla 6. Después de dejar reposar los anticuerpos a 40 °C durante una semana, se midieron las tasas residuales de actividades de unión anti-CD3 (Tabla 6). Los 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3 exhibieron aproximadamente 70 % o más de estabilidad en Biacore40C1W. En particular, BTE-0136, 0138, 0141, 0142, 0144, 0145, 0148 y 0151 mostraron una tasa residual del 80 % o más, lo que sugiere que estos anticuerpos eran altamente estables.

Tabla 6

Nombre del anticuerpo	ELISA EC ₅₀ (ng/mL)	T _m (°C)	TSA	dT _m (°C)	TSA	Biacore 40C1W(%)
BTE-0136	66.9	64.3		4.3		98.4
BTE-0137	1600	64.6		4.6		79.7
BTE-0138	71.0	63.7		3.7		98.9
BTE-0139	444	64.3		4.3		71.4
BTE-0140	205	64.6		4.6		69.6
BTE-0141	29.0	63.4		3.4		111.7
BTE-0142	292	63.7		3.7		84.0
BTE-0143	64.4	63.3		3.3		77.7
BTE-0144	138	64.1		4.1		85.2
BTE-0145	85.4	64.4		4.4		101.2
BTE-0146	488	65.3		5.3		70.1
BTE-0147	31.7	63.8		3.8		73.9
BTE-0148	36.4	64.4		4.4		88.8
BTE-0149	209	64.9		4.9		72.2
BTE-0151	74.7	63.1		3.1		90.2
BTE-0152	360	63.7		3.7		70.2

Ejemplo 4-3: Evaluación de la actividad RTCC de 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3

Se evaluaron las actividades RTCC *in vitro* inducidas por la acción de anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3 en un sistema de co-cultivo de células CHO-K1 que expresan CD37 humano y GFPSpark(R) (células CHO-K1_human CD37/GFPSpark) y células T aisladas de PBMC humanas.

1: Preparación de células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark

Las células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark se prepararon mediante el siguiente método: Se construyó un vector de expresión de CD37 humano insertando ADN que codifica CD37 humano (Núm. de acceso NCBI NP_001765.1) en un vector pcDNA3.4 TOPO de acuerdo con un método convencional. Se construyó un vector de expresión de GFPSpark eliminando la secuencia PD-L1 del vector de expresión PD-L1-GFPSpark (HG10084-ACG, disponible en SinoBiological) de acuerdo con un método convencional. Estos dos vectores plasmídicos se transfectaron en células CHO-K1 (American Type Culture Collection, CCL-61) utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine 3000 (L3000015, disponible en Thermo Fisher Scientific) y se cultivaron en un medio que contenía Geneticina (10131-027, disponible en Thermo Fisher Scientific) e Higromicina B Gold (ant-hg-5, disponible en InvivoGen) para seleccionar las células transfectadas. Las células en las que se confirmó la expresión de CD37 humano y GFPSpark mediante citometría de flujo después del aislamiento de células clonales individuales se utilizan como células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark en los siguientes experimentos.

2: Preparación de células pan-T expandidas

Las células Pan T (incluidas las células CD4T y CD8T) se aislaron de PBMC humanas (PB003F, disponible en ALLCELLS) utilizando el kit de aislamiento de células Pan T humano (130-096-535, disponible en Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo adjunto. Las células pan-T aisladas se diluyeron a 1×10^6 células/mL, se les añadió Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 para la expansión y activación de células T (11131D, disponible en Thermo Fisher Scientific) en la misma cantidad que las células pan-T y se les añadió IL-2 humana (200-02, disponible en PeproTech) a una concentración final de 30 U/mL y las células se cultivaron en una incubadora con 5 % de CO₂ a 37 °C, las cuales fueron pasadas a una concentración de 5×10^5 células/mL a los 4 días, 6 días y 8 días después del inicio del cultivo. Se añadió IL-2 humana a una concentración final de 30 U/mL en el momento del paso 4 y 6 días después del inicio del cultivo. Las células se recolectaron 11 días después del inicio del cultivo, se limpiaron de Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 para expansión y activación de células T con un imán y luego se suspendieron en CELLBANKER1 (CB011, disponible en Nihon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.) y se criopreservaron. Las células preparadas se denominan células pan-T expandidas.

3: Ensayo de RTCC

La suspensión de células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark preparada a 5×10^4 células/mL en el medio de cultivo se sembró en una placa de 384 pocillos de fondo plano (781182, disponible en Greiner) en una cantidad de 20 µL (1×10^3 células) para cada una y se cultivó en una incubadora con 5 % de CO₂ a 37 °C durante 3 horas. BTE-0136, 0138, 0141 a 0145, 0147, 0148 y 0151 se diluyeron cada uno a 2.9 pg/mL en una proporción común de 4 veces con una concentración final máxima de 3.0 µg/mL (convertida a una concentración final de 0.95 pg/mL a 1.0 µg/mL). BTE-0137, 0139, 0140, 0146, 0149 y 0152 se diluyeron cada uno a 29 pg/mL en una proporción común de 4 veces con una concentración final máxima de 30 µg/mL (convertida a una concentración final de 9.5 pg/mL a 10 µg/mL). Los anticuerpos diluidos se añadieron a la placa de 384 pocillos en cultivo en una cantidad de 20 µL para cada uno, a los que se añadieron las células pan T expandidas preparadas a 5×10^5 células/mL en el medio de cultivo en una

cantidad de 20 μ L para cada una y se cultivaron en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C durante 3 días. Luego se midió el área de fluorescencia GFPSpark de cada pocillo como indicador del recuento de células viables utilizando IncuCyte(R) ZOOM (disponible en Sartorius AG). La relación entre las concentraciones de varios anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3 y las áreas de fluorescencia de GFPSpark se muestra en las Figuras. 1-1 y 1-2. Los resultados mostraron que 15 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3, excepto BTE-0137, redujeron el recuento de células viables de las células CHO-K1_humanas CD37/GFPSpark.

4: Evaluación del efecto activador de las células T de 16 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3

El IFN- γ y el TNF- α contenidos en el sobrenadante de cultivo del ensayo RTCC del Ejemplo 4-3-3 se midieron mediante ELISA para evaluar el efecto de activación de células T de los anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3. Para la medición se utilizaron BD OptEIA Human IFN- γ ELISA (555142, disponible en BD Biosciences) y Human TNF- α DuoSet ELISA (DY210-5, disponible en R&D Systems). En las figuras 2-1 a 2-4 se muestran gráficos que representan la cantidad de IFN- γ y TNF- α detectados frente a la concentración del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3 añadido. Los resultados mostraron que 15 anticuerpos biespecíficos anti-CD37/anti-CD3, excepto BTE-0137, indujeron la producción de IFN- γ y TNF- α , mientras que las cantidades de IFN- γ y TNF- α producidas disminuyeron en muchos anticuerpos en presencia de anticuerpos a una determinada concentración o superior. En general, se sabe que un anticuerpo diseñado para formar un enlace cruzado entre células mediante el reconocimiento de dos moléculas de antígeno no puede formar un enlace cruzado entre células en condiciones de alta concentración porque el antígeno está ocupado por un anticuerpo unido a una sola molécula de antígeno (AAPS J., 2019, Vol. 21(4), pág. 66). Una disminución en la cantidad de IFN- γ y TNF- α producida en el intervalo de alta concentración de anticuerpos es el resultado de dicha inhibición de la formación de enlaces cruzados intercelulares, y los anticuerpos con dichas características se consideran anticuerpos que probablemente atenúen el efecto citotóxico de las células T y, por lo tanto, no son preferibles como anticuerpos para ser utilizados en el tratamiento del cáncer humano. En vista de lo anterior, se seleccionaron BTE-0136, 0142, 0148 como anticuerpos candidatos para usarse en terapia humana como resultado de una selección integral de anticuerpos con diversas afinidades de unión a CD3, estabilidad y una pequeña tasa de reducción en la producción de IFN- γ y TNF- α incluso en altas concentraciones en el ensayo RTCC. Los resultados sugieren que los anticuerpos biespecíficos anti-TAA-anti-CD3 scFv se pueden preparar mediante combinación con 16 anti-CD3 scFv que tienen diversa afinidad de unión para CD3, obteniendo así anticuerpos biespecíficos anti-TAA/anti-CD3 scFv que tienen perfiles preferidos para usarse en terapia humana.

Ejemplo 5: Evaluación antitumoral *in vivo* del anticuerpo biespecífico anti-CD37/anti-CD3

A ratones hembra NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO (NOG) de seis semanas de edad (disponibles en In-Vivo Science Inc.) se les trasplantaron 2.5 x 10⁶ células/100 μ L de PBMC humanas (33000-10M, disponible en Precision for Medicine) suspendidas en PBS de la vena de la cola. Posteriormente, 13 días después del trasplante de las PBMC humanas, se trasplantaron por vía subcutánea en ratones 2 x 10⁶ células/100 μ L de células SU-DHL-6 (CRL-2959, disponible en la American Type Culture Collection) suspendidas en Matriz

de Membrana Basal Corning Matrigel, Libre de Rojo Fenol (356237, disponible en Corning). El volumen del tumor y el peso corporal se midieron 8 días después del trasplante de células SU-DHL-6 y los ratones se dividieron en grupos para que el volumen del tumor fuera igual en cada grupo. Se administraron BTE-0136, 0142 y 0148 diluidos en PBS desde la vena de la cola en dosis de 5, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 mg/kg el día de la agrupación y 7 días después. Se administró PBS al grupo de control. Los volúmenes de los tumores se midieron el día y los 4, 7 y 11 días después de la agrupación. La prueba se realizó con 8 ratones en cada grupo. Sin embargo, se excluyó del análisis un caso en cada uno de los grupos tratados con 0.001 mg/kg de BTE-0136 y 0.001 mg/kg de BTE-0148 que murió antes de los 11 días siguientes al inicio de la administración de anticuerpos. Los resultados se muestran en las figuras 3-1 a 3-3. El volumen del tumor [mm³] se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$(\text{Longitud [mm] del eje largo del tumor}) \times (\text{longitud [mm] del eje corto del tumor})^2 \times 0.5$$

Se compararon los volúmenes tumorales 11 días después del inicio de la administración de anticuerpos entre el grupo de control y cada grupo tratado con anticuerpos, y * se asignó a un grupo con una $P < 0.05$ y * * a un grupo con una $P < 0.01$ mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los resultados mostraron efectos antitumorales significativos de BTE-0136 y BTE-0142 en dosis de 0.001 mg/kg o más y BTE-0148 en dosis de 0.01 mg/kg o más.

Ejemplo 6: Obtención de anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3

Para confirmar si los anticuerpos biespecíficos de cualquier anticuerpo anti-TAA y los 16 anti-CD3 scFv obtenidos en los Ejemplos 2-4 tenían diversas actividades de unión a CD3 y buena estabilidad, se intentó obtener un anticuerpo biespecífico anti-SLC34A2/anti-CD3 utilizando un anticuerpo SLC34A2.

Ejemplo 6-1: Obtención del anticuerpo SLC34A2

Los presentes inventores prepararon un vector de expresión que transporta un polinucleótido que codifica SLC34A2 humano o SLC34A2 de mono para preparar células que expresan SLC34A2 humano o SLC34A2 de mono utilizando el vector de expresión. Se inmunizaron ratones AlivaMab (disponibles en Ablexis, patente de EE. UU. Núm. 9346873) con el vector de expresión o células de expresión para preparar hibridomas de acuerdo con un método convencional. Los anticuerpos producidos por los hibridomas se analizaron utilizando la unión a células que expresan SLC34A2 como indicador para obtener una pluralidad de anticuerpos SLC34A2.

Ejemplo 6-2: Preparación del anticuerpo biespecífico anti-SLC34A2/anti-CD3

Los anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 se prepararon utilizando los anticuerpos anti-SLC34A2 que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y la SEQ ID NO: 67, que se obtuvieron mediante el método descrito en el Ejemplo 6-1.

El ADN se sintetizó basándose en las secuencias de ADN de SEQ ID NO: 64 y la SEQ ID NO: 66) y se insertó en un vector pcDNA3.4 TOPO. Los vectores así preparados se designan como SLC_32O14A_HC y SLC_32O14A_LC. Las células ExpiCHO-S (R) se transfectaron con SLC_32O14A_HC, SLC_32O14A_LC y uno de ApiD00087, ApiD00145, ApiD00100, ApiD00105 a ApiD00109 y ApiD00119 a ApiD00121 que codifican anti-CD3 scFv. El sobrenadante del cultivo se purificó utilizando cartuchos de proteína A (G5496-60018, disponibles en Agilent) de acuerdo con un método convencional. Los 11

anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 resultantes se denominan BTE-0271 a 0281 (en adelante, también denominados los "11 anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3"). Los nombres de los vectores utilizados para la producción de los anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3, el número de aminoácidos modificado del anti-CD3 scFv y la información sobre la mutación se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada (anti-SLC34A2)	Cadena ligera (anti-SLC34A2)	Cadena pesada (anti-CD3)	Mutación de la región variable anti-CD3 (aminoácido antes de la mutación_número de Kabat_aminoácido después de la mutación)
BTE-0271	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00087	N_H100_D, S_H100A_D
BTE-0272	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00145	S_H100A_D, T_L58_V
BTE-0273	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00100	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, L_L75_I
BTE-0274	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00105	Y_H52C_A, L_L75_I
BTE-0275	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00106	Y_H58_E, L_L75_I
BTE-0276	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00107	Y_H58_S, L_L75_I
BTE-0277	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00108	S_H100A_E, L_L75_I
BTE-0278	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00109	S_H100A_D, L_L75_I
BTE-0279	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00119	S_H100A_E, E_L85_D
BTE-0280	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00120	S_H100A_D, E_L85_D
BTE-0281	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00121	A_H101_D, E_L85_D

Ejemplo 6-3: Evaluación de la actividad de unión a CD3 del anticuerpo biespecífico anti-SLC34A2/anti-CD3

Las actividades de unión de los 11 anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 a CD3 se evaluaron mediante el ELISA descrito en el Ejemplo 1-4 (Fig. 4). Como resultado, se confirmó que los 11 anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 mantuvieron sustancialmente sus diversas actividades de unión a CD3.

Ejemplo 6-4: Evaluación de la estabilidad del anticuerpo biespecífico anti-SLC34A2/anti-CD3

Las estabildades de los 11 anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 se evaluaron mediante el TSA descrito en el Ejemplo 1-5. La T_m y la diferencia de dT_m con respecto a la T_m de BTE-0001 se muestran en la Tabla 8. Los 11 anticuerpos mostraron una mayor estabilidad que BTE-0001.

Tabla 8

Nombre del anticuerpo	T _m TSA (°C)	dT _m TSA (°C)
BTE-0271	64.1	4.1
BTE-0272	63.4	3.4
BTE-0273	64.3	4.3
BTE-0274	63.4	3.4
BTE-0275	64.0	4.0
BTE-0276	63.5	3.5

BTE-0277	63.8	3.8
BTE-0278	64.3	4.3
BTE-0279	64.0	4.0
BTE-0280	64.0	4.0
BTE-0281	64.4	4.4

Ejemplo 6-5: Evaluación de la actividad in vitro del anticuerpo biespecífico anti-SLC34A2/anti-CD3

Se evaluaron las actividades RTCC *in vitro* inducidas por la acción de anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 en un sistema de cocultivo de células que expresan SLC34A2 y células T aisladas de PBMC humanas.

1: Preparación de la célula OVCAR-3_GFPSpark

El vector de expresión GFPSpark preparado en el Ejemplo 4-3 se transfectó en células OVCAR-3 que expresaban endógenamente SLC34A2 utilizando el reactivo Lipofectamine LTX con reactivo PLUS (15338100, disponible en Thermo Fisher Scientific). Las células en las que se confirmó la expresión de GFPSpark mediante citometría de flujo después del aislamiento de células clonales individuales se denominan "células OVCAR-3_GFPSpark".

2: Ensayo de RTCC

Se utilizaron BTE-0272 a 0280 de los 11 anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 como anticuerpos de prueba. Las células OVCAR-3_GFPSpark se suspendieron en un medio de cultivo para obtener 5×10^4 células/mL. La suspensión se sembró en una placa de fondo plano de 384 pocillos (781182, disponible en Greiner) en una cantidad de 20 μ L (1×10^3 células) para cada uno y se cultivó en una incubadora con 5 % de CO₂ a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, los anticuerpos de prueba se diluyeron cada uno a 29 pg/mL en una proporción común de 4 veces con una concentración final máxima de 30 μ g/mL (convertida a una concentración final de 10 μ g/mL a 9.5 pg/mL) y se agregaron a la placa de 384 pocillos en cultivo en una cantidad de 20 μ L para cada uno, a lo que se añadieron las células pan-T expandidas (producidas en el Ejemplo 4-3) preparadas a 5×10^5 células/mL en el medio de cultivo en una cantidad de 20 μ L para cada una y se cultivaron en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C durante 2 días. Luego se midió el área de fluorescencia GFPSpark de cada pocillo como indicador del recuento de células viables utilizando IncuCyte(R) S3 (disponible en Sartorius AG). Los resultados mostraron que los 9 anticuerpos biespecíficos anti-SLC34A2/anti-CD3 redujeron el recuento de células viables de las células OVCAR-3_GFPSpark (Figura 5). Los resultados de los Ejemplos 3 a 6 mostraron que los 16 anti-CD3 scFv, que se obtuvieron utilizando la diversidad de actividad de unión a CD3 y la estabilidad del anticuerpo como indicadores en combinación con un anticuerpo anti-TSPAN8, podrían mantener la diversidad de actividad de unión a CD3 y la estabilidad del anticuerpo incluso en un anticuerpo biespecífico preparado utilizando un anticuerpo anti-CD37 y un anticuerpo anti-SLC34A2. A partir de estos resultados, incluso en combinación con otros anticuerpos anti-TAA, se espera que los 16 anti-CD3 scFv tengan la diversidad de actividad de unión a CD3 y la estabilidad de los anticuerpos.

Ejemplo 7: Obtención de anticuerpos triespecíficos anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137

Los presentes inventores concibieron además la idea de utilizar anticuerpos anti-CD3 scFv en

anticuerpos triespecíficos. En una modalidad del mismo, se realizó un estudio para obtener un anticuerpo triespecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137. Se utilizaron anticuerpos anti-CLDN4 y anti-PD-L1 como anticuerpos anti-TAA, que en adelante se denominarán "anticuerpo triespecífico anti-CLDN4/anti-CD3/anti-CD137" y "anticuerpo triespecífico anti-PD-L1/anti-CD3/anti-CD137", respectivamente. Los anticuerpos también pueden denominarse colectivamente "anticuerpos triespecíficos anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137".

Ejemplo 7-1: Obtención de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN4/anti-CD3 y anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1/anti-CD3

Para producir un anticuerpo triespecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137, primero se produjo un anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3. Se diseñó un anticuerpo biespecífico anti-CLDN4-anti-CD3 de la misma manera que en el Ejemplo 3, basándose en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-CLDN4 descrito en SEQ ID NO: 6 y 8 y Publicación Internacional Núm. WO 2022/224997. Se diseñó un anticuerpo biespecífico anti-PD-L1/anti-CD3 basado en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-PD-L1 descrito en SEQ ID NO: 22 y 23 de la Publicación Internacional Núm. WO 2012/155019.

El ADN que codifica los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN4-anti-CD3 y anti-PD-L1-anti-CD3 se sintetizó de acuerdo con un método convencional y se insertó en el vector pcDNA3.4 TOPO. El vector con el ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-CLDN4 se denominó hKM3900(-), el vector con el ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-CLDN4 se denominó hKM3900_k, el vector con el ADN que codifica la cadena pesada de atezolizumab se denominó atezolizumab_HC (-) y el vector con el ADN que codifica la cadena ligera de atezolizumab se denominó atezolizumab_LC.

Las células ExpiCHO-S(R) fueron transfectadas con hKM3900(-), hKM3900_k y cualquiera de ApiD00087, ApiD00088, ApiD00100 y ApiD00146 que codifican anti-CD3 scFv. De acuerdo con un método convencional, los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando MabSelect SuRe para obtener 4 anticuerpos anti-CLDN4/anti-CD3.

Las células ExpiCHO-S (R) se transfectaron con atezolizumab_HC(-), atezolizumab_LC y cualquiera de ApiD00087, ApiD00088, ApiD00100 y ApiD00146 que codifican anti-CD3 scFv. De acuerdo con un método convencional, los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando MabSelect SuRe para obtener 4 anticuerpos anti-PD-L1/anti-CD3.

En adelante, los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN4/anti-CD3 y anti-PD-L1/anti-CD3 también se denominarán colectivamente "anticuerpos biespecíficos anti-TAA/anti-CD3". Las combinaciones de vectores utilizadas para la producción de los anticuerpos biespecíficos anti-TAA-anti CD3 se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada (anti-TAA-Fc)	Cadena ligera (anti-TAA)	anti-CD3 scFv-Fc (anti-CD3)
CD3_hKM3900_87	hKM3900(-)	hKM3900_k	ApiD00087 (SEQ ID NO: 14)
CD3_hKM3900_88	hKM3900(-)	hKM3900_k	ApiD00088 (SEQ ID NO: 20)
CD3_hKM3900_100	hKM3900(-)	hKM3900_k	ApiD00100 (SEQ ID NO: 26)

CD3_hKM3900_146	hKM3900(-)	hKM3900_k	ApiD00146 (SEQ ID NO: 24)
CD3_atezolizumab_87	atezolizumab_HC(-)	atezolizumab_LC	ApiD00087 (SEQ ID NO: 14)
CD3_atezolizumab_88	atezolizumab_HC(-)	atezolizumab_LC	ApiD00088 (SEQ ID NO: 20)
CD3_atezolizumab_100	atezolizumab_HC(-)	atezolizumab_LC	ApiD00100 (SEQ ID NO: 26)
CD3_atezolizumab_146	atezolizumab_HC(-)	atezolizumab_LC	ApiD00146 (SEQ ID NO: 24)

El anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 se analizó mediante SDS-PAGE utilizando NuPAGE 4 a 12 %, Bis-Tris, 1.0-1.5 mm, Mini Protein Gels (NP0322BOX o NP0329BOX, disponibles en Thermo Fisher Scientific). Los anticuerpos biespecíficos anti-TAA/anti-CD3 obtenidos en el Ejemplo 7-1 se trataron con o sin adición de NuPAGE Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fisher Scientific, NP0009), se procesaron a 200 V durante un tiempo apropiado y se tiñeron con SimplyBlue SafeStain (LC6065, disponible en Thermo Fisher Scientific), seguido de imágenes con Gel Doc EZ Imager (disponible en BioRad) o ChemiDoc Imager (disponible en BioRad). Se utilizaron estándares de proteína no teñidos Precision Plus (161-0363, disponibles en BIO-RAD) como marcadores de peso molecular. En todos los anticuerpos biespecíficos anti-TAA/anti-CD3 se observó una banda con movilidad correspondiente al peso molecular de interés (Figuras 6-1 y 6-2).

Ejemplo 7-2: Estudio del formato de anticuerpos triespecíficos anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137

Se diseñó un anticuerpo triespecífico anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 en el que se utilizó un enlazador GS y el anticuerpo anti-CD137 scFv descrito en SEQ ID NO: 26 de la Publicación Internacional Núm. WO 2022/224997 se unieron en serie al extremo carboxilo terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-TAA del anticuerpo biespecífico anti-TAA/anti-CD3 descrito en el Ejemplo 7-1. El ADN que codifica el polipéptido diseñado se sintetizó mediante un método convencional y se insertó en un vector pcDNA 3.4 TOPO. Los vectores así preparados se designan como hKM3900(-)_3-34-j6 y atezolizumab(-)_3-34-j6. Los vectores se transfectaron en células ExpiCHO-S (R) según las combinaciones que se muestran en la Tabla 10. De acuerdo con un método convencional, los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando MabSelect SuRe.

Los vectores utilizados para la producción de los anticuerpos triespecíficos anti-TAA-anti-CD3/anti-CD137 se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada (anti-TAA-Fc/anti-CD137 scFv)	Cadena ligera (anti-TAA)	anti-CD3 scFv-Fc (anti-CD3)
CD3x137_1_hKM3900_87	hKM3900(-)_3-34-j6	hKM3900_k	ApiD00087 (SEQ ID NO: 14)
CD3x137_1_hKM3900_88	hKM3900(-)_3-34-j6	hKM3900_k	ApiD00088 (SEQ ID NO: 20)

5	CD3x137_1_hKM3900_100	hKM3900(-)_3-34-j6	hKM3900_k	ApiD00100 (SEQ ID NO: 26)
	CD3x137_1_hKM3900_146	hKM3900(-)_3-34-j6	hKM3900_k	ApiD00146 (SEQ ID NO: 24)
	CD3x137_1_atezolizumab_87	atezolizumab(-)_3-34-j6	atezolizumab_LC	ApiD00087 (SEQ ID NO: 14)
	CD3x137_1_atezolizumab_88	atezolizumab(-)_3-34-j6	atezolizumab_LC	ApiD00088 (SEQ ID NO: 20)
	CD3x137_1_atezolizumab_100	atezolizumab(-)_3-34-j6	atezolizumab_LC	ApiD00100 (SEQ ID NO: 26)
10	CD3x137_1_atezolizumab_146	atezolizumab(-)_3-34-j6	atezolizumab_LC	ApiD00146 (SEQ ID NO: 24)

Los anticuerpos triespecíficos anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 se analizaron mediante SDS-PAGE de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 7-1. En todos los anticuerpos triespecíficos anti-TAA/anti-CD3/anti-CD137 se observó una banda con movilidad correspondiente al peso molecular de interés (Figuras 7-1 y 7-2).

Ejemplo 7: Actividad *in vitro* del anticuerpo triespecífico anti-CLDN4/anti-CD3/anti-CD137

Las actividades de unión de los anticuerpos triespecíficos anti-CLDN4/anti-CD3/anti-CD137 al CD3 humano se evaluaron mediante el ELISA descrito en el Ejemplo 1-4. Como resultado, incluso cuando se modificaron los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN4/anti-CD3, varias actividades de unión a CD3 no se vieron afectadas significativamente y las actividades de unión originales se mantuvieron en su mayor parte (Figura 8).

Las actividades de unión de los anticuerpos triespecíficos anti-CLDN4/anti-CD3/anti-CD137 al CD137 humano se evaluaron mediante el ELISA descrito en el Ejemplo 5-2 de la Publicación Internacional Núm. WO 2022/224997. Todos los anticuerpos triespecíficos anti-CLDN4/anti-CD3/anti-CD137 mantuvieron la actividad de unión a CD137 (Figura 9).

Las actividades de unión de los anticuerpos triespecíficos anti-CLDN4/anti-CD3/anti-CD137 al CLDN4 humano se evaluaron mediante ELISA basado en células. El CLDN4 humano que expresa CHO-K1 descrito en el Ejemplo 5-1 de la Publicación Internacional Núm. WO 2022/224997 se suspendió en MEM α (32571036, disponible en Thermo Fisher Scientific) que contenía 10 % de FBS y 1.5 mg/mL de Geneticina (10131027, disponible en Thermo Fisher Scientific), se sembró en una placa de 384 pocillos (356662, disponible en Corning) a 2×10^4 células/100 μ L/pocillo y se cultivó durante la noche. Se eliminaron los sobrenadantes de cultivo y se agregaron soluciones de anticuerpos de prueba diluidas en serie en HBSS (14065056, disponible en Thermo Fisher Scientific) que contenían BSA al 1 % (A3803-50G, disponible en Sigma-Aldrich) y HEPES 10 mM (17557-94, disponible en Nacalai Tesque), y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se utilizó HBSS que contenía BSA al 0.1 % y HEPES 10 mM como solución de lavado, se utilizó IgG Fc anti-humano de cabra, Multi-Species SP ads-HRP como anticuerpo secundario, se utilizó TMB (Dako, S1601) como sustrato y se utilizó 1 mol/L de ácido sulfúrico (198-0959, disponible en FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) para la terminación de la reacción. La

absorbancia se midió a 450 nm y 570 nm utilizando un Infinite M200PRO (disponible en TECAN). Todos los anticuerpos trispecíficos anti-CLDN4/anti-CD3/anti-CD137 mantuvieron la actividad de unión a CLDN4 (Figura 10).

Aplicabilidad industrial

5 Se espera que el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3 de la presente invención sea útil para tratar el cáncer. El polinucleótido, el vector de expresión, la célula hospedera que contiene el vector de expresión y el método para producir el anticuerpo de la presente invención también son útiles para producir el anticuerpo multiespecífico anti-TAA/anti-CD3.

Información sobre el listado de secuencias

10 SEQ ID NO: 2 y 8 representan secuencias de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo anti-TSPAN8 y las secuencias de nucleótidos establecidas en SEQ ID NO: 1 y 7 son secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-TSPAN8 establecidas en las SEQ ID NO: 2 y 8. SEQ ID NO: 4 representa una secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo anti-TSPAN8 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 es una
15 secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-TSPAN8 establecida en SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 10 representa una secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 9 es una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD37 establecida en SEQ ID NO: 10. SEQ ID NO: 12 representa una secuencia de aminoácidos de
20 cadena ligera del anticuerpo anti-CD37 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 11 es una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD37 establecida en SEQ ID NO: 12. SEQ ID NO: 6, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 o 44 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido en el que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos, y la secuencia de nucleótidos se establece en SEQ ID NO: 5, 13, 15,
25 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 o 43 es una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido, establecida en SEQ ID NO: 6, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 o 44, en los que la región anti-CD3 scFv y el segundo polipéptido Fc están unidos. SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52 o 54 es una secuencia de aminoácidos de la región anti-CD137 scFv y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 45, 47, 49, 51 o 53 es una secuencia de nucleótidos
30 que codifica la secuencia de aminoácidos de la región anti-CD137 scFv establecida en SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52, o 54. SEQ ID NO: 55 a 63 son secuencias de aminoácidos de los diversos enlaces descritos en la descripción detallada de la invención. SEQ ID NO: 65 o 67 es una secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-SLC34A2 y la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 64 o 66 es una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-SLC34A2 establecido en SEQ ID
35 NO: 65 o 67.